

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la

Recherche Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des Sciences



Mémoire de fin d'étude

En vue d'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Chimie analytique.

Filière : Chimie.

Domaine : Sciences de la matière.

Thème :

Réalisé par :

Synthèse et caractérisation d'un nouveau composite hybride à base d'hydroxyapatite co-dopée (au Zn\ Mg) et d'amidon pour des applications orthopédiques et dentaires .

M^{elle} AMIROUCHE Loubna

M^{elle} BOUHENDIR Imane

Soutenu le 12/7/2023 devant le jury composé de :

Dr GUENDOZI	Tounes	Président	Université de Blida 1
Dr OUKIL	Samia	Examineur	Université de Blida 1
Dr ALIOUI	Houria	Promoteur	Université de Blida 1

Année universitaire 2022 – 2023

REMERCIEMENT

Au premier lieu, nous tenons à remercier **ALLAH**, le tout puissant, de nous avoir donné le courage et la volonté de terminer ce travail ainsi que nos parents pour leurs appuis et leurs soutiens.

Nous tenons à remercier vivement toutes celles et ceux qui nous ont aidés à élaborer cet ouvrage et en particulier notre promotrice Mme **ALIOUI** pour son aide et sa disponibilité au cours de ce travail, ainsi pour ses orientations, ses conseils et sa motivation.

Nous tenons également à remercier les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont accordé en acceptant de juger notre travail.

Dédicaces

A mes chers parents et ma grand-mère pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chers frères, **Abdelmalek** et **Mohamed Islam**, ma soeur

Ines

Ama chère binôme **Imane**,

A mes meilleures amies et mon cousin **Sohaib** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes collègues, A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Loubna

Dédicaces

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices,
leur amour, leur tendresse, leur soutien et
leurs prières tout au long de mes études,

A mon cher frère, **Hamza** ,

A mes chers **grands parents** ,

A ma chère binôme **Loubna** ,

A toutes mes chères **copines**,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de
mon parcours universitaire.

Imane

Résumé

Ce travail porte essentiellement sur la synthèse d'un nouveau composite (pour des applications orthopédiques et dentaires) hybride à base d'une hydroxyapatite co-dopée (au Zn/Mg) préparée préalablement par la méthode de précipitation en utilisant l'amidon . Ce composite a été préparé suivant un protocole de lixiviation bien défini avec un rapport (50% HAp et 50% d'amidon).

L'identification de ce nouveau nano composite a été réalisée par différentes techniques d'analyses à savoir:(IRTF; MEB;EDX; DRX;). Les résultats de l'analyse IRTF ont révélé la présence des groupements OH^- et PO_4^{3-} , ainsi la présence de groupements vibrationnels de la liaison C-H et les principales bandes caractéristiques des glucides.

Les résultats de MEB de ce composite hybride á base d'HAp co- dopée et d'amidon ont montré que la morphologie de surface est aggloméré avec de petites particules sous forme sphériques de tailles nanométriques . Le diffractogramme EDX couplé avec le MEB ont permis d'identifier les différents constituants principaux de la phase du composite en proportions importantes.

Cependant, la technique par DRX a révélé la présence de deux phases, une apatitique et une seconde minoritaire de type whitlockit.

Comme application pour ce composite, des tests préliminaires d'activité antimicrobienne ont été réalisé pour voir son efficacité dans des applications orthopédiques.

Le biomatériau a été testée in vitro contre cinq bactéries (Escherichia Coli ; Klebsiella Pneumoniae ; Pseudomonas aeruginosa ; Staphylococcus aureus et Bacillus subtilis) et deux souches fongiques (Candida albicans et Aspergillus niger).

Des zones d'inhibitions allant de 9 à 17mm ont été constatées contre les bactéries á Gram (+) et de 9 à 11 mm contre les bactéries à Gram (-).

Les souches fongiques elles même ont été qualifiées comme des souches extrêmement sensibles avec des zones d'inhibitions de $18,66 \text{ mm} \pm 1,55$ contre *A. niger*, et de $12 \text{ mm} \pm 1,00$ contre *candida*. Les résultats obtenus montrent, de façon claire, que les zones d'inhibitions de toutes les bactéries ont été considérablement élargies, ils reflètent de plus la forte activité antifongiques vis-à-vis des champignons pathogènes de type (*candida* et l'*aspergillus*).

Mots clés : hydroxyapatite co-dopée, composite, lixiviation, actiçvité antimicrobienne,

Abstract

This work focuses on the synthesis of a new hybrid composite of Co-doped HAp, which was previously prepared by the precipitation and starch method. The resulting composite was prepared using a well-defined leaching protocol with a ratio of 50% HAp to 50% starch.

The identification of this new nanocomposite was carried out by various analytical techniques: (FTIR; SEM. XRD;). The results of the FTIR analysis revealed the presence of OH- and PO₄³⁻ groups, as well as the presence of vibrational groups of the C-H bond and the main bands characteristic of carbohydrates.

SEM results showed that the surface morphology of hybrid composite based on doped Co- hydroxyapatite and starch, giving rise to small spherical particles with nanometric sizes . In addition, the EDX diffractometer coupled with the SEM identified the various main constituents of the composite phase, in significant proportions.

However, the DRX technique revealed the presence of two phases, one apatitic and a second minority of whitlockite type.

As an application for this composite, preliminary tests of antimicrobial activity have been carried out to see its effectiveness in orthopedic applications.

The biomaterial was tested in vitro against five bacteria (Escherichia Coli; KlebsiellaPneumoniae; Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis) and two fungal strains (Candida albicans and Aspergillusniger).

Zones of inhibition ranging from 9 to 17 mm were observed against Gram (+) bacteria, and from 9 to 11 mm against Gram (-) bacteria.

The fungal strains themselves were qualified as extremely sensitive, with inhibition zones of $18.66 \text{ mm} \pm 1.55$ against A. niger, and $12 \text{ mm} \pm 1.00$ against candida. The results obtained clearly show that the inhibition zones of all bacteria were considerably enlarged, and also reflect the strong antifungal activity against pathogenic fungi such as candida and aspergillus.

Key words: hydroxyapatite ,composite,leaching, Co-doped.

ملخص

يركز هذا العمل على توليف مرطب هجين جديد من الهيدروكسي أباتيت المشترك الذي تم اعداده مسبقا بطريقة الترسيب و النشا. تم إعداد المركب اللاحق باتباع بروتوكول رشح محدد جيدا بنسبة (50% هيدروكسي اباتيت، 50% نشا)

تم تحديد هذا النانو مركب الجديد من خلال تقنيات تحليلية مختلفة بما في ذلك :التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء، مسح المجهر الإلكتروني، حيود الأشعة السينية.

كشفت نتائج التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء عن وجود مجموعات(OH-) و (PO_4^{3-}) بالإضافة إلى وجود مجموعات اهتزازية من رابطةq(C-H) و النطاقات المميزة الرئيسية للكربوهيدرات.

أظهرت نتائج المجهر الإلكتروني الماسح أن التشكل السطحي للمركب الهجين القائم على الهيدروكسي أباتيت المنشط و النشا مما أدى إلى ظهور جزيئات كروية صغيرة بأحجام نانومترية من 67 نانومتر إلى 97 نانومتر. بالإضافة إلى ذلك حدد بنسب كبيرة حيود التيار الكهربائي بالاقتران مع المكونات الرئيسية للمرحلة المركبة

مع بلورة. ومع ذلك، كشفت تقنية DRX عن وجود مرحلتين، معدة وأقلية بيضاء ثانية، حجم بلوري يبلغ حوالي

كتطبيق لهذا المركب تم اجراء اختبارات أولية للنشاط المضاد للمكروبات لمعرفة فعاليته في تطبيقات جراحة العظام.

تم اختبار المادة الحيوية في المختبر ضد خمس أنواع من البكتيريا (الاشرائية القولونية، الكلبسيلا الرئوية، الزائفة الزنجارية، المكورات العنقودية الذهبية، العسوية الرقيقة) و سلسلتان فطريتين المبيضات البيض و رشاشيات النيجر).

(6.) و 9 إلى 11 ملم ضد بكتيريا جرام(=لوحظت مناطق تثبيط تتراوح من 9 إلى 17 ملم ضد بكتيريا جرام)

تم تصنيف السلالات الفطرية على أنها سلالات حساسة للغاية مع مناطق تثبيط $18,66 \pm 1,55$ ملم ضد رشاشات النيجر و $12 \pm 1,00$ ملم ضد مبيضات البيض.. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها بوضوح ان مناطق التثبيط لجميع البكتيريا قد تم توسيعها بشكل كبير، كما أنها تعكس النشاط القوي المضاد للفطريات مقابل الفطريات الممرضة (الرشاشات و المبيضات).

الكلمات المفتاحية:

. ترشيح, هيدروكسيأباتيت,مركب .

Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction générale..... 1

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

I.a Les LES HYDROXYAPATITES.....3

I.a.1 Introduction3

I.a.2 Généralités sur l'hydroxyapatite3

I.a.3 La structure de l'hydroxyapatite..... 4

I.a.4 Hydroxyapatite naturelle.....5

I.a.5 Les Hydroxyapatites substituées.....8

I.a.6 Méthode de synthèse de l'hydroxyapatite.....10

I.a.7 Propriétés de l'hydroxyapatite10

I.a.8 Domaine d'application12

I.b AMIDON.....15

I.b.1 Introduction15

I.b.2 Généralités sur l'amidon16

I.b.3 Principales composantes et différentes caractéristiques de l'amidon de pomme de terre ...17

I.b.4 Composition chimique de l'amidon17

I.b.5 Propriétés physico-chimiques de l'amidon18

I.b.6 Propriétés hydrothermiques18

I.b.7 Utilisation de l'amidon dans l'industrie.....19

I.c Composite.....21

I.c.1 Généralités sur les nanocomposites.....21

I.c.2 Types de nanocomposites.....21

I.c.3 Propriétés des nanocomposites.....	22
I.c.4 Application des nanocomposites.....	23

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

II.1 Introduction	25
II.2 Techniques d'analyses.....	25
II.3 Synthèse des nanopoudres HAp.....	25
II.4 Synthèse du composite	28
II.5 Caractérisation de composite.....	30
II.6 Tests antimicrobien par la méthode de diffusion de disque sur gélose	31

CHAPITRE III: Résultats et discussion

III.1. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF).....	36
III.2 Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB).....	40
III.3 Analyse par diffraction des rayons X (DRX).....	42
III.2 Résultats de l'activité antimicrobienne.....	43
Conclusion	50
Références bibliographiques.....	
Annexes	

Liste des Figures

CHAPITRE I

Figure a.1 : Projection de la structure de HAp sur les plans (001) et (010)	5
Figure a.2 : Exemples de substitutions dans la structure apatitique	8
Figure b.1 : Forme et taille des granules d'amidon de pomme de terre. (Image de MEB grossissement $\times 280$).....	16
Figure b.2 : Structure de l'amidon.....	17
Figure c.1 : Morphologie d'un composite	21
Figure c.2 : Microcomposite (1), composite intercalé (2), composite exfolié (3).....	22

CHAPITRE II

Figure II.1 : Photographies de synthèse de l'hydroxyapatite.....	28
Figure II.2 : Photographies de procédé de lixiviation.....	30

CHAPITRE III

Figure III .1 : Spectre FTIR de HAp, amidon et composite.....	36
Figure III .2 : Image MEB de composite. (a) avec agrandissement (70000 X)1 ; (b) avec un agrandissement (240000 X).....	40
Figure III.3 : Image MEB couplé avec EDX de composite.....	41
Figure III .4 : Diffractogramme du composite synthétisé.....	42
Figure III .5 : Tests antimicrobiens des contrôles positifs.....	44
Figure III.6 : Activités Antibactérienne de composite.....	44
Figure III.7 : Tests antifongiques de composite avec <i>C. albicans</i> et <i>A.niger</i>	45
Figure III .8 : Photographies de l'activité antimicrobienne de composite C ₁ : composite.....	47
Figure III .9 : Modèle de comparaison Fisher de composite.....	48

Annexe I

Figure I.1 : Montage de synthèse du composite

Figure I.2 : Composite préparé

Figure I.3 : Lavage et filtration de composite

Figure I.4 : La poudre composite obtenue

Figure I.5 : Spectrophotomètre infrarouge

Figure I.6 : Diffractomètre

Figure I.7 : Microscope électronique à balayage

Annexe II

Figure II.1 : Spectre IRTF de HAp, amidon et composite

Figure II.2 : Spectre DRX de composite de type Whitlockite

Figure II.3 : Spectre DRX de composite

Figure II.4 : Schéma représentatif montrant la FWHM.

Liste des tableaux

CHAPITRE I

Tableau a.1. : Processus et source de synthèse de HAp naturelle	7
Tableau a.2 : Propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite.....	12
Tableau b.1 : Caractéristiques et composantes de l'amidon de pomme de terre.....	17

CHAPITRE II

Tableau II .1 : Verrerie et Appareillage	26
Tableau II.2 : Verrerie de laboratoire	29
Tableau II. 3 : Souches bactériennes et fongiques	32

CHAPITRE III

Tableau III.1: Position et attribution des bandes d'absorption infrarouge de l'amidon.....	36
Tableau III.2: Position et attribution des bandes d'absorption des bandes infrarouge de l'hydroxyapatite.....	37
Tableau III.3: Position et attribution des bandes d'absorption infrarouges de composite.....	39
Tableau III .4: Taille des cristallites et cristallinité du composite.....	43

Annexe II

Tableau II.1: Les différents constituants de composite	
---	--

Liste des abréviations

HAp : Hydroxyapatite

IR-TF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

DRX:Diffraction des rayons X

MEB:Microscopieélectroniqueàbalayage

ATG : Analyse thermogravimétrique

ATCC : American Type Culture Collection

NCTC : National Collection of Types Cultures

pH : Le potentiel hydrogène

Eq : équation

GPa : Giga Pascal

MPa :Miga Pascal

Cal : calorie

rpm : rotation par minute

mA : miliampère

Mm : Masse molaire

m : mètre

cm : centimètre

mm : millimètre

nm : nanomètre

µm : micromètre

L : litre

ml :mililitre

g : gramme

K :kelvin

Kv :kilovolt

°C :degré Celsius

°A :aangstroem

h :heure

s :second

mn : minute

INTRODUCTION

GENERALE

Les matériaux composites sont des matériaux à hautes performances mécaniques, façonnables à volonté au gré du concepteur et donc doué d'un potentiel illimité. Ces matériaux se développent aujourd'hui dans pratiquement tous les domaines et sont à l'origine de formidables challenges dans diverses réalisations de haute technologie.

En médecine, la demande de reconstruction squelettique personnalisée, spécifique à un patient et à un défaut, augmente dans le monde entier en raison des troubles musculo-squelettiques.

Afin d'améliorer les propriétés biologiques (Biocompatibilité ; Bioactivité) des substituts osseux phosphocalciques, l'une des méthodes consiste à modifier leur composition chimique pour se rapprocher de celle de la partie minérale de l'os.

De telles modifications peuvent affecter la chimie et la structure des phosphates de calcium et donc avoir une influence sur le comportement biologique du matériau. du vieillissement, des traumatismes, du cancer des os, des malformations congénitales et des blessures de guerre [1].

A cet égard, les options thérapeutiques actuelles comprennent le traitement de la douleur et l'intervention chirurgicale. Les greffes osseuses autologues sont considérées comme l'étalon-or et sont utilisées dans les chirurgies de reconstruction du squelette. Cependant, cette stratégie est " loin d'être idéale " en raison des multiples interventions chirurgicales douloureuses et des complications associées [2].

Les greffes osseuses artificielles ne présentent pas de complications au niveau du site donneur et apparaissent comme une alternative aux greffes autologues.

L'os et la dent humains sont des composites polymères-céramiques, composés d'hydroxyapatite (HAp), de céramique à base de phosphate tricalcique (TCP) et de fibres de collagène ; ces matériaux constituent également la phase inorganique majeure de ces tissus [3-4].

Ces types de matériaux sont donc utilisés pour construire des substituts osseux artificiels destinés à réparer des défauts à faible portance, tels que les défauts de l'os cranio-maxillo-facial et de l'os temporal.

Le substitut osseux possède ainsi des propriétés physicochimiques proches de celles de l'os ce qui favorise une meilleure intégration. L'utilisation de matériaux pulvérulents permet des applications variées allant de la mise en forme de matrices poreuses ou de granules à une utilisation en pâte pour l'injection dans des défauts osseux en passant par l'application comme vecteur de médicament [5].

De telles modifications peuvent affecter la chimie et la structure des phosphates de calcium et donc avoir une influence sur le comportement biologique du matériau.

L'objectif de ce travail de mémoire est d'élaborer un matériau composite (organique/inorganique) pour l'application orthopédiques et dentaire, sous forme de poudre et avec la plus grande homogénéité de répartition possible entre les deux phases.

Nous nous sommes donc attachés à synthétiser un nouveau composite hybride à base d'une hydroxyapatite co-dopée et d'amidon. ce mémoire est structuré en trois parties :

❖ La première partie est subdivisée en trois chapitres :

- Dans le premier chapitre, nous présentons une synthèse bibliographique qui englobe les généralités sur les hydroxyapatites.
- Le deuxième chapitre rassemble les généralités sur l'amidon.
- Le troisième chapitre regroupe les données essentielles sur le composite.

❖ La deuxième partie est consacrée à la présentation du matériel et protocoles expérimentaux ainsi que les méthodes de caractérisation et l'étude antimicrobienne.

❖ La troisième partie présente les résultats expérimentaux obtenus ainsi que leur discussion.

Enfin, ce mémoire s'achève par une conclusion générale qui regroupe les principaux résultats obtenus dans cette étude.

CHAPITRE I
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUYE

I.a LES HYDROXYAPATITES

I.a.1 Introduction

L'hydroxyapatite synthétique a été introduite pour la première fois au cours de la seconde guerre mondiale, dans la première moitié du vingtième siècle par **Barrett et al. [6]**.

l'HAp joue un rôle important dans le développement de nouveaux matériaux à une large applicabilité dans divers domaines, tels que l'ingénierie tissulaire de réparation, systèmes de délivrance des substances médicamenteuses, des gènes ou des protéines, la chromatographie, l'imagerie et diagnostic.

L'amélioration des propriétés de l'HAp est un domaine d'intérêt majeur pour les scientifiques du monde entier.

I.a.2 Généralités sur l'hydroxyapatite

Les hydroxyapatites sont des matériaux inorganiques sous forme de nano poudres très importantes en chimie et en biologie [7,8].

L'hydroxyapatite (HAp), de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, est l'apatite la plus connue [9] ; C'est un matériau inorganique naturellement dérivé de l'apatite de calcium proviennent des sources telles que les os, les coquillages et les coraux [10].

L'hydroxyapatite a une structure chimique et des propriétés similaires aux constituants inorganiques des os et des dents.

En 1920, **Albee et Morrison [11]** ont étudié l'influence des phosphates de calcium dans la stimulation de la régénération osseuse pour des défauts osseux chez le lapin. Ils ont constaté que les phosphates de calcium présentaient un potentiel prometteur en matière de formation osseuse. Cette découverte a ouvert la voie à d'autres chercheurs qui ont exploré et amélioré ce nouveau domaine de connaissances comme **Haldeman et Moore [12] et Huggins et al. [13]**.

Cependant, la réaction biologique à une céramique HA dépend fortement de sa composition chimique, de sa pureté de phase et de ses propriétés microstructurales (c'est-à-dire les rapports Ca/P, la cristallinité, la porosité, la taille des particules et la surface) [14].

Pour que l'hydroxyapatite soit considérée stœchiométrique, le rapport molaire doit être $\text{Ca/P} = 1.67$. Toutes les autres apatites pour lesquelles le rapport molaire $\text{Ca/P} < 1.67$ est déficitaire en calcium [7].

I.a.3 Structure de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite phosphocalcique (HAp) de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ appartient à la famille cristallographique des apatites de formule générale $(\text{Me})_{10}(\text{XO}_4)_6(\text{Y})_2$, composés isomorphes possédant la même structure hexagonale [8].

La structure cristallographique d'hydroxyapatite est en générale hexagonale (P63/m), de paramètres de maille : $a=b=9.432\text{Å}$ et $c=6.881\text{Å}$. Rarement, ou la structure cristallographique de HA est monoclinique (P21/b) [15].

La composition chimique de l'HAp est déterminée par le rapport atomique Ca/P : celui-ci est de 10/6 (1.67) pour une HAp stœchiométrique.

Le rapport Ca/P peut être déterminé par des dosages chimiques du calcium et du phosphore dans l'apatite [16].

Sa structure consiste en un empilement de groupements phosphate qui forment deux types de tunnels parallèles à l'axe c. Le premier coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Ces tunnels sont occupés par des ions calcium notés **Ca(I)**. Le second type de tunnel, dont l'axe coïncide avec l'axe sénaire hélicoïdal du réseau, est bordé par des atomes d'oxygène et les autres ions calcium, notés **Ca(II)** (figure a.1) [17].

- **Le tunnel de type I** de diamètre égal à environ $2,5\text{ Å}$ est occupé par des cations Me (MeI). Dans le cas de l'HA, il s'agit de CaI. Les sites de ces cations sont au nombre de quatre par maille. Ils sont placés sur les axes ternaires et sont entourés de neuf atomes d'oxygène [18].
- **Les tunnels de type II** ont pour leur part un diamètre plus grand, compris entre 3 et $3,5\text{ Å}$. Ils contiennent le reste des cations Me, soit six cations MeII par maille (CaII dans le cas de l'HAp). Ces tunnels présentent une symétrie CS et les cations de type II sont localisés en périphérie de celui-ci, groupés trois par trois aux niveaux $z = \frac{1}{4}$ et $z = \frac{3}{4}$ de la maille, ils forment des triangles équilatéraux décalés de 60° autour de l'axe sénaire hélicoïdal (axe c de la maille hexagonal).

Avec une coordinance égale à 7, ils sont entourés de six atomes d'oxygène des groupements tétraédriques XO_4 et du groupement anionique Y [18].

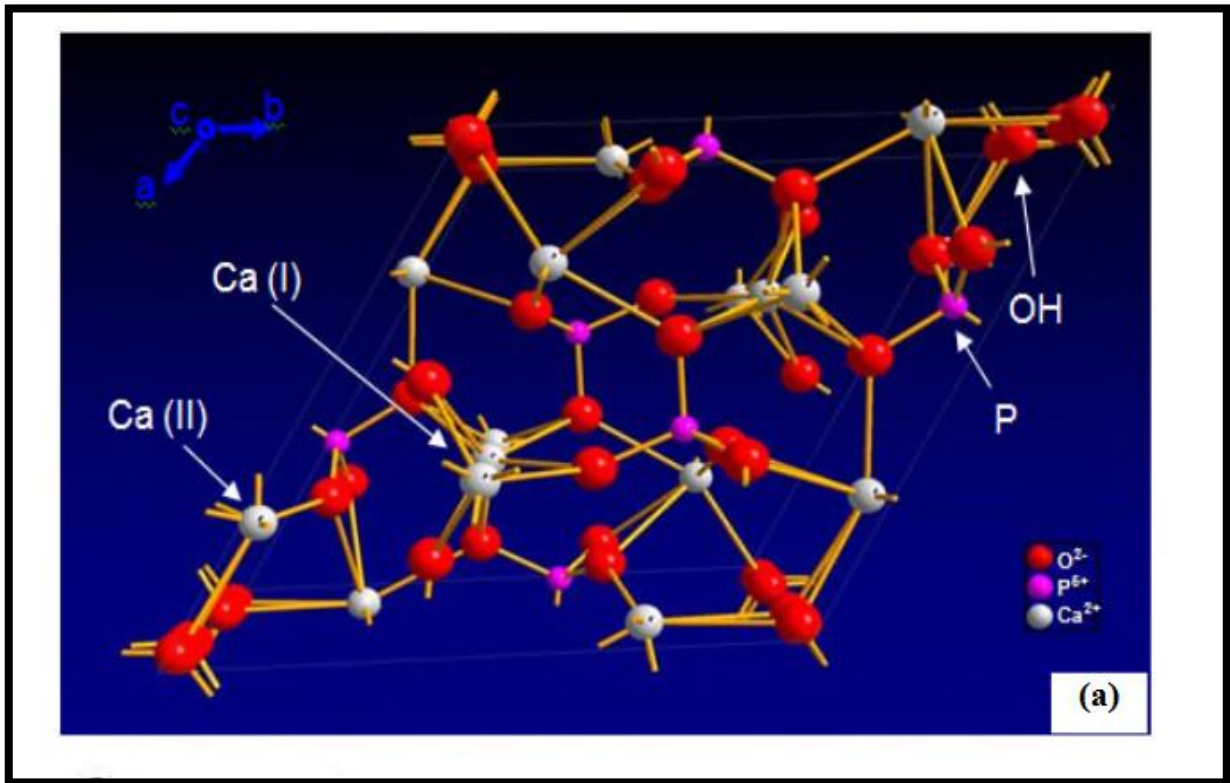


Figure a.1: Projection de la structure de HAp sur les plans (001) et (010) [17].

I.a.4 Hydroxyapatite naturelle

L'hydroxyapatite naturelle est généralement obtenue à partir de sources biologiques ou de déchets tels que les os de mammifères, les sources marines ou aquatiques, les coquillages, les plantes et les algues, et des sources minérales telles que le calcaire (tableau I.1).

Il a été démontré que l'HAp substituée par le calcium améliore l'ostéogénèse en augmentant la biorésorption[19].

Sources mammifères

Parmi les sources mammifères, l'extraction de HAp à partir d'os de bovins est fréquemment rapportée dans la littérature par rapport à d'autres sources telles que les chameaux, les chevaux et les porcs [20].

Malla et al.[21] ont utilisé la calcination pour extraire de l'HAp des os d'autruche. L'HAp extraite a été chauffée à 650 °C pendant 6 heures. Ils ont trouvé qu'il pourrait s'agir d'une bonne source d'HAp naturelle.

Odusote et al. ont extrait l'HAp par calcination à partir d'os de bovin en chauffant à 10 °C/min jusqu'à 750 °C pendant 6 heures. Les résultats ont montré une excellente stabilité car il n'a pas été absorbé dans le fluide corporel simulé ; le matériau pourrait donc être utilisé pour des applications orthopédiques [22].

Sources aquatiques ou marines

L'augmentation de la consommation de poisson dans le monde a entraîné une augmentation significative de la production des déchets tels que les écailles et les arêtes. La récupération des écailles et des arêtes de poisson peut extraire l'HAP et réduire les déchets solides dans les pêcheries [23].

Surya et al.[24] ont extrait l'hydroxyapatite par hydrolyse alcaline en chauffant l'arête de poisson *Sardinella longiceps* après traitement par une solution de NaOH, suivi de 5h d'agitation à 400 rpm. Ils ont trouvé que l'os de sardine à l'huile indienne démontre un bon potentiel pour le remplacement des os en raison de sa taille, de sa morphologie, de son groupe fonctionnel, de sa viabilité et de sa minéralisation. Les résultats de la XRD ont montré que la taille moyenne de particule est de 19,65 nm.

Deb et al. [25] ont utilisé l'écaille de *Labeorohita*, lavée à l'eau distillée et séchée au four pendant 12 heures à 40 °C après déprotéinisation avec une solution de NaOH, ils ont constaté que l'hydroxyapatite synthétisée présentait une grande stabilité thermique au-delà de 800 °C.

Sources de la coquille

Les coquilles des palourdes et des œufs sont riches en carbonate de calcium (CaCO_3), qui peut être converti en HAp. La coquille d'œuf contient 94% de CaCO_3 , qui peut être la source de calcium pour l'HAp. Ces coquilles sont riches en nature et sont généralement jetées [26].

Lala et al. [27] ont utilisé la calcination et l'hydrogène-phosphate disodique pour extraire l'hydroxyapatite de la coquille d'œuf afin d'étudier l'effet du temps de vieillissement sur les propriétés de l'hydroxyapatite, et ils ont trouvé que : l'hydroxyapatite vieillie 12 h présentait de meilleures propriétés que l'hydroxyapatite vieillie 24 h, 36 h et 48 h en termes de dégradation et de bioactivité. Un vieillissement de 12 heures a également produit un rapport Ca/P de 1,68, très proche du rapport Ca/P de l'os cortical humain.

Sultana et ses collaborateurs [28] ont synthétisé de l'hydroxyapatite à partir de coquilles d'œufs sans traitement thermique en utilisant une nouvelle méthode à l'état solide médiée par les UV. Ils ont observé que l'essai de viabilité cellulaire n'a révélé aucune cytotoxicité significative.

Ahmed et ses coéquipiers [29] ont montré que la coquille d'escargot est un matériau naturel, peu coûteux et biocompatible pour l'extraction de l'hydroxyapatite.

Tableau a-1. Processus et source de synthèse de HAp naturelle [30].

Hydroxyapatite naturelle $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$		
	Sources	Processus de synthèse
Mammifère	Os (bœuf, bovin, chameau, cheval, porc).	.Calcination .Hydrothermal .Combinaison des deux méthodes
Marine /aquatique	Os de poisson, écailles de poisson.	.Calcination .Hydrothermal .Combinaison des deux méthodes
Coquilles	Coquille de coquillage, coquille de mer, coquille d'œuf, coquille de palourde, coquille de moule.	.Précipitation Sol-Gel .Mécanochimique .Calcination .Hydrothermal .Combinaison des méthodes
Plantes et algues	Plante (tige, feuilles et fleurs), écorces de fruits, bois, algues.	.Irradiation aux micro-ondes .Pyrolyse .Hydrothermal .Précipitation chimique .Calcination .Combinaison des méthodes
Minéral	Calcaire	.Calcination+précipitation .Calcination+hydrothermal .Calcination+irradiation ultrasonique

I.a.5 Hydroxyapatites substituées

Grâce à leur structure particulière, les apatites admettent dans leur réseau cristallin un grand nombre d'éléments de substitution, avec des compositions très variables.

Selon les règles de substitution plusieurs types de substitution sont possibles, les exemples de substitutions possibles dans la structure de l'apatite sont présentés par le schéma de la **Figure I.2** [31].

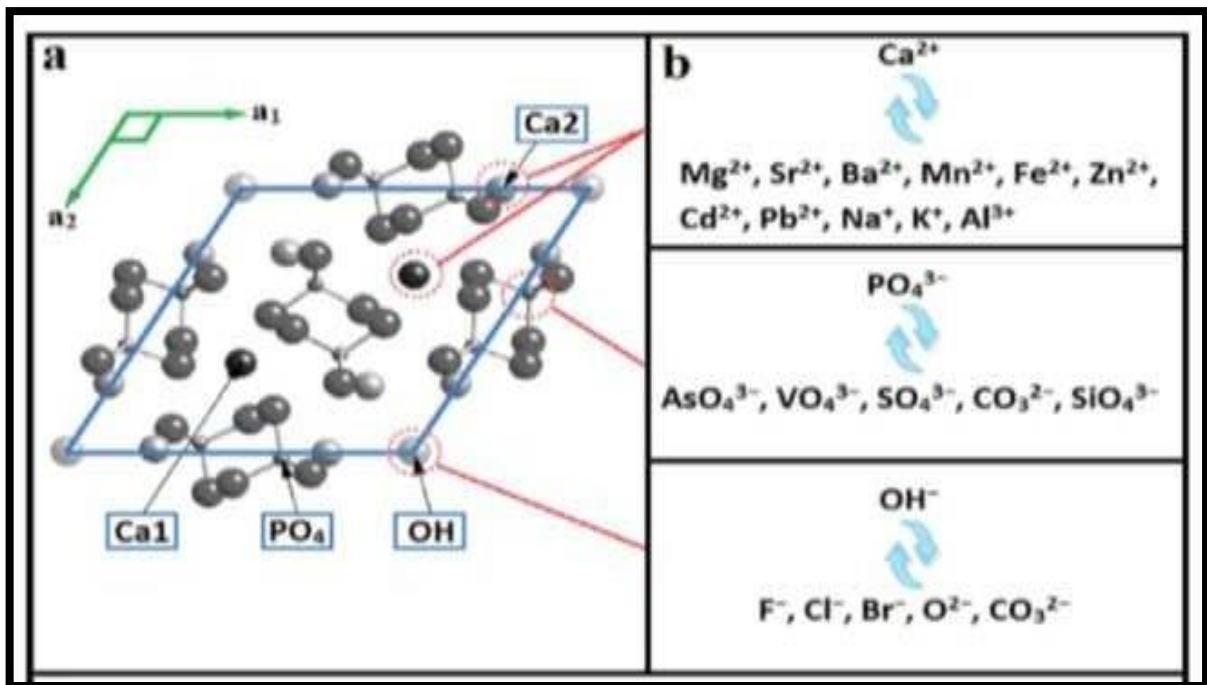


Figure a.2:Exemples de substitutions dans la structure apatitique [31].

A l'échelle atomique, les substitutions ioniques modifient les paramètres de maille de la structure. A plus grande échelle, les substitutions conduisent à une baisse de cristallinité, une diminution de la stabilité thermique, ainsi qu'une augmentation de la solubilité.

La substitution des ions OH^- par les ions F^- ou encore des ions Ca^{2+} par les ions Pb^{2+} déroge cependant à cette règle. En effet, ces substitutions tendent à réduire la solubilité de l'apatite[32].

La substitution avec Mg et Zn

Les propriétés des hydroxyapatites peuvent être améliorées en incorporant des ions naturellement présents dans les os tels que le zinc, le strontium ou même le magnésium dans les HAps.

Le dopage au zinc a des propriétés intéressantes en ce qui concerne le matériau, il modifie les processus de dissolution/précipitation et accélère la dégradation de l'hydroxyapatite [33]. Cependant, une concentration excessive de zinc réduira la solubilité de l'apatite [34].

Bien que le rôle du magnésium dans les os soit peu connu, plusieurs auteurs se sont concentrés sur les effets du magnésium sur l'ostéoconduction et les processus de dissolution / ré-précipitation.

Shepherd et Best [35,36] ont montré que la substitution des ions Ca^{2+} par ceux de Sr^{2+} ou Mg^{2+} augmente la solubilité de l'hydroxyapatite et facilite la libération de calcium et de phosphore en milieu physiologique.

Bigi et al. [37] se sont intéressés à la préparation de substrats HAp-Zn en utilisant différentes concentrations de Zn dans des solutions allant de 0 à 100%.

Ils montrent également que la teneur en magnésium de la phase apatite cristalline unique n'était qu'entre 0 et 30% en poids. Ces auteurs ont rapporté que :

- Les ions Mg ont un effet similaire au Zn et inhibent la cristallisation des HAp.
- Lorsque la concentration en Mg est de 35 à 50% (poids), la structure est complètement amorphe et d'autres types de phases $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ et $\text{NH}_4\text{MgPO}_4\text{H}_2\text{O}$ apparaissent.
- Lorsque la concentration en Mg augmente, la taille des cristaux, la cristallinité et le rapport $(\text{Ca} + \text{Mg})/\text{P}$ diminuent [38].

I.a.6 Méthodes de synthèses de l'hydroxyapatite

Plusieurs techniques de synthèse d'hydroxyapatite ont été développées. Parmi elles, nous citons :

La méthode sèche

Dans cette méthode, la réaction de synthèse de l'hydroxyapatite est réalisée à l'état solide. Cette méthode permet d'élaborer des apatites phosphatées à des températures très élevées, comprises entre 700 et 1000°C [39;40].

Donc son principe repose sur la calcination des réactifs solides en quantités stœchiométriques [41].

La méthode humide

Les poudres de HAp produites par des procédés à sec courants sont généralement grandes et de forme irrégulière. Par conséquent, la méthode humide a été classiquement appliquée pour fabriquer des particules HAp de structure nanométrique avec une morphologie régulière. La chimie humide a l'avantage de pouvoir contrôler la morphologie et la taille moyenne des poudres.

Synthèse hydrothermale

Le principe de la synthèse hydrothermale consiste à chauffer au-dessus 100°C un mélange de réactifs en solution sous une pression suffisamment haute ($>1\text{atm}$) de telle sorte à permettre une élévation de la température tout en empêchant l'eau de s'évaporer. Cette méthode conduit à l'obtention de poudres d'HAp fines, homogènes et bien cristallisées[42].

Méthode de Co-précipitation

La Co-précipitation est la méthode la plus simple et la plus fréquemment utilisée pour la préparation de HAp. Ce procédé chimique consiste à faire réagir une source de PO_4^{3-} avec une source de calcium en présence d'autres additifs (par exemple, une base ou un acide) [43; 44].

Les conditions de la méthode de Co-précipitation sont variables, mais en général, ce procédé est habituellement réalisé à des valeurs de pH allant de 3 à 12 et à des températures allant de la température ambiante à la température d'ébullition de l'eau.

Méthode sol-gel

L'approche sol-gel est une méthode efficace pour la synthèse de l'HAp, en raison de la possibilité d'un contrôle strict des paramètres du processus. Les HAp synthétisés par le procédé sol-gel sont efficaces pour améliorer le contact et la stabilité aux interfaces osseuses artificielles / naturelles dans l'environnement in vitro et in vivo[45].

Méthode Sonochimique

L'approche sonochimique est basée sur des réactions activées par un rayonnement ultrasonore intense [46]. Cette méthode donne invariablement des produits de taille nanométrique et permet un contrôle parfait de la morphologie, de la porosité et de la taille [47].

I.a.7 Propriétés de l'hydroxyapatite

Propriétés physico-chimiques

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 [48].

Parmi les facteurs qui influent sur la stabilité des apatites, nous citons en particulier la température, la pression et la composition chimique [49].

L'hydroxyapatite présente des propriétés importantes ayant une utilité dans le domaine de rétention des métaux lourds et autres domaines d'application telle que la catalyse biomédicale.

a-Stabilité chimique

L'hydroxyapatite possède une stabilité chimique très importante, en milieux 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 [50].

b-Stabilité thermique

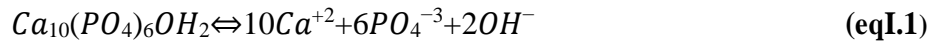
La caractéristique principale de l'hydroxyapatite soit sa bonne stabilité thermique et chimique. En fait, le HAp maintient sa stabilité dans une large gamme de pH et de température .

Il existe certains facteurs qui influencent la stabilité de HAp et dont celui-ci est intrinsèquement dépendant. Parmi ces facteurs la stœchiométrie de l'apatite ; il a été rapporté qu'elle joue un rôle majeur dans la stabilité de l'apatite.

En fait, des recherches ont montré que l'apatite avec un rapport Ca/P = 1,68 peut atteindre des températures allant jusqu'à 1450 °C sans se décomposer sur une période de 3h, ce qui fait de la stœchiométrie un critère très recherché en raison de la stabilité qu'elle procure à des températures élevées [51].

c. Solubilité des HAPs

L'équilibre de solubilité des HAPs s'écrit selon l'équation suivante:



Cet équilibre est régi par une constante de dissolution-précipitation Kdp , appelée produit de solubilité, défini comme suit:

$$Kdp = [Ca^{+2}]^{10} [PO_4^{-3}]^6 [OH]^{-2} \quad (\text{eqI.2})$$

La solubilité des HAPs dépend de la composition chimique initiale et de l'environnement des ions constitutifs (pH, température, ions en solutions, cristallinité...).

Notons par exemple que la présence des carbonates dans les HAPs entraîne l'augmentation de sa solubilité tandis que la présence de fluorures la diminue .

Par ailleurs, la solubilité des hydroxyapatites diminue lorsque le pH ou la température de précipitation augmente [52].

d. Les propriétés mécaniques

La connaissance des propriétés mécaniques d'hydroxyapatite est très nécessaire pour les différentes applications(tableau a.2) .

Tableau a.2 Propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite [53, 54].

Propriétés	Valeurs typiques
Densité (gcm^{-3})	3,15
Module de Young (GPa)	85-90
Dureté Knoop (MPa)	3450
Résistance à la traction (MPam^{-2})	120
Coefficient de Poisson	0,3
Dilatation thermique	11
Point de fusion ($^{\circ}\text{C}$)	1660
Chaleurs spécifique ($\text{cal g}^{-1}\text{K}^{-1}$)	0,15
Conductivité thermique ($\text{W cm}^{-1}\text{K}^{-1}$)	0,01
Résistance à la rupture ($\text{MPam}^{1/2}$)	<1

I.a.8 Domaine d'application de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite joue un rôle important dans divers domaines. Parmi ces applications ; nous citons :

a) Le domaine biologique et médical

L'hydroxyapatite possède de très bonnes propriétés de biocompatibilité et de protéines car c'est un constituant minéral principal des os et de l'émail dentaire. Elle est utilisée dans la reconstitution osseuse tel que la chirurgie orthopédique pour le recouvrement des implants

métalliques orthopédiques (prothèses complètes de hanches et de genoux) ; dans le domaine maxillo-facial et la chirurgie dentaire [55, 56].

Arjak et Susmita ont fabriqué des greffons osseux à partir d'hydroxyapatite-amidon fonctionnalisés au Zn^{2+} . Ces greffons antibactériens et cytocompatibles ont montré une stabilité in vitro prometteuse pour des applications orthopédiques et dentaires [57]

b) Le domaine industriel, environnemental, archéologique et climato-paléontologique

➤ La surface de l'hydroxyapatite présente une grande capacité d'adsorption, cette propriété permet l'élimination de métaux lourds tels que: Pb, Cd, Sr, Zn, Cr, Ni,...à partir de solution aqueuse ou des sols contaminés [58,59].

➤ Les HAp trouvent des applications dans le domaine de catalyse hétérogène. Elles sont utilisées dans les réactions chimiques de déshydrogénation, déshydratation des alcools primaires ou du méthane sous action d'un métal (ruthénium ou nickel) [57, 58,59]. On les retrouve aussi dans les procédés de séparation, par chromatographie, des protéines et autres biomolécules grâce aux groupements de surface (calcium et phosphates) qui confèrent au matériau la possibilité de séparation du mélange complexe [60, 61].

I.b Amidon

I.b.1 Introduction

L'amidon est une molécule du polysaccharide, naturelle, renouvelable. Il est largement distribué sous forme de minuscules granules comme principal hydrate de carbone de réserve dans les tiges, les racines, les grains et les fruits de toutes les formes de plantes à feuilles vertes.

Il se trouve dans les industries alimentaires de multiples fonctions comme épaississant, gélifiant, liant sous sa forme d'empois d'amidon granulaire.

Sous forme hydrolysée, l'amidon est utilisé comme matière sucrante, liante ; il fait partie des additifs alimentaires biodégradables, peu coûteux et disponibles en abondance.

I.b.2 Généralités sur l'amidon

L'amidon est un polysaccharide d'origine végétale qui constitue la principale réserve glucidique des plantes supérieures. Il représente une fraction pondérale importante dans un grand nombre de matière première agricole telle que les céréales (30 à 70 %), les tubercules (60 à 90 %) et les légumineuses (25 à 50 %). L'amidon est la principale source d'énergie dans l'alimentation animale et humaine. La moitié de la production industrielle mondiale de l'amidon est destinée à l'alimentation humaine [62].

L'amidon est la substance organique de réserve énergétique principale des végétaux [63]. Il est présent dans tous les organes végétaux où il se concentre préférentiellement:

- Dans les graines de céréales(ex.:blé,avoine,maïs) et de légumineuses (ex.:pois, fèves).
- Dans les fruits (ex. bananes). Dans les parties souterraines (ex. : pommes de terre, rhizomes du manioc etc.). Bien que l'amidon soit présent dans tous les organismes végétaux supérieurs, il n'y a que quelques plantes qui soient vraiment cultivés pour la production de ce composé à l'échelle industrielle. Le maïs, la pomme de terre et le blé sont les principales plantes utilisées pour la production des 35 millions de tonnes d'amidon natif consommés mondialement [64].

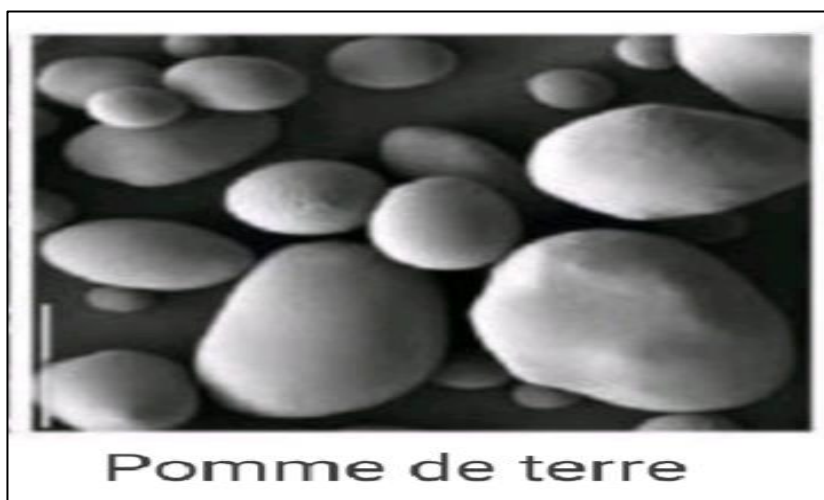


Figure I.b : Forme des granules d'amidon de pomme de terre .(Image de MEB grossissement×280)[65].

I.b.3 Principales composantes et différentes caractéristiques de l'amidon de pomme de terre

L'amidon se compose de (lipides, protéines, minéraux) sont présents en quantités variables d'origine botanique, obtenu par extraction. Le tableau II.1 présente quelque caractéristiques de l'amidon de maïs.

Tableau I-b:Caractéristiques et composantes de l'amidon de pomme de terre [66].

Origine Botanique	Forme du grain d'amidon	Diamètre (µm)	Humidité à 66%HR* Et 20 °C	Amylose (%)	Amylopectine (%)
Pomme de terre	Ellipsoïdale	15 – 100	18	23	77

I.b.4 Composition chimique de l'amidon de pomme de terre

L'amidon est constitué majoritairement d'une fraction glucidique (98 à 99%) et d'une fraction non glucidique mineure (1 à 2%). Cette dernière, malgré sa présence en faible quantité, ne doit pas être négligée, car elle modifie les propriétés fonctionnelles, en particulier la présence des lipides.

L'amidon est composé de deux polymères de structure primaire différente : l'amylose, molécule essentiellement linéaire et l'amylopectine, molécule ramifiée [67].

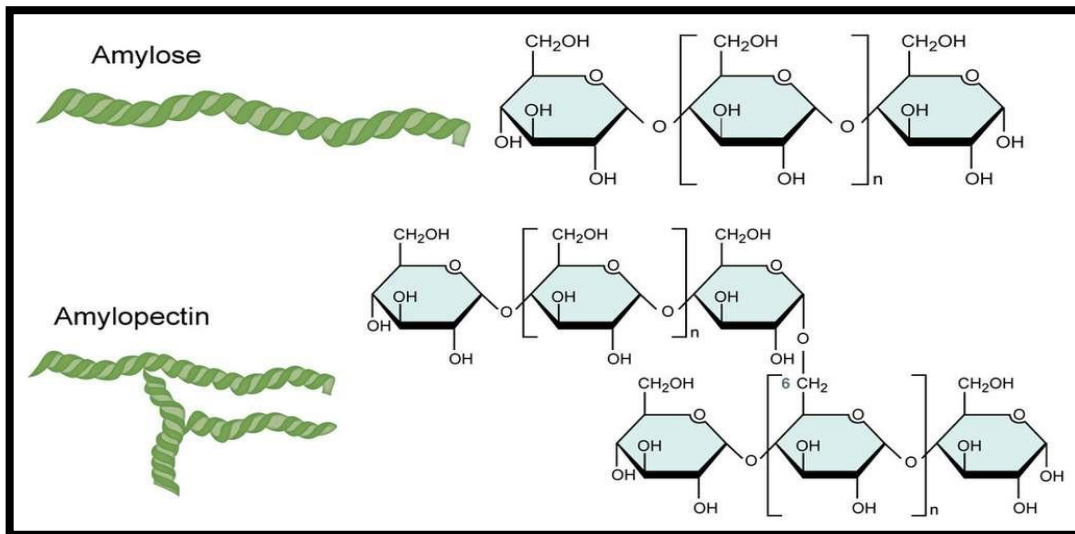


Figure b. 2 : Structure de l'amidon

I.b.5 Propriétés physico-chimiques de l'amidon

a-Propriétés physiques :

L'amidon a, comme tout produit, des propriétés physiques qui lui sont propres. Plusieurs facteurs entrent en jeu [68] :

- **Influence de la température :** l'amidon est insoluble dans l'eau. Il forme, en revanche à chaud (70°C) une solution colloïdale qui épaisse en donnant un gel communément appelé empois.
- **Température de gélification :** La gélification commence graduellement à partir de 50 °C, elle est effective à une température dépendante de l'agitation moléculaire, de la grosseur des grains, de la nature de l'amidon, de l'eau employée et de la concentration en amidon.
- **Effet stabilisant :** l'épaississement ayant lieu à une température inférieure à celle de la coagulation du jaune d'œuf, les crèmes aux œufs contenant de l'amidon peuvent être portées à ébullition [68].

b-Propriétés chimiques :

Les amidons sont influencés par trois types d'action : thermique, chimique et enzymatique [68].

- **ction thermique:** elle change la couleur et le goût de l'amidon par dextrinisation.

- **Action chimique et enzymatique** : les acides entraînent une hydrolyse partielle de l'amidon qui conduit à la formation de dextrans.

L'amidon peut subir aussi l'action d'enzymes comme des enzymes végétales, ou animales (amylase) ou microbiennes [68].

I.b.6 Propriétés hygrothermiques

L'amidon natif ne trouverait que peu d'applications dans l'industrie si on n'utilisait pas des traitements hygrothermiques ou thermomécaniques permettant de détruire sa structure granulaire [69].

a-Lagélatinisation– L'empesage

Lorsque les grains d'amidon sont chauffés à une température suffisante en présence d'un excès d'eau, l'eau pénètre dans les grains et entraîne un gonflement de ceux-ci (il s'agit de la gélatinisation) [70,71].

Lorsque le chauffage se prolonge, l'amylose amorphe se solubilise dans le milieu. Les petites molécules d'amylose sont libérées plus facilement tandis que des températures pouvant atteindre 90 °C sont nécessaires pour avoir une dispersion totale.

La température à laquelle débute la dispersion des amyloses dépend de l'origine botanique. Pendant cette dispersion, une perte de cristallinité au sein du grain, appelée empesage, se produit. L'état final est appelé empois d'amidon. L'obtention d'empois d'amidon est donc une déstructuration irréversible du grain conduisant à une solution comprenant des granules gonflés et des macromolécules solubilisées.

I.b.7 Utilisation de l'amidon dans l'industrie

L'amidon est utilisé industriellement dans plusieurs applications et sous plusieurs formes. Il peut être utilisé à l'état naturel, sous forme de poudre, en film, cuit en milieu aqueux et chimiquement modifier ou non [72].

- **Industrie pharmaceutique**

L'amidon natif et modifié trouve son importance dans plusieurs applications pharmaceutiques. Beaucoup de comprimés médicaux ne contiennent qu'une très faible dose de principe actif, afin de les rendre suffisamment gros pour être manipulés facilement. Le principe actif est adsorbé (ou mélangé) sur une quantité relativement importante d'un agent de remplissage qui est souvent l'amidon. Cet amidon joue également le rôle de liant, de désintégrant et de lubrifiant dans ces comprimés [72].

Des composés dérivés d'amidon modifié sont aussi utilisés dans les traitements des ulcères gastriques (sulfate

d'amylose) et comme agent antibactérien (complexe iode-amylose) [73].

- **Industrie alimentaire**

L'amidon est très utilisé comme épaississant alimentaire tant au plan domestique qu'industriel. En effet, son pouvoir de gélification entraîne une augmentation de la viscosité du milieu [74,75].

- **Industrie des pâtes et papier**

L'amidon modifié est utilisé sous forme gélatinisée ou cuite pour atteindre les performances voulues dans l'industrie des pâtes et papiers. Les familles d'amidons modifiés qui sont utilisées sont les suivantes : dérivés d'amidon estérifiés; dérivés d'amidon acétifiés, amidons cationiques et amidons oxydés [76;77].

- **Industrie des textiles**

L'amidon oxydé se disperse en milieu aqueux plutôt que de gonfler et pénètre mieux entre les fibres que ne le fait l'amidon natif. Étant transparent, il permet de donner aux textiles un aspect plus blanc[77].

- **Industrie des adhésifs**

Une gamme beaucoup plus importante d'adhésifs à base d'amidon modifiés est fabriquée industriellement, depuis les gommes mouillables (ex. pour les enveloppes) et celles résistantes à l'eau, jusqu'aux colles à bois. Par exemple, les dextrines utilisées dans les synthèses d'adhésifs sont obtenues par hydrolyse acide de l'amidon cuit à sec avec l'acide chlorhydrique. Les cuissons courtes donnent des dextrines "blanches" et les cuissons plus longues des dextrines "jaunes" [77].

I.c Composite

I.c.1 Généralités sur les nanocomposites

D'une manière générale, on appelle un matériau composite, tout matériau constitué de plusieurs composants élémentaires, dont l'association confère un ensemble de propriétés qu'aucun des composants, pris séparément, ne possède [78].

Les nanocomposites constituent une classe de matériaux à part entière bien qu'ils aient la même composition que les composites classiques, notamment concernant la nature de la matrice, leur différence réside dans la taille des composants (matrice ou renfort) et dans le fait que certaines propriétés spécifiques n'apparaissent qu'à l'échelle du nanomètre [79].

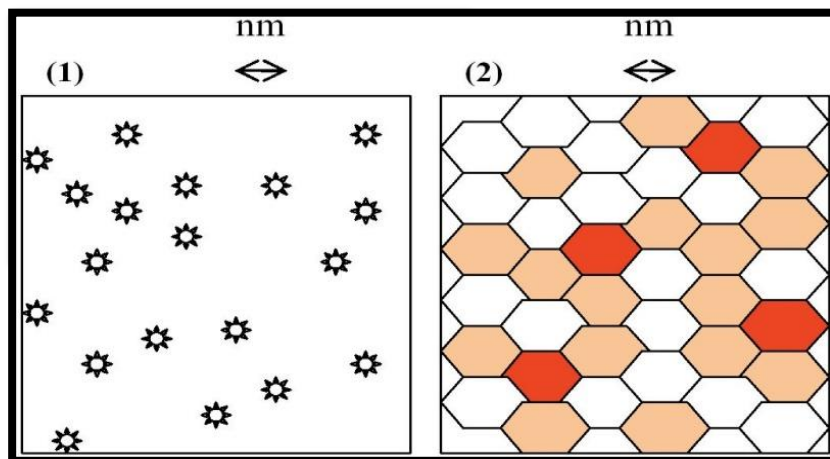


Figure c.1 : Morphologie d'un composite :

(1) Composite à renforts de dimension inférieure ou égale au nanomètre.

(2) Matériaux résultant de mélanges multiphasique, avec une répartition en tailles caractéristiques, voisine de la centaine de nanomètres, voire inférieure [80].

I.c.2 Types de nano composites

Il existe différents types de nanocomposites. Nous citons les plus connus :

a. **Microcomposite** :

Le polymère n'est pas intercalé entre les couches de silice. Les phases sont séparées et on retrouve les propriétés des microcomposites (figure c.1).

b. Nanocomposite intercalé :

Une (ou parfois plusieurs) chaîne polymère est intercalée entre les couches de silice. Le résultat est une structure relativement ordonnée avec une alternance de couches polymères et inorganiques (figure c.2).

c. Nanocomposite exfolié :

Ce sont des structures délaminées où les couches de silice sont complètement et uniformément réparties dans la matrice polymère.

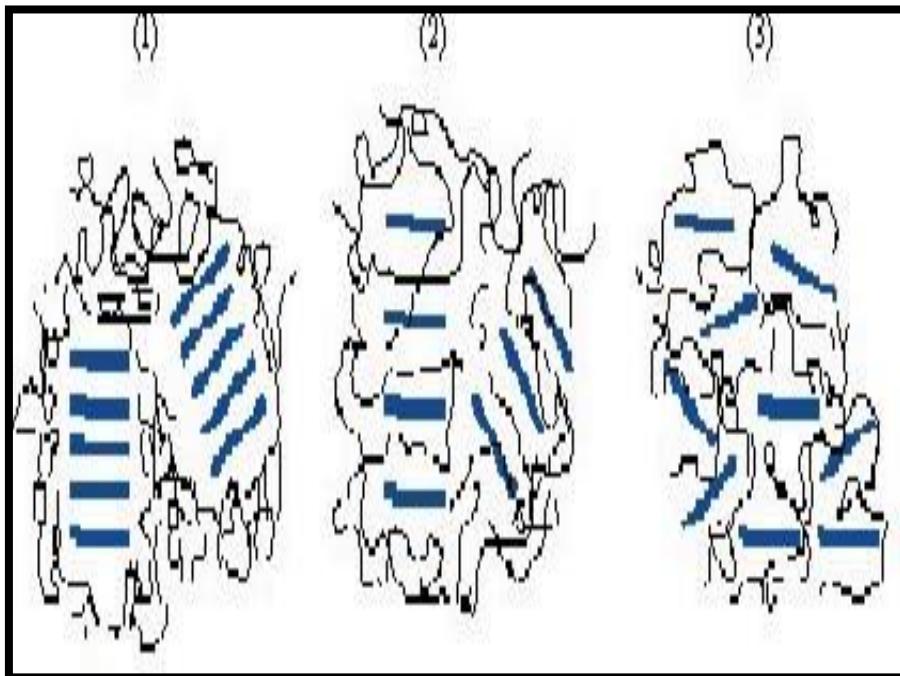


Figure c.2: Microcomposite (1), composite intercalé(2) et composite exfolié(3)[81].

I.b.3 Propriétés des nano composites

1) Propriétés thermiques

Les principales améliorations recherchées par l'incorporation de charges inorganiques, telle que les argiles ou les oxydes, à des polymères sont la stabilité thermique et la tenue au feu.

La stabilité thermique est généralement évaluée par analyse thermogravimétrique (ATG) sous atmosphère inerte ou oxydante. De manière générale, la température de dégradation des polymères est augmentée après l'incorporation de silicates lamellaires exfoliés [82,83], ce qui valorise ces polymères et permet leur utilisation à de plus hautes températures.

2) Propriétés barrières

L'incorporation de charges inorganiques aux polymères est apparue prometteuse en matière de propriétés barrières aux gaz et aux fluides.

Les premières études montrant l'intérêt de réaliser des composites afin d'augmenter leurs propriétés barrières ont été réalisées par **Yano et al** [84,85].

L'introduction de quelque pourcent en poids de nanocharges lamellaires dans une matrice polyamide a diminué fortement la perméabilité à l'oxygène, à l'hydrogène et la vapeur d'eau.

I.c.4 Application des nano composites

Les composites peuvent offrir de nombreux avantages tels que les applications prometteuses comprennent à la fois la génération de nouveaux matériaux et l'amélioration des performances de dispositifs connus tels que les piles à combustible, les capteurs et les revêtements, l'amélioration du module, la résistance à la flexion, la déformation à la chaleur et les propriétés de barrière et de température.

Autres applications industrielles des nanocomposites hybride organique/inorganique telles que l'optoélectronique, le développement de systèmes catalytiques, en pharmacie pour la vectorisation de médicaments et dans le domaine médical pour l'élaboration de revêtements antimicrobiens [86].

L'hydroxyapatite (HA_p) suscite l'intérêt en raison de sa ressemblance avec la phase inorganique de l'os. La compréhension de la biominéralisation [83, 84] devrait conduire à la préparation des composites ayant des propriétés mécaniques, supérieures à celles des os et des dents à partir des l'hydroxyapatites (HA_p) brute, dopée et co-dopée.

Kohei Okuda et al.[87] Ont préparé des composites organiques inorganiques par coprécipitation d'amidon de tapioca et d'hydroxyapatite (HA_p) avec des rapports pondéraux polymère-hydroxyapatite de 70/30, 50/50 et 30/70 .

Ils ont montré que la coprécipitation des ions de calcium et de phosphate en présence de l'amidon de tapioca permettait d'obtenir une poudre hybride organique-inorganique ; ou la quasi-totalité de l'amidon ajouté, de l'ion de calcium ,de l'ion de phosphate ,tant pour l'amidon de tapioca phosphorylé.

Les études DRX ont démontré que la taille des cristaux de HAP diminuait de façon spectaculaire lorsque la concentration d'amidon est de 0,011 g/L à 0,027 g/L, montrant que l'amidon de tapioca a un fort effet inhibiteur sur la cristallisation à une concentration élevée.

C.Y.Beh et al. [88] ont préparé des composites poreux par la technique SCPL(solvent casting/particulaire) avec des proportions variables (30-90 % en poids) à base d'amidon de maïs (Cs) et de nanopoudre d'hydroxyapatite (HAp) .

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II.1 Introduction

Le présent chapitre est consacré à la description de l'ensemble des protocoles expérimentaux et des expériences effectuées.

Celles-ci concernent:

- Synthèse d'hydroxyapatite : Co-dopée HAp-Zn/Mg.
- Synthèse d'un composite (50% amidon,50%HAp).
- Différentes techniques d'analyse pour caractériser le composite.
- Tests invitro par emploi de composite élaboré afin de comprendre l'effet possible sur l'activité antimicrobienne.

II.2 Synthèse des HAp :

La poudre HAp Co-dopée au Zn/Mg a été préparée selon le procédé de précipitation en utilisant le protocole suivant [89]:

➤ produits utilisés :

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99% de pureté ; $M_m = 147.02 \text{ g/mol}$).
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99% de pureté ; $M_m = 141.96 \text{ g/mol}$).
- ZnCl_2 (98% , $M_m = 136.29 \text{ g/mol}$).
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99% de pureté , $M_m = 203,31 \text{ g/mol}$).

➤ **Tableau II.1:** Verrerie et appareillage utilisé.

Verrerie	Appareillage
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bécher : 500 mL, 50 mL. ▪ Burette. ▪ Fiole jaugée : 100mL, 1L. ▪ Fiole à vide. ▪ Éprouvette graduée:100mL. ▪ Büchner. ▪ Mortieret pilon. ▪ Cristallisoir. ▪ Spatule. ▪ Creuset. ▪ Papier filtre de Labs Man. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ plaque chauffante agitatrice . ▪ pH mètre. ▪ Pompe à vide . ▪ Etuve. ▪ Four. ▪ Balance électronique de précision à 4 chiffres

Protocole:

Pour la composition de l'hydroxyapatite co-dopée en Zn et Mg est calculé comme suit: $r = 100 [\text{Zn ou Mg}] / [\text{Ca} + (\text{Zn ou Mg})]$ (% molaire), avec un rapport molaire : $[\text{M}^{2+}]/[\text{PO}^{3-}] = 1.667 + M = \text{Ca} + \text{Zn} + \text{Mg}$.

- Une solution de 100 mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ est introduite dans un bécher contenant 100mL d'une solution de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et une solution de ZnCl_2 et du MgCl_2 (sels de dopage) avec des quantités différentes dépend de la préparation désirée (HAp dopée ou Co-dopée).(la photo "a")
- La solution a été ajustée jusqu'à $\text{pH} = 9$ par l'addition progressive d'une solution aqueuse de NaOH (1M) à l'aide d'une pipette de 5mL.(la photo "b")
- Le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation à 250trs/min et chauffage à 90°C pendant 5heures. La température du mélange est contrôlée grâce à un thermomètre.
- A la fin de la réaction, les suspensions obtenues sont refroidies à l'air libre à température ambiante.(la photo "c")
- Mesure et vérification de pH des différents rinçages recueillis (figure II.1).
- Les précipités obtenus sont lavés plusieurs fois (jusqu'à 5 fois) avec de l'eau désionisée jusqu'à ce que le pH du surnageant atteigne la neutralité ($\text{pH}=7.0$).
- Le produit solide obtenu (HAp) est séché à 105°C pendant 24heures, puis calciné dans un four à moufle (Naberthem) à 900°C pendant 1 heure.(la photo "d")
- Le précipité (HAp) obtenu est broyé sous forme de poudre fine uniforme et pesé (à raison de 6 à 7g par échantillon).(la photo "e")
- Ensuite conservés dans des flacons sombres pour l'identification et l'application.(la photo "f")

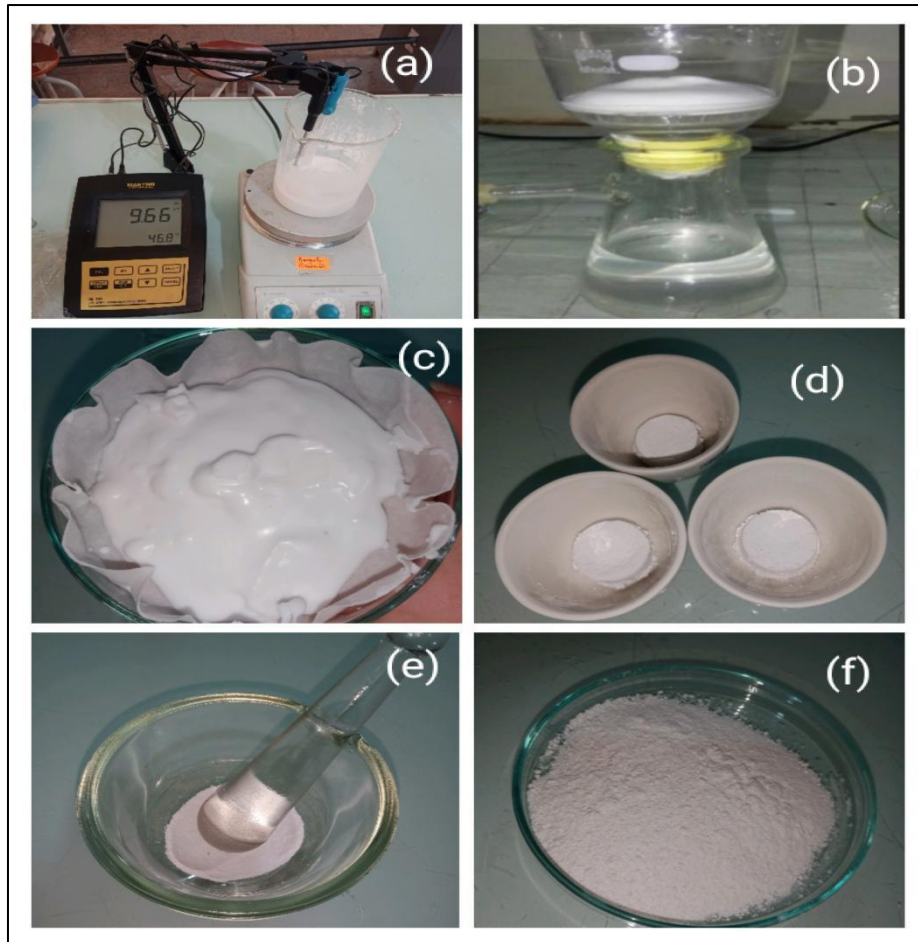


Figure II.1: Etapes de préparation de l'hydroxyapatite. (a) Suivi du mélange réactionnel par pH-métrie....., (b) Filtration sous vide du produit ; (c) alcination du produit....., (d) broyage....., (e) poudre fine de HAp.

II.3 Synthèse de composite (50% HAp, 50% amidon):

Le composite a été synthétisé selon le protocole de lixiviation (l'extraction) [88] :

➤ **Les produits utilisés :**

- Amidon .
- La poudre HApco-dopées au Zn/Mg.
- Les particules de chlorure de sodium (NaCl) , $M_m=58,44\text{g/mol}$.

Le protocole ;

Le composite a été préparé à partir les étapes suivantes :

- L'amidon a été dissous dans 50 ml de l'eau distillée pour obtenir une solution d'amidon. (la photo "a")

- la solution d'amidon a été traitée par la chaleur (dans un bain marie) et sous agitation pendant 37 minutes.
- La nanopoudre d'hydroxyapatite a été dispersée uniformément dans la solution d'amidon a T=58°C.
- Après 1h:30 mn d'agitation on a ajouté le NaCl ; les particules de chlorure de sodium (NaCl) ont été broyées avant d'être appliquées dans la solution .
- Après 15 mn de l'ajout de NaCl (relargage), la solution devienne une pate .(la photo "b")
- Le composite a été coulé dans une boîte de pétri et refroidi à 2-10 °C pendant 20-24 h.
- le composite a été rincé plusieurs fois avec l'eau distillée.
- Enfin, le composite a été séché (80-85 °C pendant 20-24 h) ; puis broyé et conservé dans des flacons .(la photo "c")

Tableau II.2 :Verrerie de laboratoire .

Verrerie	Appareillage
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bécher : 50mL. ▪ Éprouvette graduée: 50mL ▪ Spatule. ▪ Cristallisoir. ▪ Mortieret pilon ▪ Fiole ▪ Creuset ▪ entonnoir. ▪ Papierfiltre deLabs Man ▪ Boîte de Pétri. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ plaque chauffante agitatrice ▪ pHmètre ▪ Balance électronique de précision à 4 chiffres ▪ Etuve . ▪ Pompe à vide ▪ réfrigérateur

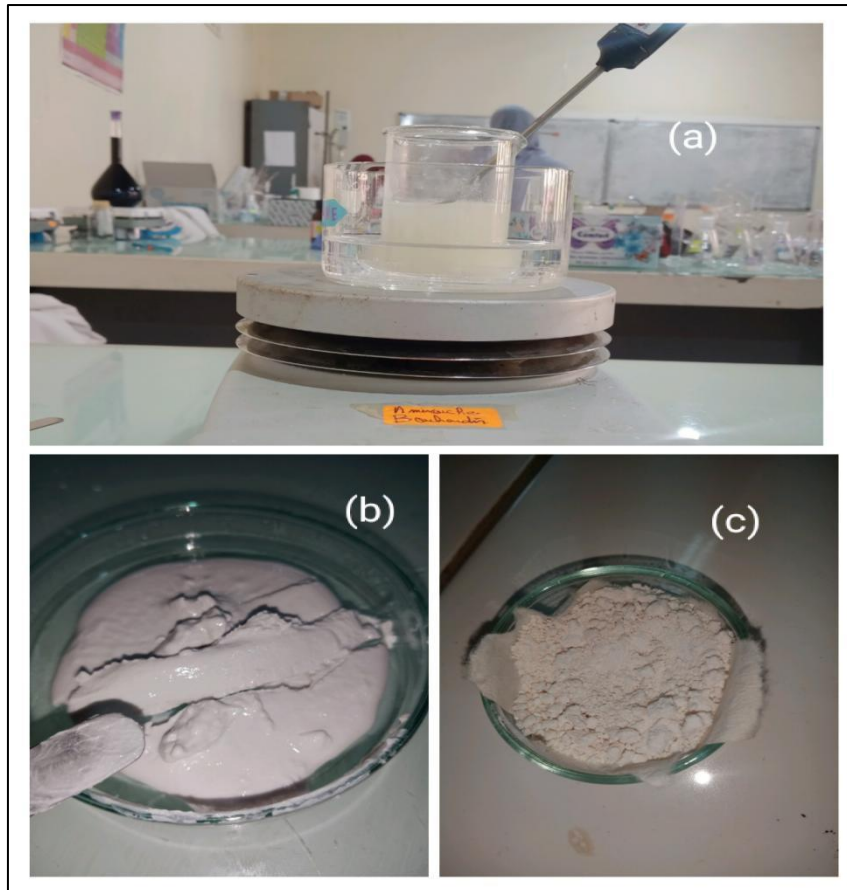


Figure II.2: Etapes du procédé de composite

II.4 Caractérisation de composite :

a) Diffraction des rayons X (DRX):

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

Le composite ont été analysé par un diffractomètre de type D8 Advance Eco (Bruker), avec un rayonnement Cu. K_{α} ($= 1.5418\text{\AA}$) généré à 40kV et 25 mA.

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

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

b) Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) :

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

Les conditions suivantes ont été utilisées dans l'analyse IRTF:

- Spectrophotomètre Shimadzu (Japon) FTIR-4100 (plage de 400 à 4000 cm^{-1} nombre de balayages 32; résolution de 4 cm^{-1}).
- La préparation de l'échantillon consistait à mélanger 1 mg de composite avec 250 mg de KBr. Ces mélanges sont convertis en pastilles transparentes à une pression de 8 tonnes.

c) Microscopie électronique à balayage (MEB) :

La morphologie et la microstructure de composite ont été observées à l'aide d'un MEB Thermo-Fisher Quanta 250 (tension d'accélération de 15 à 20kV; avec une distance de 10 à 10.2mm) .

Tests antimicrobiens par la méthode de diffusion de disque sur gélose :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des échantillons synthétisés par l'aromatogramme a été réalisée par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé en vue de l'application dans le domaine médicale.

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

• Souches microbiennes

Les supports bactériens sont constitués de cinq souches bactériennes de références sous forme de lots "American Type Culture Collection ATCC" et "Collection de l'institut de Pasteur Paris".

Le support fongique est constitué de deux souches fongiques de références sous forme de lots "American Type Culture Collection ATCC" .

Tableau II. 3 : Souches bactériennes et fongiques :

Souches bactériennes	Souches fongique
<p>Escherichia coli ATCC 8739.</p> <p>Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027.</p> <p>Salmonelle aboney NCTC 6017.</p> <p>Bacillus subtilis ATCC 6633.</p> <p>Staphylococcus aureus ATCC 6538</p>	<p>Candida albicans ATCC 16404 .</p> <p>Aspergillus niger ATCC 10231.</p>

Toutes les souches microbiennes référenciées sont fournies aimablement par :

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

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

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

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

- **Milieux de culture**

La gélose est un milieu biologique destiné à cultiver des bactéries, afin soit d'en favoriser le développement, soit de le diminuer. Il existe plusieurs types de géloses, reconnaissables à leur couleur et à leur action. La gélose est une substance gélifiée dont les bactéries se nourrissent.

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

-On met les géloses dans un bain-marie puis on les verse dans les boites de Pétri stériles .

-Dés que les géloses refroidissent , on ferme les boites de pétri .

- **Ensemencement**

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

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

- **Doses et application des disques**

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

Les essais sont répétés trois fois avec des témoins positifs de disques d'antibiotiques : Gentamycin (20µl), par rapport aux bactéries étudiées et de disque antifongique : Econozole (20 µl) par rapport aux champignons testés, le diméthylsulfoxyde (DMSO de pureté 99% ; Mm=78,13g/mol) de référence (Sigma-AldrichGermany) comme témoin négatif.

- **Lecture et interprétation**

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

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

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 6 mm.

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

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

● Caractérisation

III.1 Analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres FTIR de HAp, amidon et composite sont présentés dans la **Figure III.1** et leurs interprétations sont données dans le **tableau III.1** ci dessous:

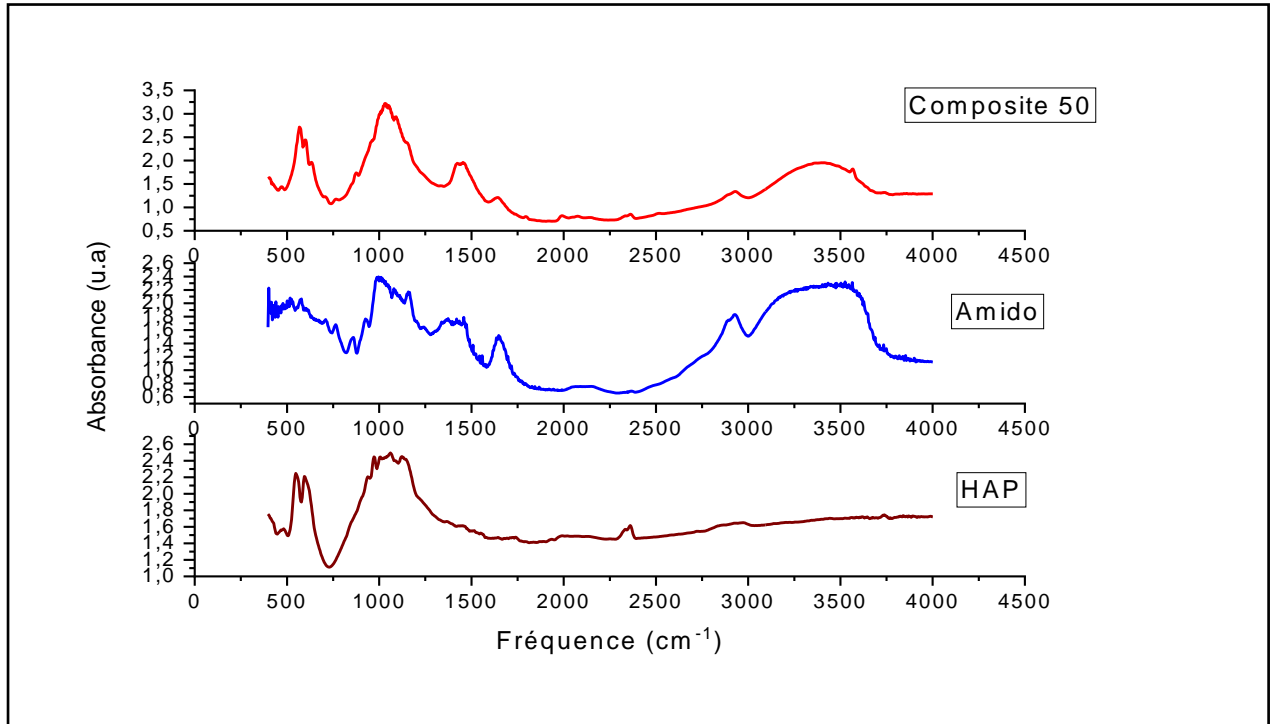


Figure III.1: Spectres FTIR de HAp, amidon et composite.

(a). Interprétation de spectre d'amidon :

- Comme le montre le spectre d'amidon, la présence des bandes d'absorption à environ 3300-3600, ~2900, ~1150 et 1000-1100 cm^{-1} indiquent que l'amidon possède respectivement ; un OH, C-H, C-O-C, et groupe fonctionnel C-O, respectivement. De plus, la vibration caractéristique de l'anneau C-O-C sur l'amidon conduit à un pic d'absorbance vers 700-900 cm^{-1} . La flexion C-O associée au groupe OH.
- De plus, le pic d'absorbance à 1415 cm^{-1} implique la présence de cisaillement symétrique C-H du fragment CH_2OH .
- Le pic inhabituel de CO_2 en l'amidon (λ 2358 cm^{-1}) est observé dans le spectre IR de l'amidon est du probablement aux conditions de mesure de l'appareil.

Tableau III.1:Position et attribution des bandes d'absorption infrarouge de l'amidon

No	Groupements fonctionels	Longeur d'onde (cm ⁻¹)	Amidon
1	Élongation O-H	3600-3300	3448
2	Elongation C-H	2931	2929
3	Flexion C-O associé au groupe O-H	1637	1647
4	Déformation symétrique de CH ₂	1458	1437
5	Cisaillement symétrique CH ₂	1415	1415
6	Flexion symétrique C-H	1385-1375	1381
7	Élongation asymétrique C-O-C	1149	1157
8	Etirement C-O	1200-800	1082,1016
9	Vibration annulaire des glucides C-O-C	920,856,758	929,860,763
10	<u>Q</u> =C=O	2350	-

(b).Interprétation de spectre HAp:

- Les bandes liées aux phosphates (PO₄³⁻) apparaissent à 560, 600 et (1010-1100) cm⁻¹ et confirment la présence de la phase apatite dans la poudre HAp étudiée.
- La faible intensité de HPO₄²⁻ est située à 1100 cm⁻¹.
- La bande située à 3560 cm⁻¹ représente le groupe OH⁻ de la phase apatite et de l'eau adsorbée
- La bande liée à l'eau d'hydratation est bien visible dans les spectres IR-TF dans l'intervalle de (3450-3580) cm⁻¹ et 1630 cm⁻¹ pour la poudre HAp étudiée.
- La faible intensité de HPO₄²⁻ est située à 1100cm⁻¹.

- La bande située à 3560 cm^{-1} représente le groupe OH^- de la phase apatite et de l'eau adsorbée
- La bande liée à l'eau d'hydratation est bien visible dans les spectres IR-TF dans l'intervalle de $(3450-3580)\text{ cm}^{-1}$ et 1630 cm^{-1} pour le HAp étudié.
- Le pic situé à 1410 cm^{-1} est lié à la présence des carbonates dans le réseau cristallin de HAp. Ces carbonates incorporés proviennent de la solubilisation du CO_2 de l'air dans l'eau.

Tableau III.2 : Position et attribution des bandes d'absorption infrarouge de l'hydroxyapatite.

NO	Groupements fonctionels	Longueur d'onde (cm ⁻¹)
1	PO ₄ ³⁻ (Déformation symétrique)	560
2	PO ₄ ³⁻ (Déformation asymétrique)	600
3	PO ₄ ³⁻ (Elongation asymétrique)	110-1100
4	HPO ₄ ²⁻ (Déformation dans les plans des groupements OH-)	1100
5	H ₂ O (Déformation des molécules d'eau liées par des ponts H)	1630
6	H ₂ O Elongation symétrique des molécules d'eau liées par des ponts H)	3450-3580
7	OH ⁻ (Elongation symétrique)	3560

(c).Interprétation de spectre de composite:

- La bande .qui apparaît à 3567 cm⁻¹représente le groupe OH⁻ ce qui confirme la présence de l'hydroxyapatite dans le composite.
- Les bandes liées a l'eau d'hydratation sont visible a 3390-3355 et 1630 cm⁻¹ .
- Le groupement C-H qui apparaissent à 2518-2931 cm⁻¹ confirme la présence d'amidon dans le composite.
- L'apparition de groupement C-O à 2333-2361 cm⁻¹.
- La déformation symétrique de groupement CH₂ à 1423-1454 cm⁻¹.

- La vibration annulaire des glucides environ 750 cm^{-1} et l'apparition de groupement C-O à 1091 cm^{-1} confirme la présence de l'amidon .
- La bande de PO_4^{2-} à 632 cm^{-1} confirme la présence de l'hydroxyapatite dans le composite.

Tableau V.3:Position et attribution des bandes d'absorption infrarouge de composite

No	Groupements fonctionels	Longueur d'onde (cm^{-1})
1	O-H ⁻ élongation symétrique	3564
2	H ₂ O élongation symétrique	3390-3355
3	C-H élongation	2931-2518
4	C=O élongation	2363-2333
5	C=O associé au groupe OH	1643
6	CH ₂ déformation symétrique	1454-1423
7	C=O elongation	1091-1029
8	C-O-C vibration annulaire des glucides	767,875
9	PO_4^{2-}	597,632

III.2 Analyse de microscope électronique à balayage MEB couplé avec EDX de composite :

L'analyse microscopique MEB est utilisée, non seulement pour vérifier l'homogénéité de l'échantillon, mais aussi bien pour révéler la morphologie interne de composite synthétisé.

Les images du MEB de composite décrit à **la Figure III.2 (a)**, fournisse des informations utiles, à la fois, en terme de forme et de taille de l'échantillon.

De façon générale, la morphologie de surface de composite hybride à base d'hydroxyapatite co-dopée et d'amidon révèle de nombreux agglomérations comme le montre **la Figure III.2 (b)**. Elle donne naissance à de petites particules sphériques de tailles nanométriques allant de 67 nm à 97 nm avec une distribution presque uniforme, les résultats obtenus sont meilleurs que ceux de **Ferraz et al [90]**.

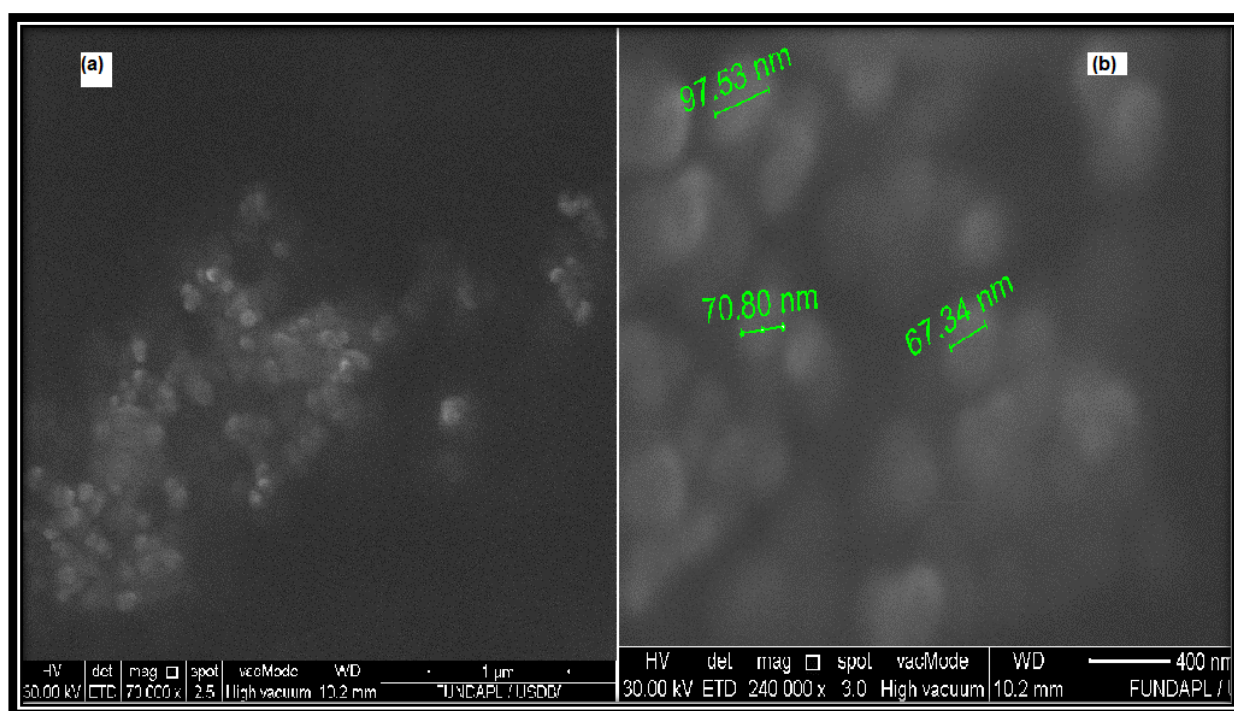


Figure III.2: Image MEB de composite. (a) avec agrandissement (70000 X)1 ; (b) avec un agrandissement (240000 X)

En outre le diffractomètre de EDX couplé avec le MEB présente sur la Figure III.2 a identifié les différents constituants principaux de la phase du composite à savoir (Ca:23.70% ; P:13.47% ; Zn:1.84%) avec des pics importants et le reste des constituants sont des résidus de la synthèse.

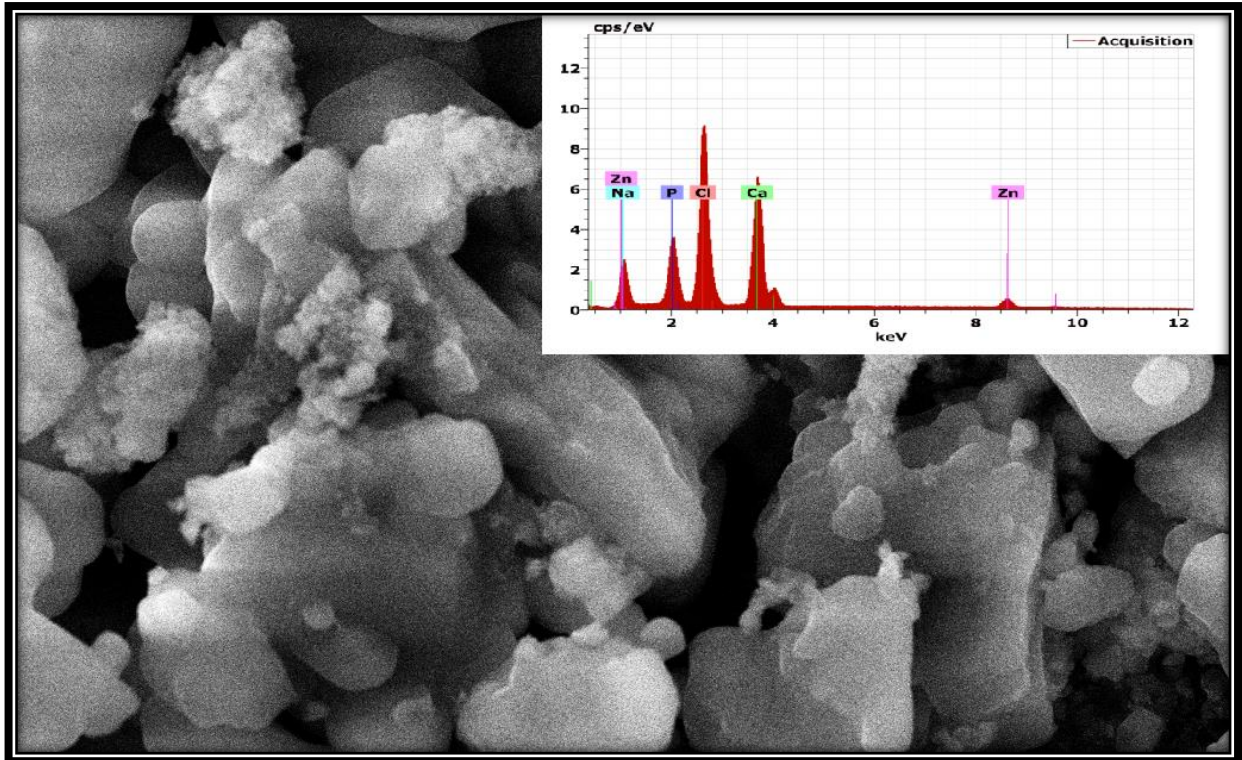


Figure III.3: Image MEB couplé avec EDX de composite.

III.3 Analyse de diffraction par les rayons X

La figure III.5 illustre la présence du triplet de diffraction caractéristique de l'hydroxyapatite qui correspond respectivement aux plans réticulaires (hkl) respectivement répertoriés par la base de données de fichiers de diffraction standards JCPDS (PDF N° 70-0794) : (002), (210), (112), (202), (310), (222), (312) et (321) observés pour les valeurs de l'angle de Bragg 2θ (en degrés), qui apparaissent à : 26, 29 ; 32 ; 35 ; 40 ; 45 ; 48 et 52° .

Nous remarquons également l'apparition de tous les phases minérales solides qui ont été identifiées de la phase apatitique, une déduction peut être faite et on peut nettement dire que le composite se cristallise comme phase apatitique majoritaire, de plus les deux raies situées entre 10 et 20 ° indiquant l'apparition d'une nouvelle phase minoritaire qui est propre au composite de type Whitlockite (la phase indésirable) $\text{Ca}_{2.81}\text{Mg}_{0.19}(\text{PO}_4)_2$ (PDF # 96 -901-0493) (voir annexe II.2). La présence d'amidon ne peut être mise en évidence par DRX que dans le cas d'un échantillon ou le pourcentage de l'amidon est plus important que celui de HAp.

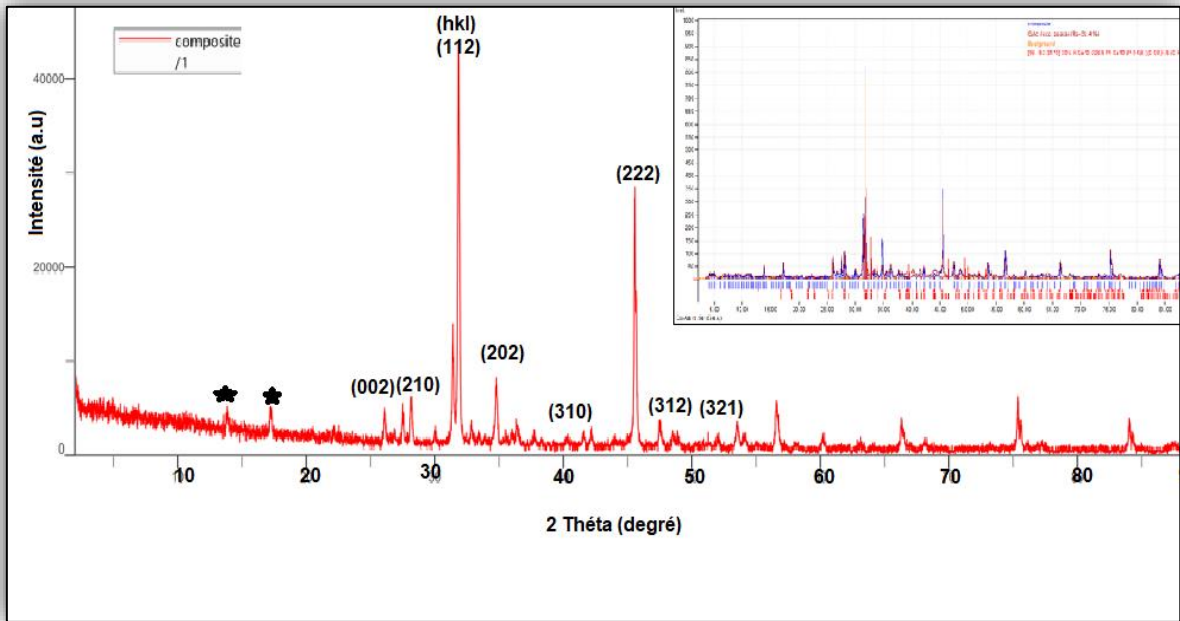


Figure III.4: Diffractogramme du composite synthétisé et la phase whitlockite.

Les tailles de particules ont été calculées à l'aide de l'équation de Debye-Scherrer (voir annexe II.4). (tableau III.4), le plan de diffraction (002) étant pris en compte pour le calcul de la taille des cristallites avant leur mise en forme et leur isolation.

Tableau III.4 : Taille des cristallites et cristallinité du composite.

Echantillon	Plan (hkl)	FWHM (radians)	β	Taille de cristaux (nm)	Cristallinité (%)
Composite	002	0.181		40	67

D'après les résultats du tableau et selon le logiciel (Match 3) de traitement des données cristallographiques. Le composite se cristallise dans le système cristallographique P-3m Hexagonale avec les paramètres cristallographiques suivants : paramètre de maille ($a= 9.49 \text{ \AA}$; $C= 6.8 \text{ \AA}$) ; distance réticulaire de l'ordre $D= 3,43 (\text{ \AA})$; densité $d= 3,146 \text{ g/cm}^3$ et de formule $\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{CO}_3)_{0.5} (\text{OH})_2 / (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$.

III.4 Étude de l'activité antimicrobienne

Antibiogramme de composite :

L'activité antimicrobienne de composite a été testée in vitro contre cinq bactéries (*E coli*, *S aboney*, *S. aureus*, *P.aeruginosa* et *B. subtilis*) et deux souches de champignons (*C. albicans* et *A. niger*).

La Figure III.5 illustre les zones d'inhibitions de tests antimicrobiens suivants :

- Gentamycine en tant qu'antibiotique contre les différentes bactéries, avec des zones allant de 21mm jusqu'à 35mm.
- Econazol en tant que contrôle antifongique positif avec des souches fongiques avec des zones allant de 21mm à 28mm, en plus du contrôle négatif avec du DMSO en tant que solvant de dilution.

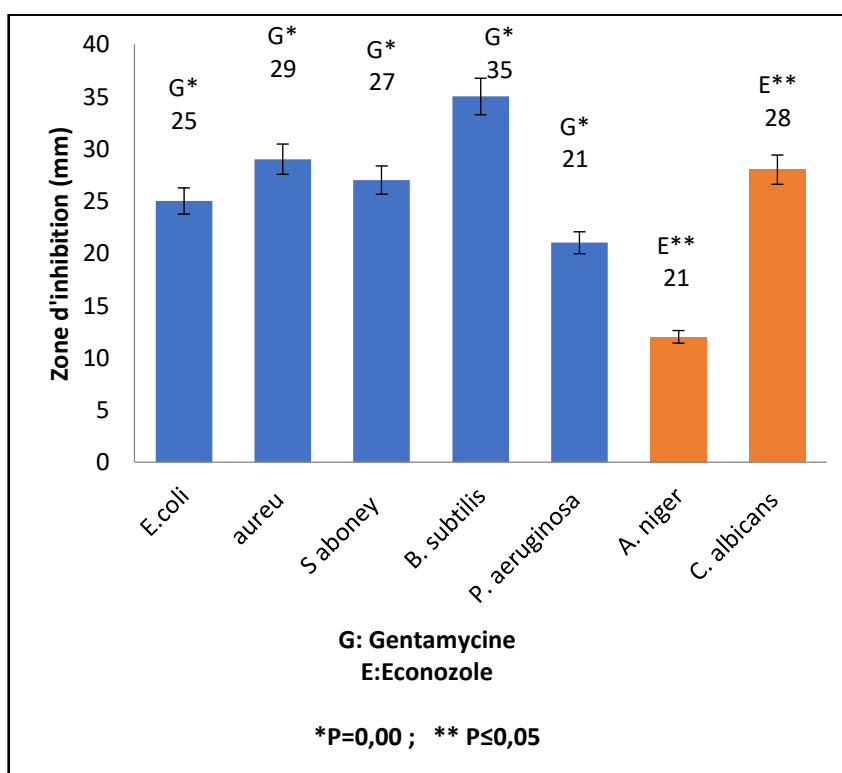


Figure III.5: Tests antimicrobiens des contrôles positifs.

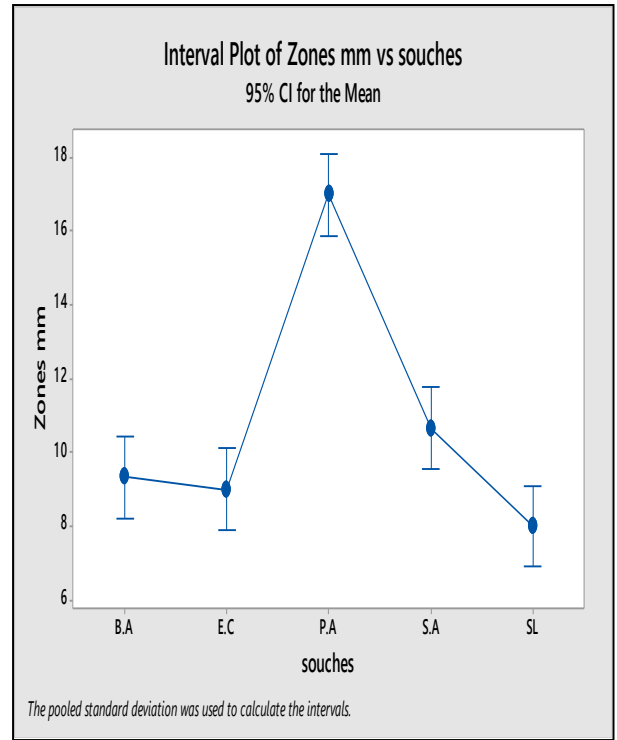
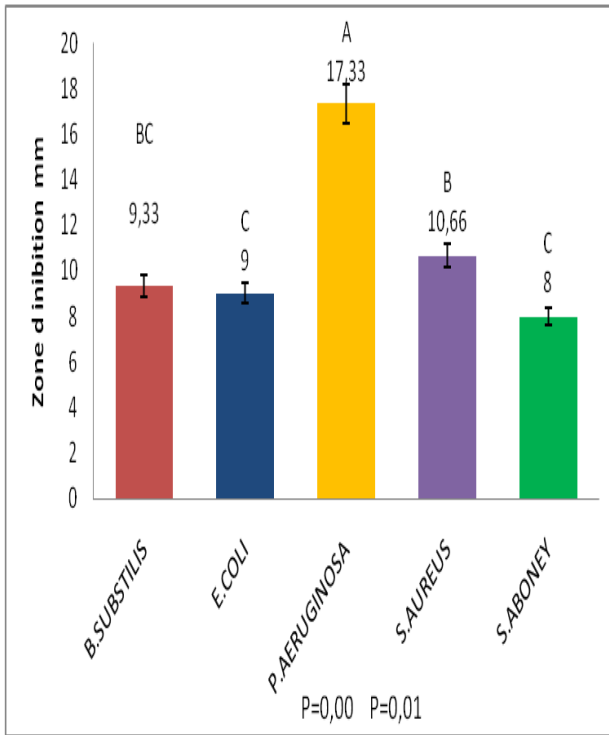


Figure III.6: Activité Antibactérienne de composite.

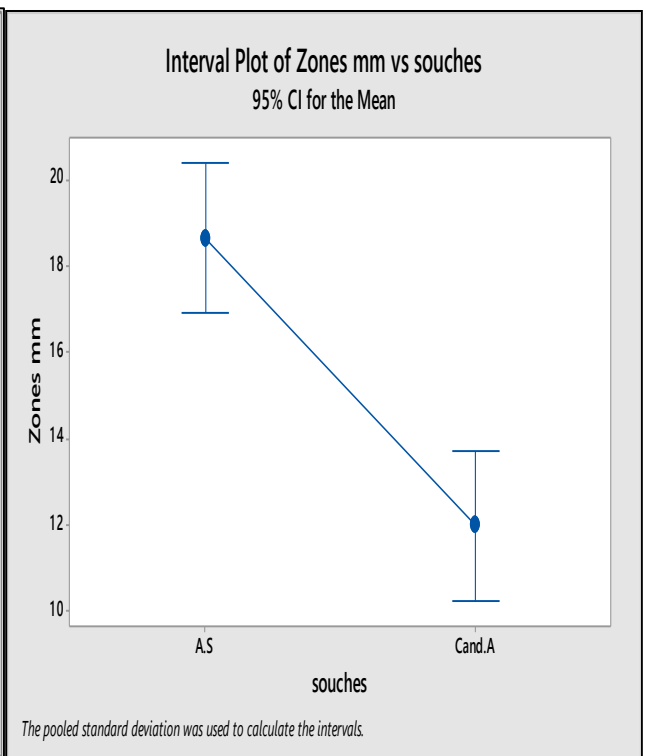
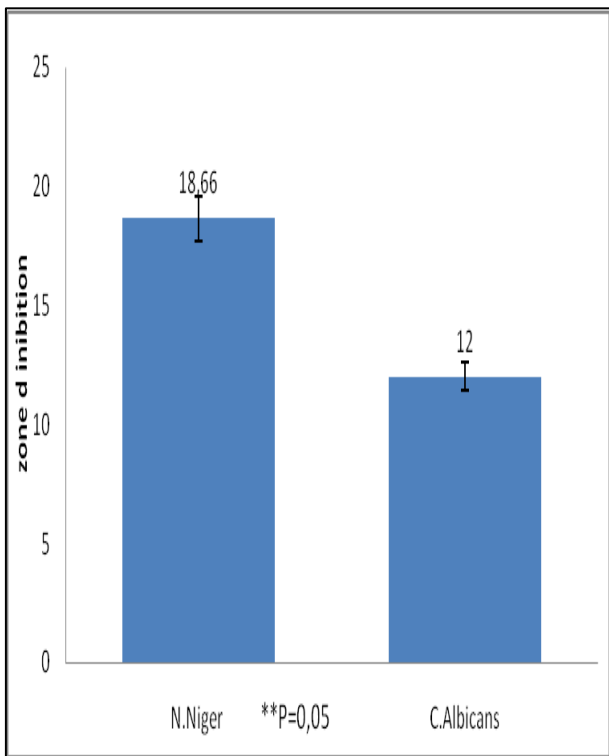


Figure III.7: Tests antifongiques de composite avec *C. albicans* et *A.niger*.

Comme la montre la figure III.6 et selon le modèle de comparaison Fischer (Individual 95%

CIS) présente des groupes similaires (C) bien visible sur l'histogramme qui explique le même pouvoir inhibiteur de composite sur les deux bactéries (*E coli*, *S aboney*) de Gram (-).

L'échantillon de composite fait apparaître clairement des zones d'inhibitions allant de 9 à 17 mm pour les bactéries Gram (-) et de 9 à 11 mm pour les bactéries à Gram (+). (voir la photo III.8)

- La souche *P.aeruginosa*, quant à elle, semble être une souche plus sensible, montre la zone d'inhibition la plus large dont la taille est de l'ordre de 17,33mm.
- *B. subtilis*, *E coli*, *S aboney*, ces trois souches montrent des zones d'inhibition varient entre 8mm et 9,33 mm, donc ils sont considérées comme des souches peu sensibles.
- *S. aureus*, avec une zone d'inhibition de 10,66 mm elle est considérée sensible.

D'après **Hajipour et al**, les trois mécanismes possibles d'activité ionique antibactérienne sont comme suit [91] :

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

L'histogramme de la figure III.7 montre que les fongiques quant à eux sont qualifiées comme des souches extrêmement sensibles avec des zone d'inhibition de $18,66\text{mm} \pm 1,55$ contre *A.niger*, et de $12\text{mm} \pm 1,00$ conte *candida*.

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

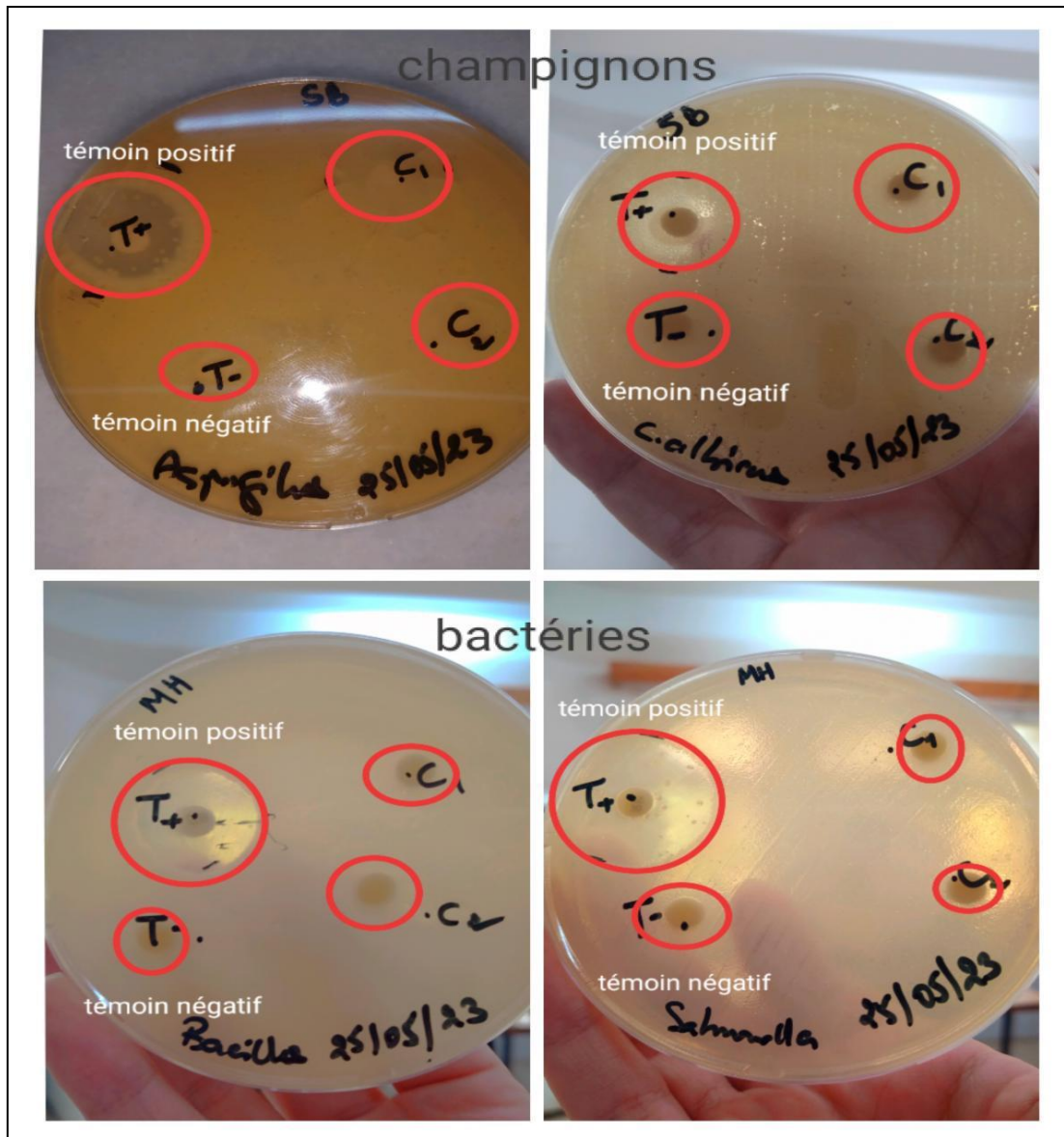


Figure III. 8 : Photographies de l'activité antimicrobienne du composite .

Étude comparative

L'étude comparative de l'effet de composite sur les différentes couches bactériennes et fongiques sont effectués en utilisant le logiciel Minitab 17 (Individuel Fischer comparaison 95% Cis):.

La figure III.9 montre que le composite manifeste une affinité envers plutôt les bactéries à Gram (+) *Pseudomonas aeruginosa* (*B. subtilis*) dont la moyenne des zones d'inhibitions est plus proche de zéro que celles à Gram(-) (*E.coli*).

Par ailleurs, les souches à Gram (-) quant à elles, révèlent une moyenne des zones d'inhibitions légèrement différente de zéro dans ce cas le composite se comporte de manière différente vis-à-vis ce types de souches.

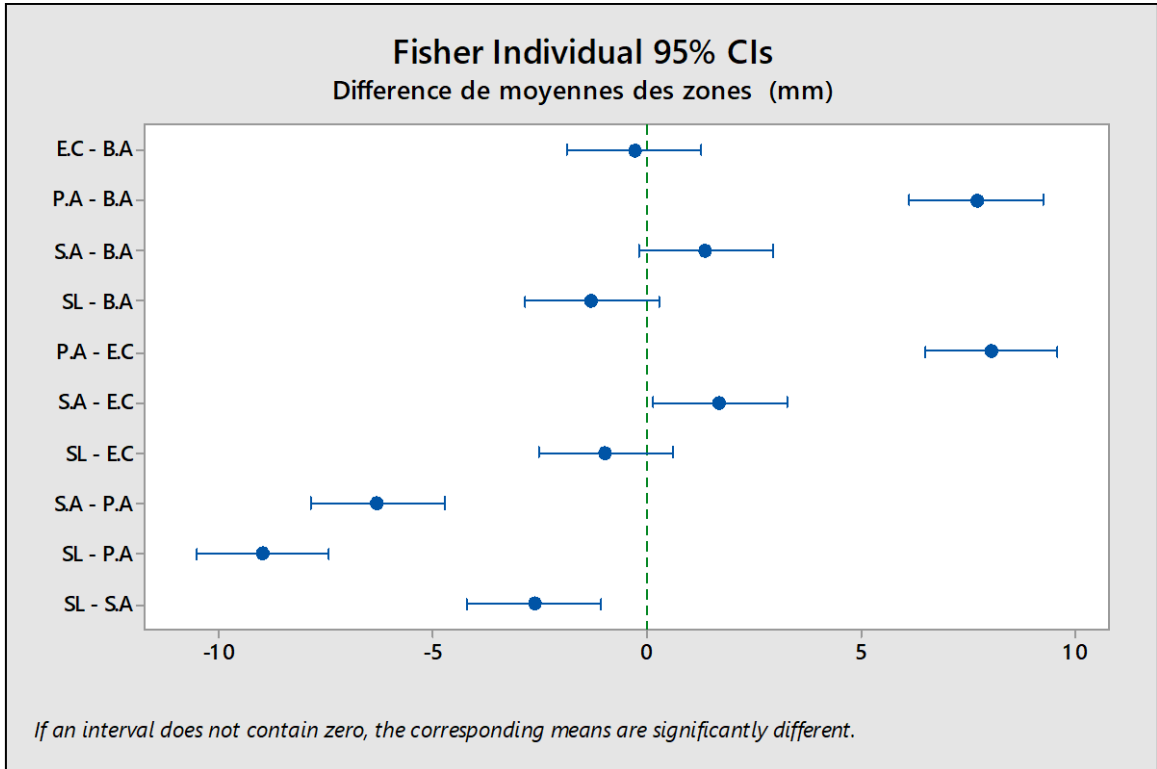


Figure III.9: Modèle de comparaison Fisher de composite.

CONCLUSION GENERALE

A l'issue de ce travail, nous avons, en premier lieu, synthétisé l'hydroxyapatite co-dopée avec deux cations à savoir le zinc et le magnésium par la méthode de précipitation et en deuxième lieu nous avons hybridé l'hydroxyapatite Co-dopée avec le composé organique l'amidon afin de préparer un nouveau nano-composite en suivant le protocole de lixiviation.

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

- L'analyse IRTF a confirmé la présence des bandes caractéristiques attribuées aux modes vibratoires des groupes phosphate et hydroxyle, ainsi que la présence des bandes de groupement C-H et de glucides qui a révèlent une parfaite cohérence avec sa structure hybridée.
- La caractérisation par MEB a permis de donner un aperçu sur la morphologie interne du composite synthétisé en donnant naissance à des petites particules sphériques de tailles nanométriques allant de 67 nm à 97 nm avec une surface irrégulière et plus agglomérée.
- Le diffractomètre de l'EDX couplé avec le MEB a identifié les différents constituants principaux de la phase du composite à savoir : (Ca ; P ; Zn) avec des pics importants et le reste des constituants sont des résidus de la synthèse.
 - La caractérisation par DRX a montré les phénomènes suivants :
 - la présence de deux phases : phase apatitique majoritaire et une phase whitlockite minoritaire caractérisent le composite.
 - la taille des cristallites qui est de l'ordre de 40 nm et un taux de cristallinité remarquable de 67%.
- Les résultats de l'activité antimicrobienne montrent des zones d'inhibitions allant de 9 à 17 mm pour les bactéries Gram (+) et de 9 à 11 mm pour les bactéries à Gram (-).
- Les champignons ont été qualifiés comme des souches extrêmement sensibles avec des zones d'inhibitions de l'ordre de $18,66\text{mm} \pm 1,55$ contre *A.nige*, et de $12\text{mm} \pm 1,00$ contre *candida*. Ces résultats reflètent donc la forte activité antifongique vis-à-vis des champignons pathogènes de type (*candida* et l'*aspergillus*).
- L'étude comparative de l'effet du nano-composite sur les différentes souches bactériennes et fongiques révèle que le composite préparé manifeste une affinité envers plutôt

les bactéries à Gram (+) que celles à Gram (-) qui a réagit de la même manière vis-à-vis l'ensemble des fongiques.

Enfin ,nous pouvons conclure que le composite ainsi synthétise à partir d'une hybridation d'hydroxyapatite co-dopée et d'amidon a donné naissance á un nouveau nanocomposite prometteur pour de nombreuses applications technologiques.

En guise de perspectives et pour valider l'utilisation de ce nouveau composite comme biomateriau d'intérêt biomédical, il est recommandé d'abord de compléter et d'approfondir ce travail en s'ouvrant éventuellement sur les horizons suivants :

- Estimer la porosité de matériau composite et sa surface spécifique en effectuant l'analyse BET (dimension des pores, volume poreux,...).
- Etudier la bioactivité in vivo du biomatériau composite (hydroxyapatite -amidon) par greffage d'un principe actif.
- Faire les tests de microbiologie avec insertion d'un anti bactérien telle que la silice.

Annexe I



Figure I.1: Montage de synthèse du composite



Figure I.2: Composite prepare



Figure I.3: Lavage et filtration de composite



Figure I.4: La poudre composite obtenue



Figure I.5: Spectrophotometre infrarouge

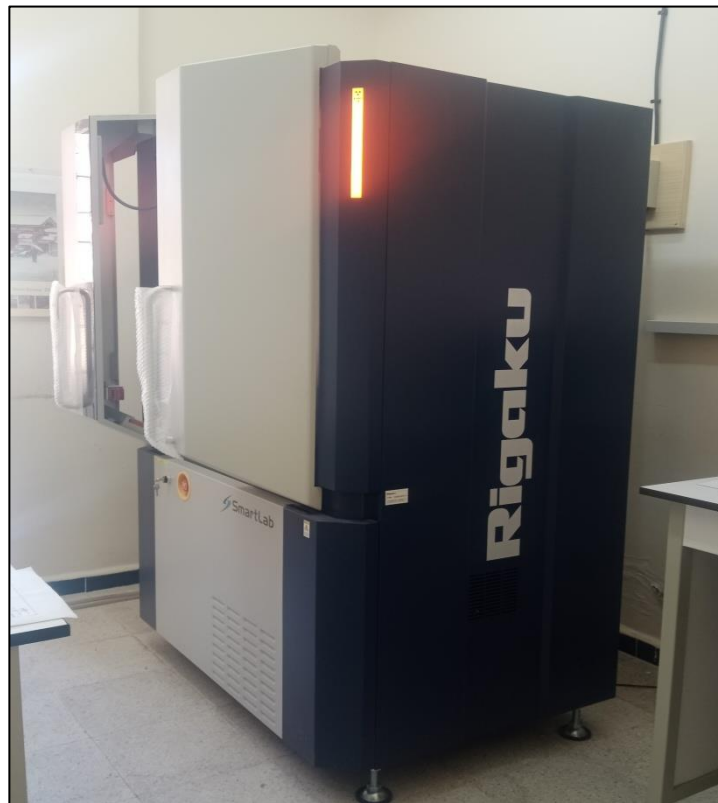


Figure I.6: Diffractometre



Figure I.7: Microscope electronique a balayage

Annex II

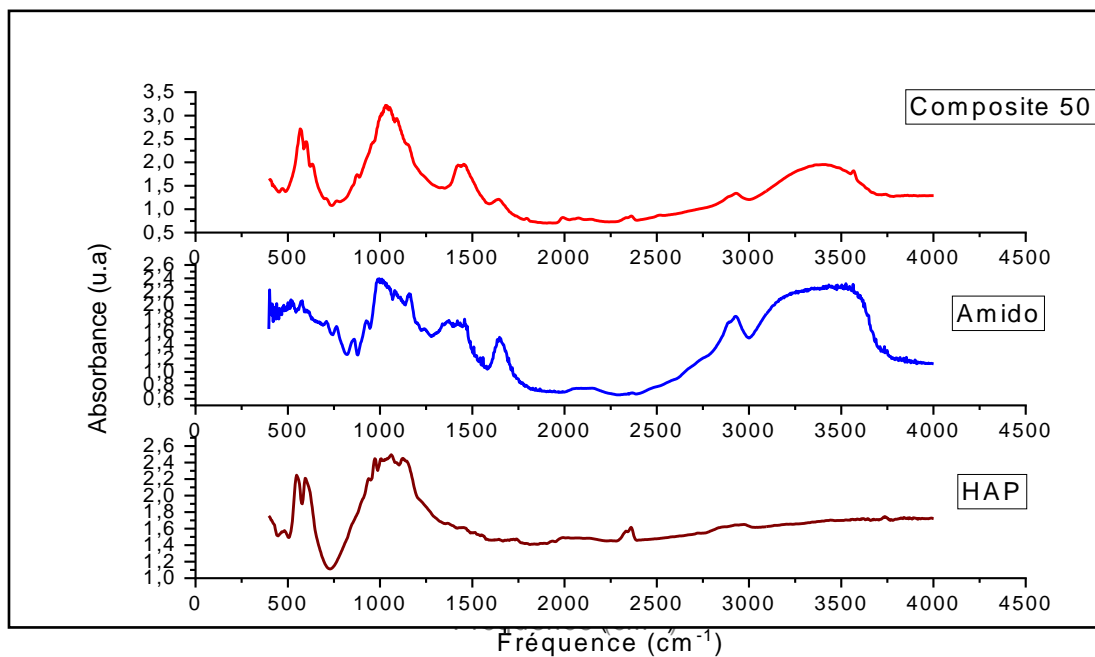


Figure II.1 : Spectre FTIR de HAp, amidon et composite

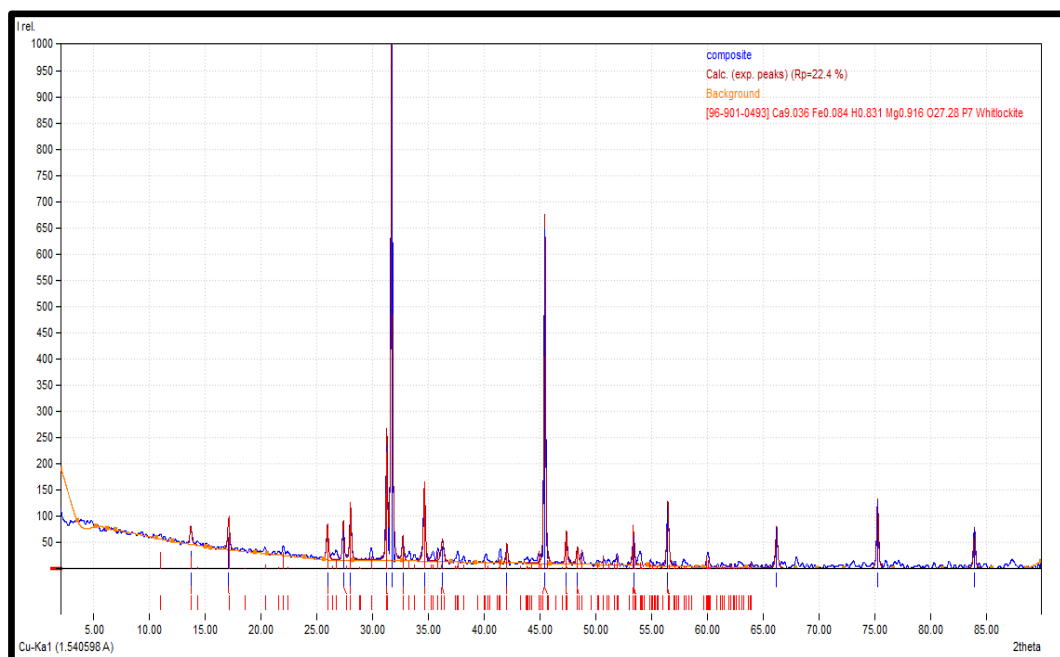


Figure II.2 : Spectre DRX de composite de type Whitlockite

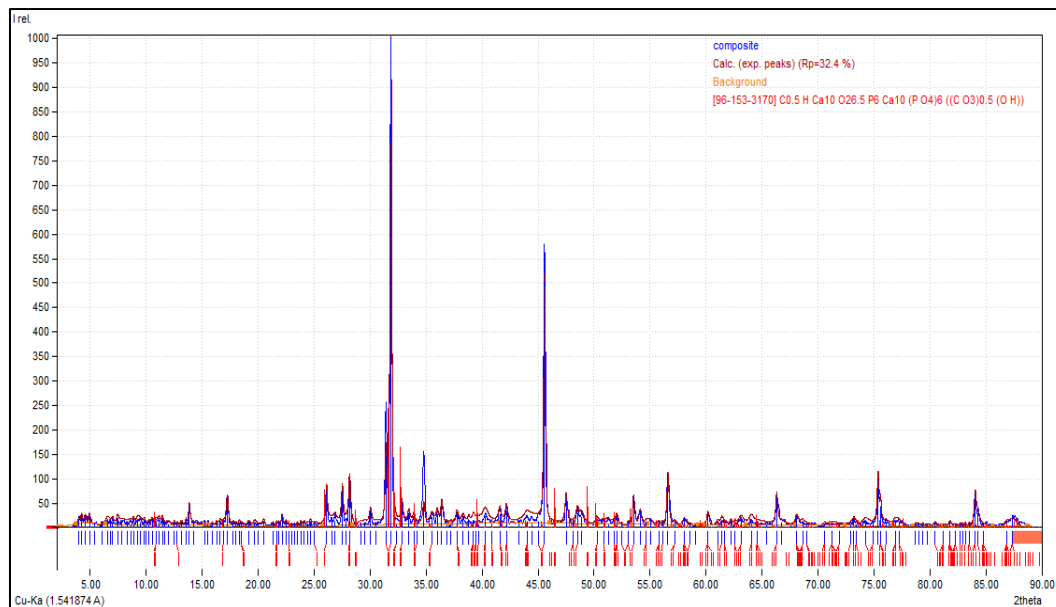


Figure II.3: Spectre de composite

Tableau II.1: Les différents constituants de composite

Spectrum: Element	Acquisition Series Net	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error	[Sigma]
chlore	K-series 16626	21.27	27.28	23.75		2.36
calcium	K-series 16370	24.00	30.78	23.70		2.29
phosphore	K-series 7521	10.54	13.51	13.47		1.44
sodium	K-series 3623	12.67	16.25	21.82		2.89
zinc	K-series 1161	3.04	3.90	1.84		0.44
magnésium	K-series 218	0.63	0.81	1.03		0.28
oxygène	K-series 220	5.82	7.46	14.40		6.53
	Total:	77.96	100.00	100.00		

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

$$D = \frac{k \cdot \alpha}{FWHM \cdot \cos\theta}$$

où les paramètres suivants représentent :

D : la taille du cristal en nm;

K : la constante de Scherrer (0,9) pour le solide HAp hexagonal;

α : la longueur d'onde du faisceau de rayons X monochromatique (0,181 nm);

FWHM:est la largeur à mi-hauteur de pic de diffraction / largeur totale entre deux valeurs;

θ : l'angle de diffraction ($^{\circ}$).

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

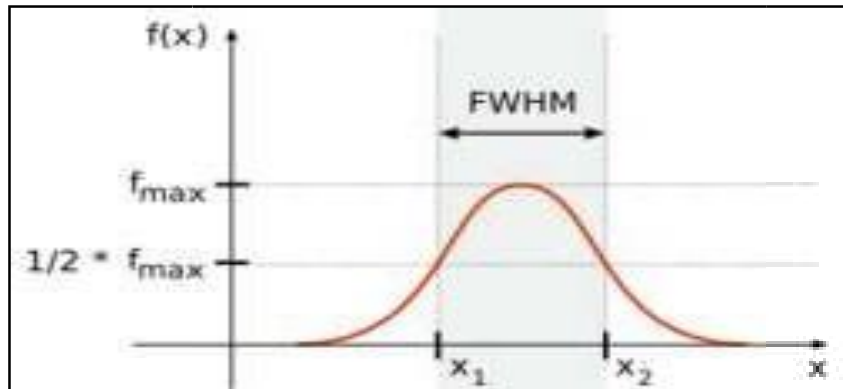


Figure II.4 : Schéma représentatif montrant la FWHM.

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

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Litwic.A,Edwards.M.H,Dennison.E.M,Cooper C., Epidemiology and burden of osteoarthritis, Br. Med. Bull. 105 (1) (2013) 185–199.
- [2] Garot.C, Betttega .G, Picart .C, Additive manufacturing of material Scaffolds for bone regeneration: toward application in the clinics, Adv. Funct. Mater. 31 (5) (2021) 2006967, <https://doi.org/10.1002/adfm.v31.510.1002/adfm.202006967>.
- [3] Bose.S,Banerjee.D,Shivaram.A, Tarafder.S, Bandyopadhyay.A, Calciumphosphate coated 3D printed porous titanium with nanoscale surfacemodification for orthopedic and dental applications, Mater. Des. 151 (2018)102–112.
- [4] Fijoł.N, Abdelhamid.H.N,Pillai.B,Hall.S.A,Thomas.N,Mathew.A.P, 3D-printed monolithic biofilters based on a polylactic acid (PLA)–hydroxyapatite(HAp) composite for heavy metal removal from an aqueous medium, RSC Adv.11 (51) (2021) 32408–32418.
- [5] Bose.S, Bhattacharjee.A,Banerjee.D, Boccaccini.A.R, Bandyopadhyay.A,Influence of random and designed porosities on 3D printed tricalciumphosphate-bioactive glass scaffolds, Addit. Manuf. 40 (2021) 101895.
- [6] Barrett.E.P,Brown.J.M,Oleck.S.M, Some granular carbonaceous adsorbents for sugar refining, Ind. Eng. Chem. 43 (1951) 639–654.
- [7] Le Geros,R.Z.,Ito,A.,Ishikawa,K.,Sakae,T.,&P.Legeros,J.(2010).Fundamentals of Hydroxyapatite and Related Calcium Phosphates. Dans *Advanced Biomaterials*(pp. 19-52).
- [8] Palard,M.(2007).Synthèse et frotage d’hydroxyapatite Phosphocalciques silicaté [Thèse de doctorat,université de Limoges].
- [9] Benaqqa, Ch. (2003). Etude de la propagation sous critique de fissures dans les phosphate de calcium : cas de l’hydroxyapatite et du phosphate Tricalcique[Thèse de doctorat,l’institut national de la science appliquée de Lyon].
- [10] Asimeng,B.O.,Fianko,J.R.,Kaufmann,E.E.,Tiburu,E.K.,Hayford,C.F.,Anani,P. A., et al. (2018). Preparation and characterization of hydroxyapatite from Achatinaachatina snail shells: effect of carbonate substitution and trace elements on de fluoridation of water. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 6,205-212.
- [11] Albee.F.H, Morrison.F.H, Studies in bone growth, Ann. Surg. 71 (1) (1920) 32–39.
- [12] Haldeman.K.O, Moore.J.M, Influence of a local excess of calciumand phosphorus onthe healing of fracture: an experimental study, Arch. Surg. 29 (3) (1934) 385–396.
- [13] Huggins.C.B, Mccarroll.H.R, Blocksom.B.H, Experiments on the theory of osteogenesis the influence of local calcium deposits on ossification; the osteogenic stimulus of epithelium, Arch. Surg. 32 (1936) 915–931.

- [14] Layrolle, P., Ito, A., & Tateishi, T. (1998). Sol-Gel Synthesis of Amorphous Calcium Phosphate and Sintering into Microporous Hydroxyapatite Bioceramics. *Journal Of American Ceramic Society*, 81, 1421-1428.
- [15] Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., & Thomas, P. (2002). Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials*, 23, 1065-1072.
- [16] Demanti, I. Développement et caractérisation de revêtements bioactifs d'apatite obtenus par projection plasma à basse énergie: application aux implants biomédicaux [Thèse de doctorat, Université de Toulouse] (2011).
- [17] Mezahi, F-Z. *Caractérisations physico-chimiques et Cinétique de bioactivité des biomatériaux: Hydroxyapatite & Verre bioactif 52S4 élaboré par fusion et par voie sol-gel* [Thèse de doctorat, Université de Constantine] (2009).
- [18] Boyer, A. *Synthèse, caractérisation et évaluation biologique d'apatites phosphocalciques carbo-silicatées* [Thèse de doctorat, Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé] (2014).
- [19] Spence, G., Patel, N.R., Brooks, Rushton, N., Carbonate substitute d'hydroxyapatite : resorption by osteoclasts modifies the osteoblastic response, *J. Biomed Mater. Res. A* 90(2009) 217-224.
- [20] Herliansyah, M.K., Nasution, D.A., Amdi, M.H., Ide-Ektessabi, A., Wildan, M.W., Tontowi, A.E., Preparation and characterization of natural hydroxyapatite: a comparative study of bovine bone hydroxyapatite and hydroxyapatite from calcite, *Mater. Forum scientifique* 561-565(2007) 1441-1444.
- [21] Malla, K.P., Regmi, S., Nepal, A., Bhattarai, S., Yadav, R.J., Sakurai, S., Adhikari, S., Extraction and characterization of novel natural hydroxyapatite bioceramic by thermal decomposition of waste ostrich bone, *Int. J. Biomat.* (2020), 1690178.
- [22] Odusote, J.K., Danyuo, Y., Baruwa, A.D., Azeez, A.A., Synthesis and characterization of hydroxyapatite from bovine bone for production of dental implants, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 17 (2) (2019), 228080001983682.
- [23] hydroxyapatites scaffold, *Bioproc. Biosyst. Eng.* 37 (2014) 433-440.
- [24] Surya, P., Nithin, A., Sundaramanickam, A., Sathish, M., Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite from sardinella longiceps fish bone and its effects on human osteoblast bone cells, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 119 (2021), 104501.

- [25] P. Deb, A.B. Deoghare, E. Barun, Polyethylene glycol/fish scale-derived hydroxyapatite composite porous scaffold for bone tissue engineering, IOP Conf.Series: Mat. Sci. Eng. 377 (2018), 012009.
- [26] M. Akram, R. Ahmed, I. Shakir, W.A.W. Ibrahim, R. Hussain, Extraction del'hydroxyapatiteetdesesprécourseursdesressourcesnaturellesJ.MaterSci.49(2014)1461-1475.
- [27] S.D. Lala, E. Barua, P. Deb, A.B. Deoghare, Physico-chemical and biological behavior of eggshell bio-waste derived nano-hydroxyapatite matured at differenaging time, Mater. Today Commun. 27 (2021), 102443.
- [28] S. Sultana, M.S. Hossain, M. Mahmud, M. Mobarak, M.D. Kabir, N. Sharmin S. Ahmed, UV-assisted synthesis of hydroxyapatite from eggshells at ambient temperature: cytotoxicity, drug delivery and bioactivity, RSC Adv. 11 (2021), 3686.
- [29] H.Y. Ahmed, N. Safwat, R. Shehata, E.H. Althubaiti, S. Kareem, A. Atef, S.H. Qari, A.H. Aljahani, A.S. Al-Meshal, M. Youssef, R. Sami, Synthesis of natural nanohydroxyapatite from snail shells and its biological activity: antimicrobial, antibiofilm, and biocompatibility, Membranes 12 (2022) 2408.
- [30] S.Raynaud,E.Champion,D.Bernache-AssolantandJ.P.Laval,«Determination of calcium/phosphorus Atomic ratio of calcium phosphateapatite'susingX-raydiffractiondiffractionometry»,J.Am.Ceram.Soc,84(2001)359–366.
- [31] W. Basirun, B.Nasiri-Tabrizi& S. Baradaran, Overview of Hydroxyapatite–GrapheneNanoplatelets Composite as Bone Graft Substitute:MechanicalBehavior and In-vitro Biofunctionality,critical reviews insolidstateandmaterialssciences.1-362017.
- [32] M. Hidouri, V. Dorozhkin, N. Albeladi, Thermal Behavior, Sintering and Mechanical Characterization of Multiple Ion Substituted Hydroxyapatite Bioceramics, Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. 2018.
- [33] Benhayoune H, Jallot E, Laquerriere P, Balossier G, Bonhomme P, Frayssinet P. Integration of HA dense rods into cortical bone. Biomaterials (2000).
- [34] Noriko, Kanzaki, Kazuo Onuma, Gabin Treboux, Sadao Tsutsumi, Et Atsuo Ito. Inhibitory Effect of Magnesium and Zinc on Crystallization Kinetics of Hydroxyapatite (0001) Face 2000
- [35] Shepherd, J.H., “Best S.M., Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Repair”. The Journal of the Minerals, Metals & Materials Society, V.63, n° 4, (2011), 83-92.
- [36] Shepherd, J.H., Shepherd, D.V., Best, S.M., « Sustituted hydroxyapatite for bone repair », Journal of Materials Science-Materials in Medicine, V. 23, n° 10, (2012), 2335– 2347. 63
- [37] Bigi, A., Foresti, E., Gandolfi, M., Gazzano, M., Roveri, N., « Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization », Journal of Inorganique Biochemistry, V. 58, (1995), 49-58.

- [38] M. Hidouri, V. Dorozhkin, N. Albeladi, Thermal Behavior, Sintering and Mechanical Characterization of Multiple Ion Substituted Hydroxyapatite Bioceramics, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2018.
- [39] H. SAOULI, « Etude de l'influence des paramètres opératoires sur le rendement de réaction des métaux lourds sur des phosphates de calcium », Mémoire magistrale, Université de Mouloud Ammrameri Tizi Ouzou.
- [40] L.H. He, O.C.S. Tiffany, T.Y. Huang, B.A. Latella, M.V. Swain, *Acta Biomaterialia*, Mechanical behaviour of porous hydroxyapatite, 4, pp. 577–586, (2008).
- [41] T. Ikoma, A. Yamazaki, S. Nakamura, M. Akao, *J. Solid State Chem.* 144(1999)272–276.
- [42] S.K. Swain, D. Sarkar, *Ceram. Int.* 37 (2011) 2927–2930.
- [43] A.K. Nayak, Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview. *International Journal of ChemTech Research* 2, 903-907. 2010.
- [44] Y. Han, S. Li, X. Wang, I. Bauer, M. Yin, *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 286–290.
- [45] S. El Asri, « Nouveaux matériaux de structure apatite préparés à partir du phosphate naturel marocain à applications environnementales », Thèse de Doctorat université Mohammed V-AGDAL, (2009).
- [46] El Hammari, Laghizil, Saoiabi, Barboux, Meyer, Brandès, Guilard, Adsorption Ellisol andiaelongata (J. Ellis & Solander) K.R. Hind & G.W. Saunders, 2013
- [47] Bourvellec, « Elaboration et caractérisation de céramiques hydrothermales d'apatite et de phosphate de zirconium chargé en césium - Application au conditionnement du césium radioactif », Ecole supérieure d'ingénieurs de Chambéry, (2003).
- [48] Marchat, « Fixation du cadmium par une hydroxyapatite phosphocalcique : étude cinétique et thermodynamique », Thèse de Doctorat, Université de Limoges, (2005).
- [49] J.C. Elliott, Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, *Studies Inorganic Chemistry*, 18, 1st Edition, (1994).
- [50] F. Cabanes, Déphosphoration des effluents : Précipitation et valorisation du phosphore, Thèse de Doctorat, INP de Toulouse, France, (2006).
- [51] Suchanek, W., & Yoshimura, M. (1998). Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*,

13, 94-117.

[52] Bertolus, M., & Defranceschi, M. (2004). Les apatites : des phosphates naturels. *Technologie sbiomédicales*.

[53] W. F. ZAMBUZZI, C. V. FERREIRA, J. M. GRANJEIRO and H. AOYAMA, *J. BIOMED. Mater. Res*, 97A(2011)193.

[54] F. KHETAL, S. KHELI, «Etude de la cinétique d'adsorption du zinc sur l'hydroxyapatite naturelle et synthétique», Mémoire d'ingénieur, université de Bejaia, 2008.

[55] M. MUCALO, «Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications » , Woodhead Publishing, (Ed.) (2015).

[56] M. BANU, «Mise en forme d'apatites nanocristallines: céramique et ciment», Thèse de Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, (2005).

[57] Arjak Bhattacharjee, Susmita Bose . (3D printed hydroxyapatite – Zn²⁺ functionalized starch composite bone grafts for orthopedic and dental applications), *Materials & Design* 221 (2022) 110903.

[58] W. LEMLIKCHI, « Elimination de la pollution des eaux industrielles par différentes procédures d'oxydation et de Co-précipitation », Thèse de Doctorat, Université de Mouloud Mammeri, Tizi ouzou, (2012).

[59] Z. OPRE, J. D. GRUNWALDT, T. MALLAT and A. BAIKER, *J. Mol. Catal. A-Chem.*, 242(2005)224.

[60] J. H. JUN, T. H. LIM, S.-W. NAM, S.-A. HONG and K. J. YOON, *Appl. Catal. A-Gen.*, 312(2006)27.

[61] S. SCHUBERT and R. FREITAG, *J. CHROMATOGR. A*, 1142(2007)106.

[62] L. DATTOLO, E. L. KELLER and G. CARTA, *J. CHROMATOGR. A*, 1217(2010)

[63] Boursier B., «Amidons natifs et amidons modifiés alimentaires », *Techniques de l'Ingénieur*, 2005 sur le site :

«<http://www.techniquesingenieur.fr/basedocumentaire/procedes-chimie-bio-agroth2/agroalimentaire-ti700/amidons-natifs-et-amidons-modifies-alimentaires-f4690/amidons-modifiesphysiquement-f4690niv10004.html>»

[64] Guiibot, C. Mercier, Gerald O. Aspinall éditeur Academic Press inc., Orlando (1985), 3.

[65] J. Ahan, S. T. Lim . (2004). Structural changes in corn starches during

alkaline dissolution by vortexing Carbohydrate polymers, 55, 193-199.

[66] ATKINN, J., CHENG, S. L., ABEYSEKERAR, M. & ROBARDS, A. W., Localisation of amylose and amylopectin in starch granules using enzyme-gold labelling. *Starch/Stärke*, 51: 163-172, (1999).

[67] Dospinescu-Rosu, A. M. (2011, Novembre). Synthèse et étude d'amidons modifiés pour le développement de procédés d'oxydation du benzo [a] pyrène, un modèle de polluant organique persistant. Université du Littoral Côte d'Opale.

[68] Seyed A. B. (2012). Modification des propriétés physico-chimiques de l'amidon par procédés hydrothermiques: Contribution à l'étude de transferts couplés chaleur-masse. Autre Université de La Rochelle.

[69] D, Henri., J.L, Malwiak., M, Irène. Amidon Alimentation et nutrition humaine. PARIS: ESF éditeur (1992), 127.

[70] SCHWACH, E. « Etude de systèmes multiphasés biodégradables à base d'amidon de blé plastifié Relations structure – propriétés Approche de la compatibilisation », (2004)

[71] LAFARGUE, D. « Etude et élaboration de films à base de polysaccharides pour la fabrication de gélules pharmaceutiques », Thèse de Doctorat, Université de Nantes, (2007).

[72] MONNET, D., « Etude de l'évolution des propriétés mécaniques de matériaux amyliques », Université de Reims Champagne-Ardenne, (2008).

[73] M. W. Rutenberget D. Solanek, Edition. R. L. Whistler, J. N. BeMiller and E. F. Paschall. eds. Academic Press Inc., NEW YORK (1984).

[74] O. B. Wurzburg, Ed. Stephan A. M., Dekker, New York, (1995), 67-97.

[75] P. C. Trubiano. (1983), *Carbohydr Polym* 4, 369-3.

[76] Article sur composites dentaires par Frédéric CHAPUT et Anne-Charlotte FAURE.

[77] Thomas E. Twardowski. Introduction to Nanocomposite Materials: Properties, Processing, characterization. Edition Destech, 2007.

[78] Les nanotechnologies dans l'industrie papetière - Matériaux nanocomposites *Technique d'ingénieur*, NM3500, 10 septembre 2010, Alain Dufresne.

[79] Matériaux composites, comportement mécanique et analyse des structures, J.M. Berthelot.

[80] Jonas, F and Morrison, J. T. *Synth. Met.*, 1997, 85, 1397.

- [81] Zhu, Z.K.; Yang, y.; Yin, J.; Wang, X.Y.; Ke, Y.C.; Qi, Z.N.; Preparation and properties of organosoluble montmorillonite/polyimide hybrid materials; *J. Appl. Polym. Sci.*; vol. 73, p.2063-2068, 1999.
- [82] Yang, y.; Zhu, Z.K.; Yin, J.; Wang, X.Y.; Qi, Z.E.; Preparation and properties of organosoluble montmorillonite/polyimide and montmorillonite with various chemical surface modification methods; *Polymer*; vol. 40, p. 4407-4414, 1999.
- [83] Yano, K.; Usuki, A.; Okada, A.; Kurauchi, T.; Kamigaito, O.; Synthesis and properties of polyimide-clay hybrid. *J. Polym. Sci. Part A: Pol. Chem.* ; vol. 31, p. 2493-2498, 1993.
- [84] Yano, K.; Usuki, A.; Okada, A.; Synthesis and properties of polyimide-clay hybrid Films; *J. Polym. Sci. Part A: Pol. Chem.* ; vol. 35, p. 2289-2294, 1997
- [85] L.C. Palmer, C.J. Newcomb, S.R. Kaltz, E.D. Spoerke, S.I. Stupp, Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel, *Chem. Rev.* 108(2008) 4754–4783.
- [86] F. Bouville, E. Maire, S. Meille, B.V.d. Moortele, A.J. Stevenson, S. Deville, Strong, tough and stiff bioinspired ceramics from brittle constituents, *Nat. Mater.* 13 (2014)508–514.
- [87] Kohei Okuda, Ken Hirota, Tadashi Mizutani, Yasuhiro Aoyama, (Co-precipitation of tapioca starch and hydroxyapatite. Effects of phosphorylation of starch on mechanical properties of the composites). *Results in Materials* 3 (2019) 100035.
- [88] C.Y. Beh, E.M. Cheng, N.F. Mohd Nasir, Emma Ziezie, Mohd Tarmizi, S.K. Eng, M.S. Abdul Majid, M.J.M. Ridzuan, S.F. Khor, F.S. Ahmad Saad; (Morphological and optical properties of porous hydroxyapatite/cornstarch (HAp/Cs) composites). *Journal of Materials Research and Technology* 2020; 9(6) :14267 e14282.
- [89] Alioui.H « Dopage métallique de l'hydroxyapatite: synthèse, caractérisation et application à l'élimination des bactéries pathogènes » ; Thèse de doctorat en chimie industrielle, Université de Blida 1. (2020), 151p
- [90] Ferraz, M.P., Monteiro, F.J., “Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies”, *Journal of Applications Biomaterials Biomechanics*, V. 2, (2004), 74-80.
- [91] Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Aberasturi, D.J., Larramendi, I.R., Rojo T., Serpooshan, V., Parak, W.J., Mahmoudi, M., “Antibacterial properties of nanoparticles”, *Trends in Biotechnology*, V. 30, (2012), 499-511

