

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



Mémoire de fin d'étude (Master en chimie moléculaire des complexes métalliques) :

Présenté par :

MOULA Sarah

***Synthèse et caractérisation de nano et biomatériaux
à base d'Hydroxyapatite/Argent/Chitosan/Amidon comme
vecteur de molécules actives***

Soutenu le **06/07/2009**

Devant le jury :

Président :

Mr B. BOUZID

Docteur à l'université de BILDA

Examineur:

Mr M. KARS

Chargé de cours à l'université de BLIDA

Rapporteur :

Mr K.E BAL

Professeur à l'université de BLIDA

A mes parents

A mon grand-père

Résumé

Le présent travail est consacré à la synthèse des bio-composites (complexes) à base d'hydroxyapatite 'HA' et de nanoparticules d'argent 'Np-Ag' pouvant être appliqués comme matériaux de substitution d'os. Les particules de Np-Ag ont été obtenues par réduction en utilisant des bio-polymères d'amidon et de chitosan. L'analyse par FTIR, RDX et spectroscopie UV-vis et par microscope optique a confirmé l'obtention de HA dopé par les Np-Ag.

L'étude de l'activité antibactérienne contre les gram-positives et les gram-négatives a montré que le complexe HA/Np-Ag/Amidon présente une meilleure activité antibactérienne.

Abstract

The work is devoted to bio-composites (complex) synthesis based on hydroxyapatite 'HA' and silver nanoparticles 'Ag-Np' that can be used as substitute materials of bones. The Ag-Np particles have been obtained by reduction by using starch biopolymers and chitosan. The analyze by FTIR and RDX and also by UV-vis spectroscopy and by optical microscope have confirmed the obtaining of doped HA by Ag-Np.

The study of the antibacterial activity against the positive-gram and negative-gram has revealed that the complex HA/Np-Ag/ Starch shows a better antibacterial activity.

A ALLAH, le tout puissant, le clément, le bienfaiteur, le miséricordieux, qui fait de chaque jour des merveilles pour moi.

Mes vifs remerciements vont à l'endroit de mon promoteur, Monsieur Kheir-Eddine BAL d'avoir bien voulu accepter la responsabilité de diriger ce mémoire. Dès le début, il a fait preuve d'une grande confiance en moi, et il n'a jamais cessé de le manifester au cours de cette année, pour ses conseils avisés, sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à remercier tous les membres du jury pour avoir manifesté de l'intérêt pour ce travail en me faisant l'honneur de le juger.

Un grand merci pour Messieurs :

- Ali BOULEHOUACHE (chef de département de chimie).
- Rachid BELAL (Responsable du Master chimie),

ayant fait preuve, à mon égard, de patience et de disponibilité.

Des analyses microbiologiques ont été réalisées dans le laboratoire d'analyse Microbiologique du complexe Antibiotique de Médéa "SAIDAL". Je tiens à remercier les responsables des laboratoires de m'avoir accueilli, je remercie également toute l'équipe pour la disponibilité qu'ils m'ont témoignée et les moyens qu'ils ont mis à ma disposition.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, au bon déroulement de mon travail.

Un clin d'œil à mes amis pour leur complicité, leur soutien et leur aide appréciable.

LISTE DES FIGURES



Figures	Titres	Pages
Figure I.1	<i>Coupe longitudinale schématique d'un os long</i>	03
Figure I.2	<i>Coupe transversale schématique d'une molaire</i>	04
Figure II.1	<i>Image du TEM de nanoparticules d'argent synthétisé par l'amidon</i>	08
Figure II.2	<i>Image de TEM de Nps-Ag : a/ cubique, b/ triangulaire, c/corde, d/alignement de corde</i>	10
Figure III.1	<i>Synthèse de HA</i>	16
Figure III.2	<i>Poudre de l'hydroxyapatite obtenu</i>	17
Figure III.3	<i>Image par le microscope optique de l'hydroxyapatite (x100).</i>	17
Figure III.4	<i>Spectre IR de l'hydroxyapatite préparé à partir des coquilles d'œuf</i>	19
Figure III.5	<i>FTIR de l'hydroxyapatite préparé à partir des coquilles d'œuf calciné à 900°C.</i>	19
Figure III.6	<i>Spectre RDX de l'hydroxyapatite synthétisé à partir des coquilles d'œuf.</i>	20
Figure III.7	<i>Spectre RDX de l'hydroxyapatite</i>	21
Figure IV.1	<i>Synthèse de Np-Ag/amidon.</i>	24
Figure IV.2	<i>a/ solution de nitrate d'argent 2% ; b/ nanoparticule d'argent à 0,1% ; c/ nanoparticule d'argent à 1% ; d/ nanoparticule d'argent à 2% et e/ amidon à 1%.</i>	25
Figure IV.3	<i>Image microscopique des nanoparticules d'argent a/ 0,1%, b/1%, c/2% de nitrate d'argent dans 1% d'amidon.</i>	25
Figure IV.4	<i>UV-vis des Nps-Ag (0,1-1-2%) de nitrate d'argent et 1% d'amidon</i>	26
Figure IV.5	<i>FTIR comparatif entre Np-Ag 1% et l'amidon</i>	27
Figure IV.6	<i>Synthèse de Np-Ag/chitosan.</i>	28
Figure IV.7	<i>Membrane imprégné par des nanoparticules d'argent a/ 0,1%, b/1%, c/2% de nitrate d'argent</i>	28
Figure IV.8	<i>Image par microscope électronique à caméra de la membrane de chitosan imprégné par les Np-Ag 2% (x100).</i>	29

Figure IV.9	<i>UV-vis des membranes imprégnées par Nps-Ag (0,1-1-2% de nitrate d'argent)</i>	29
Figure IV.10	<i>FTIR comparatif entre chitosan et chitosan imprégné par les Nps-Ag 1%</i>	30
Figure V.1	<i>Schéma directeur du Protocole d'expérience</i>	31
Figure V.2	<i>Image resprésentent a et e/ HA, b, c et d/ HA/Np-Ag/Amidon contenant 0,1-1-2% de AgNO₃ respectivement, f,g et h/ HA/Np-Ag/chitosan contenant les même concentration de AgNO₃</i>	32
Figure V.3	<i>Images microscopiques des particules : a) HA/Np-Ag (0.1%)/amidon et b) HA/Np-Ag (0.1%)/chitosan (agrandissement x100)</i>	33
Figure V.4	<i>FTIR de HA, HA/Np-Ag 0,1-1-2% (amidon).</i>	34
Figure V.5	<i>FTIR de HA, HA/Np-Ag 0,1-1-2% (chitosan).</i>	34
Figure V.6	<i>FTIR de HA, Np-Ag/amidon, Np-Ag/chitosan</i>	35
Figure V.7	<i>FTIR de HA, HA/Np-Ag/amidon et HA/Np-Ag/chitosan</i>	35
Figure VI.1	<i>Lecteur des zones d'inhibition (FISHER-LILLY).</i>	38
Figure VI. 2	<i>Protocole expérimental de test de disque diffusion</i>	38
Figure VI.3	<i>Images représentent les zones d'inhibition avec a/ E. coli, b/S.aureus</i>	39
Figure VI.4	<i>Histogramme représentent la zone d'inhibition de HA/Np-Ag/Amidon (différentes concentration) avec S.aureus et E. coli</i>	40
Figure VI.5	<i>Histogramme représentent la zone d'inhibition de HA/Np-Ag/chitosan (différentes concentration) avec S.aureus et E. coli</i>	40
Figure VI.6	<i>Histogramme représentent la zone d'inhibition de HA/Np-Ag/Amidon et HA/Np-Ag/chitosan (différentes concentration) avec S.aureus</i>	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
Tableau I.1	<i>Les différents phosphates de calcium usuels</i>	02
Tableau I.2	<i>Composition chimique (% m) des phases minérales de l'émail, de la dentine et de l'os</i>	04
Tableau I.3	<i>Quelques propriétés de l'hydroxyapatite</i>	07
Tableau III.1	<i>Bande de FTIR et leurs groupements correspondant.</i>	18
Tableau III.2	<i>représentation de quelque donnée obtenue par RDX de l'hydroxyapatite</i>	22
Tableau V.1	<i>Attribution des Bandes caractéristiques des produits synthétisés</i>	36

Table des matières

	Titres	Pages
	Résumé	
	Remerciements	
	Liste des figures	
	Liste des tableaux	
	Table des matières	
	Introduction générale	
	Chapitre I : Revue bibliographique	
I.	Généralité sur les phosphates de calcium.....	1
1.	Les apatites biologiques.....	2
a.	Constitution du tissu osseux.....	2
i.	L'os.....	2
ii.	La dent.....	3
2.	Phosphate de calcium apatite.....	5
a.	Hydroxyapatites.....	5
i.	Synthèse des l'hydroxyapatites.....	6
ii.	Propriétés de l'hydroxyapatite.....	7
iii.	Applications de l'hydroxyapatite.....	7
II.	Notions sur les nanoparticules d'argent.....	8
1.	Synthèse verte des nanoparticules d'argent.....	8
a.	Méthode du polysaccharide	8
b.	Méthode de Tollens.....	9
c.	Méthode de l'irradiation	10
d.	Méthode biologique.....	10
e.	Méthode des Polyoxometalates	11

f. Hydroxyapatite dopé par l'argent.....	11
2. Toxicité de l'argent.....	11
3. Propriétés biologique	11
a. Effet de la taille et forme des Np-Ag sur l'activité antibactérienne	12
b. Propriété antivirale des nanoparticules d'argent.....	12
c. Propriété fongicide des nanoparticules d'argent.....	13
 Chapitre II : Partie expérimentale	
III. Préparation des nanoparticules d'hydroxyapatite.....	14
1. Mode opératoire.....	15
2. Caractérisation de l'hydroxyapatite.....	16
3. Interprétation des résultats.....	17
a. Aspect générale de l'hydroxyapatite.....	17
b. Analyse par spectroscopie IR	18
c. Analyse par Rayon-X.....	19
IV. Préparation des nanoparticules d'argent.....	23
1. Réduction en présence d'amidon.....	23
a. Caractérisation des Np-Ag obtenus par voie 'd'amidon '.....	24
b. Interprétation des résultats	24
i. Aspect physique.....	24
iii. Analyse par microscopie optique.....	25
iv. Analyse par Uv-vis.....	25
v. Analyse par FTIR.....	26
2. Réduction en présence du chitosan.....	27
a. Aspect physique.....	28
b. Analyse par microscopie optique	28
c. Analyse par Uv-vis.....	29
d. Analyse par FTIR.....	30
V. Préparation des bio-composites HA/Np-Ag	31
1. Analyse par microscopie optique.....	32
2. Analyse par FTIR.....	33
VI. Etude de l'activité antibactérienne.....	37
1. Protocole expérimental.....	38
2. Interprétation des résultats.....	39

Table des matières

Conclusion générale.....	42
Références bibliographique	

Introduction générale

L'os humain est un composé hybride de l'inorganique/organique composé de 70% phosphate de calcium, 30% composant organique dont une grande part est le collagène [1], c'est en 1926 que DE JONG a montré grâce à l'RDX une analogie entre le minéral osseux et le phosphate de calcium synthétique [2]. L'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (HA) est un composant minéral. Il est le biomatériau le plus recherché et utilisé pour la reconstruction du squelette osseux (implant) grâce à ses propriétés de compatibilité, de non toxicité et d'ostéoconductivité [3,4].

Il est connu que l'implant orthopédique est particulièrement sensible à la contamination bactérienne en raison de la réponse immunitaire du patient qui repousse les germes sur sa surface. La bactérie génère rapidement une muqueuse protectrice et mute dans un mode inactif, devenant ainsi peu sensible aux antibiothérapies systémiques: le traitement local devient alors très important. [5].

Ainsi, pour tenter de résoudre le problème de l'infection sur prothèse, de nouvelles stratégies d'intervention ce sont développées. Différentes approches ont été développées afin de réduire l'attachement des bactéries aux matériaux polymères. Les techniques d'imprégnation par des antiseptiques et/ou des antibiotiques ont été largement rapportées [5,6]. D'autres techniques telles la micro- et nano-encapsulation des antibiotiques dans les matrices d'hydrogel permettant un relargage contrôlé de la molécule active ont été également considérées. [5].

Pour rappel la première tentative relative à l'addition d'antibiotique au phosphate de calcium a été introduite par Buchholz et Engelbrecht en 1970. La gentamicine et l'oxytétracycline sont les antibiotiques de choix. De nombreuses études ont montré que le mélange phosphate de calcium/antibiotiques présente une meilleure efficacité dans la prévention des infections profondes les plus graves, comparativement à l'utilisation des phosphates de calcium ordinaire [5, 6].

Récemment, d'autres possibilités ont été également envisagées mettant en compétition l'argent à certains antibiotiques afin de réduire les infections lors de la pose d'implants orthopédiques [7].

En effet, l'incorporation de l'argent sous forme de sels AgNO_3 ou de nanoparticules d'argent (Nps-Ag) en présence ou non de l'antibiotique dans l'hydroxyapatite en faible dose a montré une bonne activité antimicrobienne. Ainsi différentes méthodes ont été proposées pour préparer le complexe HA-Ag [3, 4, 8 à 12].

Pour les contraintes écologiques connues (toxicité, pollution,...), la recherche de matériaux d'origine naturelle à fort apport de calcium ou de phosphate est très actuelle. A titre d'exemple, le corail et l'os d'origine bovine ont été exploités ; mais peu de travaux ont été consacrés à l'étude des déchets de coquilles d'œuf. En effet, les déchets de coquilles d'œuf comme bio-ressources renfermant un taux de 94-97% de carbonate de calcium peuvent constituer une source intéressante pour la production des hydroxyapatites. Ainsi, ils représentent un intérêt certain sur le plan économique mais aussi environnemental. [1, 14 à 16].

Notre travail est justement consacré en premier lieu à la synthèse de l'hydroxyapatite à partir du déchet des coquilles d'œuf source de calcium qu'on a récupéré des restaurateurs de la région. Notre objectif est de préparer à partir de l'hydroxyapatite synthétisée un biomatériau complexe à base de HA dopé de nanoparticules d'argent susceptible de répondre à des besoins orthopédiques, dentaires et même cosmétiques. Dans ce présent biomatériau, les nanoparticules de HA constituent une matrice « *bio-vecteurs* » mais aussi comme un microréservoir pour la libération de molécules actives tels ions d'argent/ou nanoparticule d'argent, (*Drug Delivery System (DDS)*).

Deux méthodes de synthèse de nanoparticules d'argent sont proposées dans cette étude en utilisant la réduction par l'intermédiaire de bio-polymères (chitosan et amidon). Les produits obtenus sont caractérisés par microscopie optique, spectroscopie IR, spectroscopie UV-vis et RDX. Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antibactérienne des différents produits synthétisés sur des Grams positifs *E.Coli* et des Grams négatifs *St. Aureus* en mesurant le diamètre des zones d'inhibition respectives.

La présente contribution que nous proposons peut être résumée par les parties essentielles regroupées dans deux chapitres:

Introduction générale

Chapitre 1 : Revue bibliographique.

- I. Généralités sur les phosphates de calcium.
- II. Notions sur les nanoparticules d'argent.

Chapitre 2 : Expérimentation

- III. Synthèse de l'hydroxyapatite.
- IV. Synthèse des nanoparticules d'argent.
- V. Synthèse du bio-composite HA-NpAg.
- VI. Etude de l'activité antibactérienne.

Conclusion générale

- Le premier chapitre constitué de deux parties, est consacré à une revue bibliographique assez succincte (ne dépassant pas les treize (13) pages comme il a été recommandé) sur les généralités, définitions, méthodes de synthèse de l'hydroxyapatites et de l'argent.

- Le deuxième chapitre qui représente notre travail expérimental qui est scindé en quatre parties essentielles:

- La première partie est relative à la synthèse et la caractérisation de HA. L'analyse structurale et morphologique par RX, FTIR et microscopie optique de celui-ci est considérée.

- La deuxième partie est consacrée également à la synthèse et caractérisation de nanoparticules d'argent (Np-Ag).

- La troisième partie traitera la méthodologie pour l'élaboration de biomatériaux complexes de HA/Np-Ag/ en présence de l'amidon et HA/Np-Ag/ en présence du chitosan. Les produits obtenus seront également analysés par FTIR et par microscopie optique.

- La quatrième partie est relative à l'étude de l'activité antibactérienne des différents produits synthétisés sur deux espèces de bactéries pathogène E. coli et St. Aureus.

Et en fin, une conclusion qui rapportera les principaux points, observations et suggestions que nous jugeons intéressants.

Chapitre 1:
Revue bibliographique

I. Généralités sur les phosphates de calcium :

Les phosphates de calcium constituent la phase minérale majeure des tissus durs des vertébrés. Choisis parmi les biomatériaux existants, ils firent l'objet de plusieurs travaux dont l'application était biologique et clinique (implants orthopédique et dentaire).

En outre, leurs compositions chimiques qui sont proches de l'os et des dents, leurs propriétés de biocompatibilité et de bio-activité les rendent utilisables pour les substitutions osseuses permettant un comblement lors de défaut et/ou une libération de principe actif.

En effet, les phosphates de potassium n'ont pas un pouvoir de substituer les greffes osseuses mais à trouver leur place dans l'arsenal thérapeutique permettant de faire face à une perte de substance osseuse.

Le rapport Ca/P a été considéré fortement comme un paramètre très important telles que les propriétés mécaniques, physico-chimique et taux de biodégradation qui dépendaient de lui [17,18] ; Ainsi, en ayant le rapport molaire Ca/P, nous pouvons définir les différentes familles des phosphates de calcium représentées dans le *Tableau I.1* :

Symbole	Nom	Formule	Rapport Ca/P
MCPM	Phosphate monocalcique mono hydraté	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, \text{H}_2\text{O}$	0,50
MCPA	Phosphate monocalcique anhydre	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,50
PPC	Pyrophosphate de calcium	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,00
DCPA	Phosphate dicalcique anhydre	$\text{CaH}(\text{PO}_4)$	1,00
DCPD	Phosphate dicalcique dihydraté	$\text{CaHPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
OCP_t	Phosphate octocalcique triclinique	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6, 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
OCP_a	Phosphate octocalcique apatitique	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_{2,5}(\text{PO}_4)_{3,5}(\text{OH})_{0,5}$	1,33
OCP_{am}	Phosphate octocalcique amorphe	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4, n\text{H}_2\text{O}$	1,33
TCP	Phosphate tricalcique anhydre	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
TCPa	Phosphate tricalcique apatitique	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)\text{OH}$	1,50
TCPam	Phosphate tricalcique amorphe	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6, n\text{H}_2\text{O}$	1,50
HAP	Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
TTCP	Phosphate tétracalcique	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_2$	2,00

Tableau I-1 : Les différents phosphates de calcium usuels [13,19].

1. Les apatites biologiques :

a. Constitution du tissu osseux :

Le tissu osseux naturel se confond à un biomatériau « bio-composite » constitué de fibre organique « collagène » inscrite dans un matériau minéral qui a été identifié comme étant un phosphate de calcium apatite poly-substitué. La répartition massique des deux phases dans le tissu est variable suivant la partie du corps considérée et a ainsi amené à distinguer deux types de tissus osseux : l'os et la dent [13].

i. L'os :

La composition massique moyenne de l'os naturel est la suivante : 15% de phase organique constituée de cellules (ostéoclastes, ostéoblastes, ostéocytes) et de tissu ostéoïde (collagène, glycoprotéines, protéoglycanes), 60% de phase minérale (composée d'environ 75% en masse d'hydroxyapatite) et 25% d'eau. La résistance et la légèreté de l'os

s'expliquent par son architecture associant deux types de macrostructures osseuses (os spongieux et os compact) [13, 20].

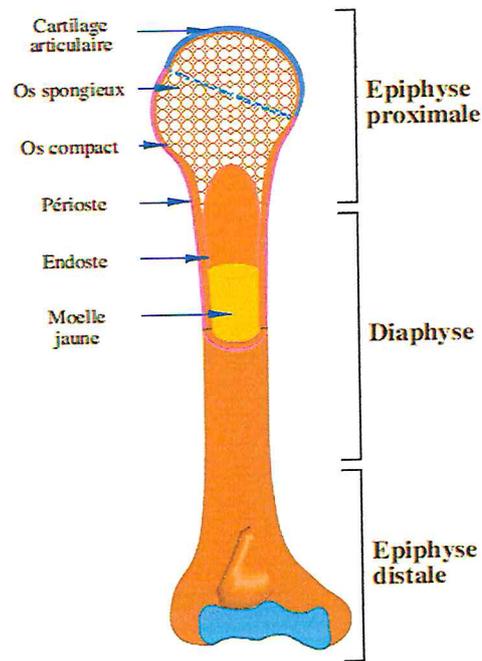


Figure I.1: Coupe longitudinale schématique d'un os long [20].

ii. La dent :

La dent supporte plusieurs phénomènes physiques et chimiques (frottement, compression et surtout les attaques chimiques dues à l'acidité des aliments ou la production du métabolisme bactérienne). La dent est composée de deux tissus osseux :

- L'émail est le plus minéralisé et le plus dur de tout le corps humain. Il recouvre la partie de la dent exposée à l'environnement buccal, et la protège contre les contraintes mécaniques et les agressions chimiques. Il possède, en outre, une structure cristalline contenant plus de 96% en poids de matériau inorganique. À l'origine, les carbonates que possède l'émail ressemblent à l'hydroxyapatite, le reste est constitué de 3% d'eau et 1% de matière organique comprenant les lipides et protéines. La dimension moyenne du cristallite est approximativement de 30nm d'épaisseur pour 60nm de largeur et quelques microns de longueur, la dimension peut varier selon la profondeur.

- La dentine (ou ivoire) recouvre et protège la pulpe dentaire. Elle se compose de 75% de phase minérale, de 20% de phase organique (collagène) et de 5% d'eau [20,21].

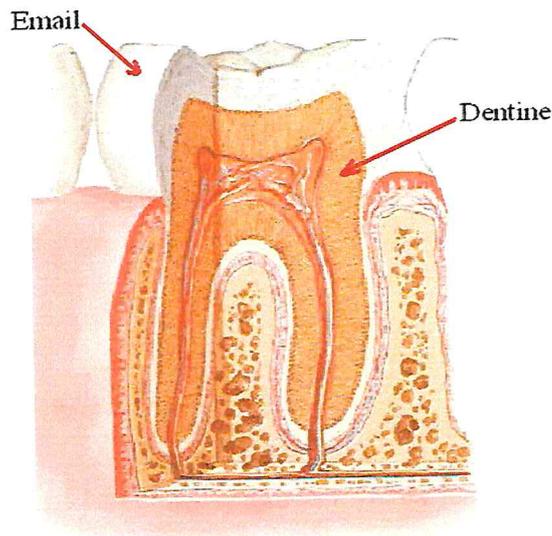


Figure I.2 : Coupe transversale schématique d'une molaire [21].

Elément	Email	Dentine	Os
Ca	37,6	40,3	36,6
P	18,3	18,6	17,1
CO ₂	3,0	4,8	4,8
Na	0,7	0,1	1,0
K	0,05	0,07	0,07
Mg	0,2	1,1	0,6
Sr	0,03	0,04	0,05
Cl	0,4	0,27	0,1
F	0,01	0,07	0,1
Rapport molaire Ca/P	1,59	1,67	1,65

Tableau I.2 : Composition chimique (% m) des phases minérales de l'émail, de la dentine et de l'os [13].

Les données présentées dans le **tableau I-3** montrent les nombreux minéraux que contiennent les phases minérales des tissus osseux. Les quatre éléments qui excellent sont le calcium Ca²⁺, le phosphore (PO₄³⁻, HPO₄²⁻), le carbone (CO₃²⁻) et l'oxygène (O²⁻, OH⁻, PO₄³⁻,

HPO₄²⁻). Les teneurs en sodium, magnésium et chlore varient de manière importante suivant le tissu considéré. Les autres éléments, tels que le fluor, le strontium et le potassium, font office de traces.

2. Phosphate de calcium apatite :

Parmi ces phosphates de calcium, les apatites constituent une famille de composés ioniques décrite par la formule chimique $Me_{10}(XO_4)_6(Y)_2$ dans laquelle [13, 19]:

Me : métal bivalent (Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺ ...),

XO₄ : anion trivalent (PO₄³⁻, AsO₄³⁻, VO₄³⁻ ...),

Y : anion monovalent (F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, OH⁻ ...).

Les apatites constituent donc une grande famille de composés inorganiques isomorphes. La plupart des études menées sur les apatites ont porté leur plus grand intérêt aux phosphates de calcium en raison notamment de leur biocompatibilité et de leur structure cristalline permettant diverses substitutions de cations et/ou d'anions. En effet, les phosphates de calcium ont souvent une forte capacité d'immobiliser des ions quand elles sont mises en contact avec des solutions aqueuses : les ions Ca²⁺ peuvent être substitués (totalement ou partiellement) par des cations tels que les ions de métaux toxiques, et les ions PO₄³⁻ peuvent être remplacés par des anions tels que AsO₄³⁻, CO₃²⁻, ...etc [19].

a. Hydroxyapatites :

Les hydroxyapatites phosphocalciques minérales et biologiques sont des phosphates de calcium apatite qui contiennent souvent des impuretés : le rapport molaire Ca/P est de 1,67, valeur caractéristique de l'hydroxyapatite pure dont la formule générale est :



L'hydroxyapatite est dite «bio active», du fait de sa capacité d'engendrer ou de moduler une activité biologique. Ce composé est le plus utilisé comme biomatériau. Son intérêt clinique résulte de sa parfaite biocompatibilité et de sa bio-activité [22].

i. Synthèse des hydroxyapatites :

Parmi les techniques les plus couramment utilisées, on peut citer la synthèse hydrothermale [1, 23, 24], la méthode sol-gel [25, 30 à 32], la pyrolyse [1,25], et la précipitation [1, 26, 27].

En général, les synthèses de l'HA s'opèrent soit par voie sèche où les précurseurs sont mélangés à l'état solide, soit en milieu humide en utilisant des réactifs en solution.

La synthèse chimique par voie humide est la méthode la plus utilisée. Cependant, cette méthode a quelques inconvénients, principalement la difficulté de maintenir le pH au dessus de 9 pour éviter la formation d'HA déficiente en calcium qui se transforme facilement en phosphate tricalcique (TCP) lors du frittage. Généralement, elle permet d'obtenir de fines particules (poudres) d'HA de grande surface spécifique. Cependant, les HA obtenues par ce processus de synthèse ne sont pas toujours stœchiométriques et ont une basse cristallinité dont le degré dépend d'ailleurs de plusieurs paramètres tels que le pH, la température et le temps de vieillissement des solutions ainsi que la nature et la concentration des réactifs mis en jeu. [19].

La synthèse à l'état solide met en jeu des poudres de réactifs tels que $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}(\text{s})$ avec $\text{Ca}(\text{OH})_2(\text{s})$ dont le mélange est ensuite chauffé à très haute température, de 300 à 1200°C . Comparativement à la préparation par voie humide, la synthèse par voie sèche a le grand avantage d'atteindre une composition stœchiométrique mais son coût reste élevé eu égard aux températures élevées.

On distingue aussi la synthèse mécano-chimique dont le principe consiste en la perturbation par pression des espèces liées en surface pour accroître les réactions thermodynamiques et cinétiques entre les solides [19].

Autre voie plus récente (voie biomimétique) s'inspirant des conditions in-situ est utilisée pour reproduire les phosphate de calcium (HA) ayant des propriétés proches de l'os naturel [28,29].

ii. Propriétés de l'hydroxyapatite :

Nous avons regroupé les principales propriétés de l'hydroxyapatite dans le **Tableau I.3**.

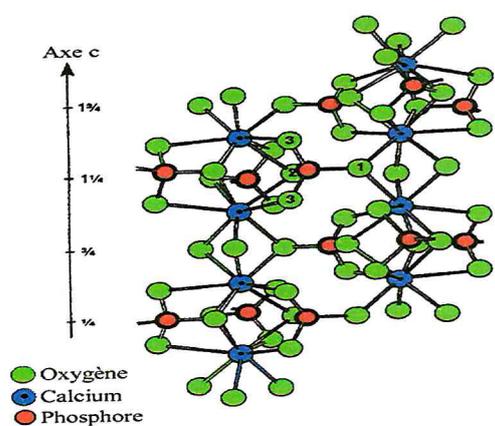
<i>Aspect physique</i>	Poudre blanche, fine et poussiéreuse
<i>Densité</i>	3,156 g/cm ³
<i>pKs à T=25°C et pH=[5-7]</i>	Entre 115 et 117
<i>Solubilité</i>	Dans l'acide nitrique
<i>Dureté (échelle de Mohs)</i>	5
<i>Indice de réfraction</i>	n _o = 1,633-1,667 n _e = 1,630-1,664
<i>Structure cristalline</i>	Hexagonal, groupe spatial P6 ₃ /m, paramètres de maille a = 9,37Å et c = 6,88Å 
<i>Propriétés biologique</i>	Biocompatible, osteoconductible et bioactive

Tableau I.3 : *Quelques propriétés de l'hydroxyapatite [30].*

iii. Applications de l'hydroxyapatite :

En raison de ses propriétés de bio-activité et de biocompatibilité, l'hydroxyapatite est largement utilisée dans le domaine médical et dentaire [31,32].

L'hydroxyapatite synthétique est également utilisée couramment comme phase stationnaire dans les colonnes chromatographiques pour la séparation de diverses molécules.

Dans le domaine de la catalyse hétérogène, l'hydroxyapatite joue aussi un rôle important comme support catalytique en synthèse organique [33,34] ou en catalyse

asymétrique pour l'obtention de composés énantiomères purs [35]. Elle est également utilisée comme catalyseur dans l'industrie des polymères pour la déshydrogénation et la déshydratation des alcools primaires, ainsi que dans l'industrie des sucres.

Les apatites sont aussi utilisées comme additifs potentiels pour le traitement des sols pollués [36,37] et comme matériaux de remblayage entrant dans la composition des barrières construites pour le confinement des déchets radioactifs [38].

II. Notions sur les nanoparticules d'argent:

1. Synthèse verte des nanoparticules d'argent :

a. Méthode du Polysaccharide :

Dans cette méthode, Nps-Ag sont préparés en utilisant de l'eau comme un dissolvant écologiquement bénin et des polysaccharides comme un agent réducteur.

Parmi les polysaccharides utilisés, l'amidon est mélangé dans la solution pour éviter l'usage de dissolvants organiques relativement toxiques. Il est connu que les interactions entre amidon et Nps-Ag sont faibles et peuvent être réversibles à plus hautes températures, permettant ainsi la séparation des particules synthétisées [39].

Dans une autre étude, Nps-Ag stable (10-34 nm) ont été synthétisées par autoclave : une solution d'AgNO₃ et d'amidon (agent stabilisant/réducteur) à 15 psi et 121°C pour 5 min [40].

Aussi, Nps-Ag ont été synthétisés en utilisant l'héparine négativement chargée comme un agent réducteur/stabilisant en chauffant une solution d'AgNO₃ en présence d'héparine à 70°C pour 8 h [41].

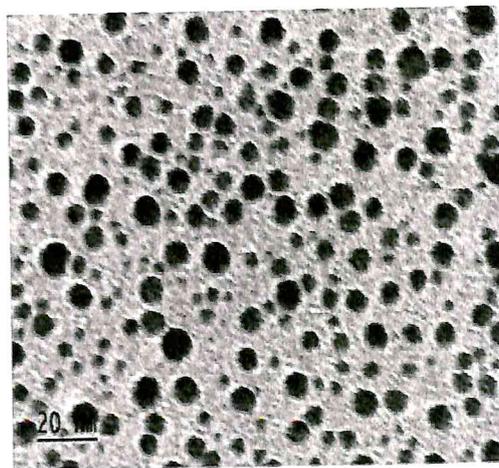


Figure II.1 : Image du TEM de nanoparticules d'argent synthétisé par l'amidon [42].

b. Méthode de Tollens :

La synthèse par la méthode de Tollens donne des Nps-Ag avec une dimension contrôlée [43,44]. La réaction de Tollens implique la réduction d' $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ (réactif de Tollens), en présence d'un aldéhyde, selon la réaction (1):



Dans la procédure de modification de Tollens, les ions Ag^+ sont réduits par saccharides en présence du gaz ammoniac. $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ est un ion complexe stable qui résulte de l'affinité forte de gaz ammoniac pour Ag^+ , par conséquent la concentration du gaz ammoniac et la nature du réducteur jouent un rôle majeur dans la dimension des Np-Ag [45].

Également, Nps-Ag ont été synthétisés par réduction de $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ en présence de deux monosaccharides (glucose et galactose) et deux disaccharides (maltose et lactose) [46]. La dimension des particules moyennes a été de 25–450 nm.

Les Nps-Ag ont été stabilisés par deux surfactants : sodium dodecyl sulfate-SDS et polyoxyéthylènesorbitane monooleate-Tween 80, et un polymère : polyvinylpyrrolidone-PVP 360 [47,48].

NPs-Ag de plusieurs morphologies avec des diamètres <10 nm ont été synthétisés dans l'eau en ajustant les concentrations de bromure du n-hexadecyltriméthylammonium (HTAB) et le réactif Tollens, $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$, à 120 °C [49,50]. Images TEM de NPs-Ag obtenues par cette méthode sont montrées dans *Figure II.2*

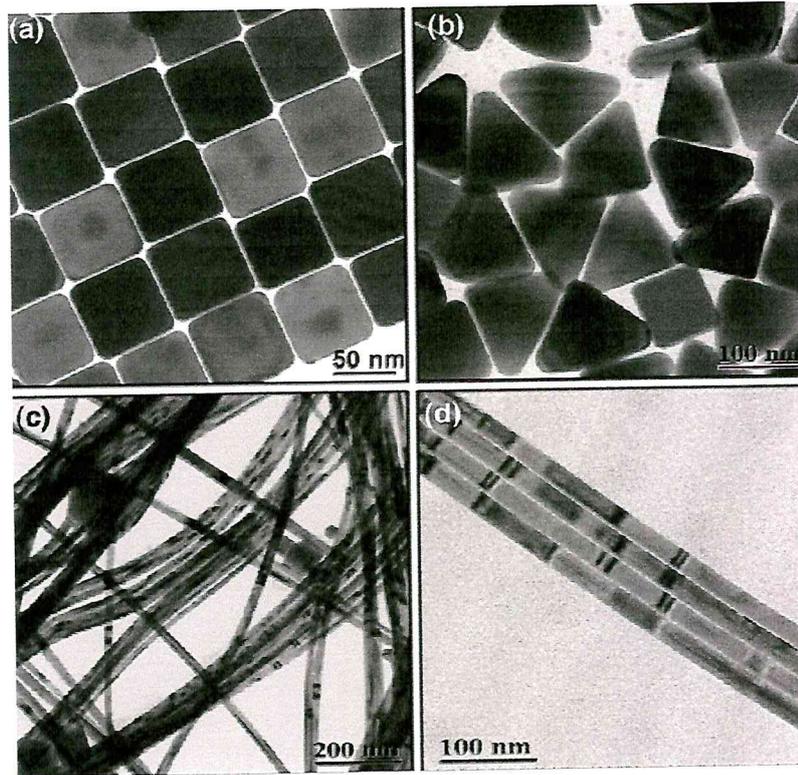


Figure II.2 : Image de TEM de Nps-Ag : a/ cubique, b/ triangulaire, c/corde, d/alignement de corde[50]

c. Méthode de l'irradiation :

NPs-Ag peuvent être synthétisés avec succès en utilisant une variété de méthodes de l'irradiation (l'irradiation laser, l'irradiation de micro-onde, radiation ioniser, radiation gamma) [8].

d. Méthode biologique :

Les extraits de bio-organismes peuvent jouer le rôle de réducteur dans la synthèse des NPs-Ag. La réduction d'ions Ag^+ par combinaisons de biomolécules trouvées dans ces extraits tels que les enzymes, protéines, acides aminés, vitamines et polysaccharides (chitosan a partir des Pleurotus Mutilus et carapace des crustacés) [51 à 53].

e. Méthode des Polyoxometalates :

Les Polyoxometalates POMs, ont la possibilité de synthétiser les NPs-Ag par ce qu'ils sont solubles dans l'eau et peuvent subir une réaction redox de multi-électron sans changer leur structure [54, 55]. Par exemple, les NPs-Ag ont été synthétisés en éclairant une solution de POM/S/Ag⁺ désaérer, (POM: [PW₁₂O₄₀]³⁻, [SiW₁₂O₄₀]⁴⁻; S: prpan-2-ol ou 2,4-dichlorophenol). Dans cette méthode, les POMs servent de photocatalyseurs, d'agent réducteur, et de stabilisateur [55]. Dans une autre étude, la synthèse consiste à stabiliser les nanostructures d'Ag avec un mélange de valence Mo^V-Mo^{VI} et en présence de POMs le tout dans l'eau et à température ambiante [56]. Cette méthode n'a pas utilisé de catalyseur ni d'agent de la gravure sélectif.

f. Hydroxyapatite dopé d'argent :

Récemment, une synthèse nanocristalline d'Ag anisotrope a été accomplie en réduisant l'ion Ag⁺ aqueux par le transfert de l'électron sur la surface d'hydroxyapatite (HA). Les groupements hydroxyles ont joué deux rôles : celui de réducteur et d'agent obligatoire pour donner des Nps-Ag en forme de triangle plat hautement orienté et en forme d'aiguille [57]. Un processus de micro-onde a aussi été appliqué pour synthétiser le nanocomposite HA-Ag substitué avec une longueur de 60–70 nm et largeur de 15-20 nm [58].

2. Toxicité de l'argent :

Les nanoparticules d'argent dans la plupart des études ont été suggérées pour être non-toxiques, mais dû à leur petite dimension et propriétés variables, elles sont considérées par d'autres comme étant préjudiciables à l'environnement [59]. La toxicité de différentes dimensions de nanoparticules d'argent sur les cellules de foie de rat, et ont conclu que la cytotoxicité des nanoparticules d'argent à l'activité du mitochondrial augmente avec l'augmentation dans la concentration de nanoparticule d'argent [60].

3. Propriétés biologique :

Les nanoparticules d'argent montrent une propriété antimicrobienne effective comparée aux autres sels dus à leur grande région de la surface qui fournit un meilleur contact avec les

micro-organismes. Les nanoparticules sont attachées à la membrane cellulaire et pénètrent à l'intérieur des bactéries. Quand les nanoparticules d'argent entrent dans la cellule bactérienne, ils forment un poids moléculaire bas dans le centre des bactéries auxquelles la bactérie conglomère et protège ainsi l'ADN à partir des ions d'argent. Les nanoparticules attaquent de préférence la chaîne respiratoire, pour une division cellulaire menant finalement à la mort cellulaire. Les nanoparticules libèrent des ions d'argent dans les cellules bactériennes qui rehaussent leur activité bactéricide [61 à 63].

a. Effet de la taille et forme des Np-Ag sur l'activité antibactérienne :

La dimension de la nanoparticule implique une grande région de la surface pour entrer au contact avec les cellules bactériennes dans laquelle il aura un plus grand pourcentage d'interaction avec les particules [62,64 à 66]. Les nanoparticules plus petites que 10 nm réagissent réciproquement avec les bactéries et produisent des effets électroniques qui rehaussent la réactivité des nanoparticules. Donc, il est corroboré que l'effet bactéricide des nanoparticules d'argent dépend de la dimension [62,67].

L'efficacité antimicrobienne des nanoparticules dépend aussi des formes des nanoparticules. Cela été confirmé par l'étude de l'inhibition de la croissance bactérienne avec différentes formes de nanoparticules [62]. D'après [66] les nanoparticules triangulaires tronquées montrent l'inhibition bactérienne en ayant 1µg d'argent. Dans le cas des nanoparticules sphériques 12.5µg d'argent total est exigé. Et pour les nanoparticules triangulaires la quantité d'argent nécessaire à l'inhibition bactérienne est de 50 à 100 µg. Donc, les formes des nanoparticules d'argent réagissent différemment avec les cellules bactériennes.

b. Propriété antivirale des nanoparticules d'argent :

Les propriétés antivirales sélectives de nanoparticules d'argent a été étudié [68] et confirmée par analyse de MTT (méthode rapide de numération des cellules vivantes) qui n'a indiqué aucune cytotoxicité aigue associée aux nanoparticules d'argent vers les cellules Hut/CCR5 avec plus de 80% de survie cellulaire dont la concentration de nanoparticules d'argent été de 50 µM.

c. Propriété fongicide des nanoparticules d'argent:

KIM et Al estiment l'efficacité des nanoparticules d'argent comme agent fongicide envers la levure (isolée du Mastites de bovin; ATCC19636) [69]. L'effet inhibiteur minimum des nanoparticules d'argent (diamètre ~134 nm) envers la levure a été trouvé pour être entre 6.6-13.2 nM.

Chapitre 2:
Partie expérimentale

Nous présentons dans ce chapitre les descriptions des synthèses adoptées pour l'obtention de l'hydroxyapatite, des nanoparticules d'argent et des complexes résultants en présence des réducteurs tels l'amidon et le chitosan. Les résultats sur la caractérisation et l'identification des produits obtenus sont analysés et discutés.

La démarche expérimentale suivie est subdivisée en quatre parties:

- La première partie est relative à la synthèse et la caractérisation de HA. L'analyse structurale et morphologique par RX, FTIR et microscopie optique de celui-ci est considérée.
- La deuxième partie est consacrée également à la synthèse et caractérisation de nanoparticules d'argent (Np-Ag).
- La troisième partie traitera la méthodologie pour l'élaboration de biomatériaux complexes de HA/Np-Ag/ en présence de l'amidon et HA/Np-Ag/ en présence du chitosan. Les produits obtenus seront également analysés FTIR et microscopie optique.
- La quatrième partie est relative à l'étude de l'activité antibactérienne des différents produits synthétisés sur deux espèces de bactéries pathogène E. coli et St. Aureus.

III. Préparation de nanoparticules d'hydroxyapatite :

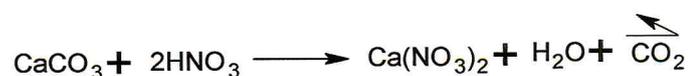
L'hydroxyapatite 'HA' est le composant minéral principal de l'os humain, c'est pour sa forme synthétique, sa non-toxicité locale ou systémique, et pour ses propriétés d'osteoconductive qu'il est considéré comme le biomatériau par excellence, d'où sa large gamme d'utilisation pour la reconstruction du squelette (implants) [3].

Plusieurs études ont été rapportées sur les tentatives de produire ou synthétiser l'hydroxyapatite en recherchant différentes sources de calcium et de phosphore. Le déchet des coquilles d'œuf représente 11% du poids total d'œuf et contient 94-97% de carbonate de calcium, 1% de phosphate de calcium, 4% de matière organique et 1% de carbonate de magnésium [15,16], Dans ce contexte, l'usage des coquilles d'œuf a pour objectifs: 1/ l'extraction des carbonates de calcium comme source de matière première pour la préparation du HA; 2/ sa revalorisation (recyclage) [16].

Beaucoup de Travaux ont été effectués afin d'obtenir les poudres nano-classées et faiblement agglomérées d'HA (*voir chapitre 1*). Parmi le processus de précipitation le plus rapporté, la neutralisation d'une suspension de chaux avec de l'acide ortho-phosphorique était une méthode simple, bon marché, non-polluante et sans décharge d'ions de nitrate, d'ammonium et de phosphate [70,71]. Mais cette méthode a mené à une poudre de basse qualité avec des particules ayant une grande dimension et beaucoup d'agglomérat attribués à la grande vitesse lors de croissance en cristal d'HA dans des solutions sursaturées, et les interactions hydrogène parmi les particules d'HA [72]. Dans les travaux de Li et al. [71] L'acide citrique (ACi) a été présenté comme agent de chélation synthétisant les fines poudres d'HA avec une certaine nano-cristallinité et en diminuant le taux de CaO dans le biomatériau [10].

1. Mode Opérateur:

D'abord les coquilles crues d'œufs ont été nettoyées avec de l'eau suivie de l'ébullition pour ½ heure pour enlever leur enveloppe interne. Elles ont été alors séchées durant toute la nuit à 110°C dans l'étuve puis broyées. La poudre des coquilles d'œufs est utilisée pour synthétiser l'HA selon le procédé suivant. Une quantité stœchiométrique de poudre de coquilles d'œufs a été dissoute dans une solution concentrée de HNO₃ et filtrée pour obtenir une solution claire. Pour enlever toute trace de matière organique, le carbonate de calcium contenu dans les coquilles est converti en nitrate de calcium selon la réaction :



Le pH de la solution est augmenté jusqu'au ~ 9,5 en ajoutant de l'ammoniaque. Une quantité requise de K₂HPO₄, 12H₂O de 1M (comme précurseur de phosphore, P) et une autre quantité d'acide citrique 1M (agent chélateur) sont ajoutées goutte à goutte dans le mélange réactionnel. Un précipité gélatineux blanc de l'HA est formé selon la réaction suivante :



On laisse toute la nuit la solution se décanté, résultant en deux phases qui sont filtrées et lavées (4 fois) avec de l'eau distillée en abondance et suivies par un séchage à 70°C pour enlever les traces de l'eau.

La procédure expérimentale adoptée pour la synthèse de HA ainsi que les conditions opératoires sont schématisées selon l'organigramme de la **figure III.1**.

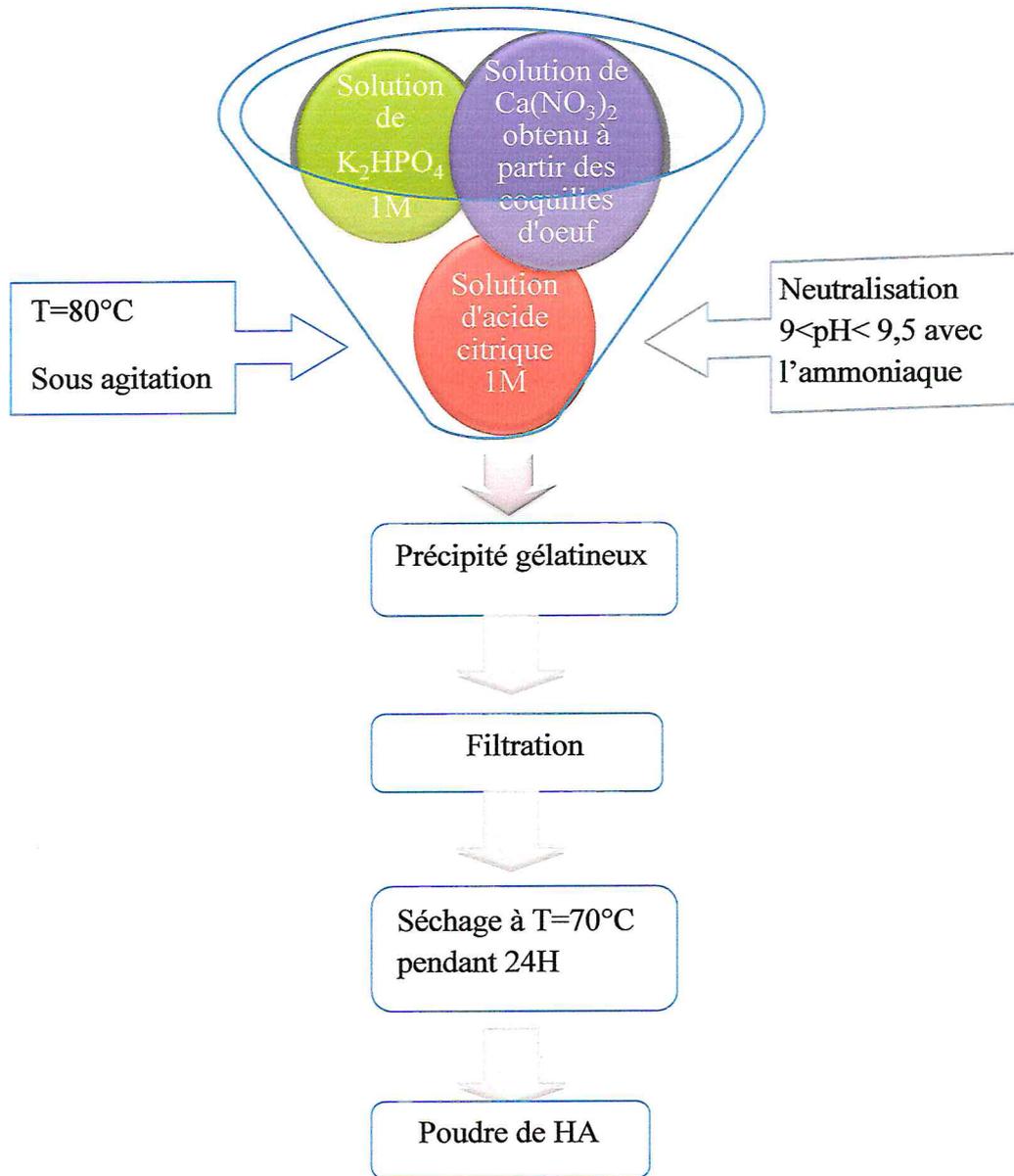


Figure III.1 : synthèse de HA

2. Caractérisation de l'hydroxyapatite :

La spectroscopie infrarouge par transformation de Fourier 'FTIR' (FT/IR-4100 JASCO, Laboratoire de Physique Chimie Moléculaire et Macromoléculaire, Université de Blida) a été utilisé pour caractériser la structure et identifier les principaux groupements fonctionnels.

L'RDX (X'TERT, université de Laghouat) a été utilisé également pour l'identification des produits obtenus. Nous avons également étudié la morphologie de l'état de surface par microscopie optique à caméra (TOPIC 102M, département de biologie, Université de Blida).

3. Interprétation des résultats :

a. Aspect général de l'hydroxyapatite :

La *figure III. 2* présente un échantillon type de la poudre de HA de couleur blanche et finement divisée. Grâce au microscope type TOPIC 102M, nous avons estimé la taille des particules variant approximativement de 500 à 800nm. A titre d'illustration la *figure III.3* montre un aspect général de l'état de surface de HA, irrégulier et rugueux. On peut observer des amas de particules de HA de taille approximative de 5-10 μ m.



Figure III.2 : Poudre de l'hydroxyapatite obtenu.

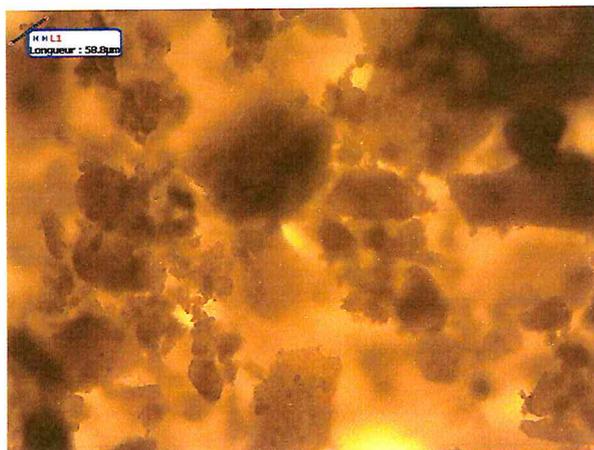


Figure III.3: Image par le microscope optique de l'hydroxyapatite (x100).

b. Analyse par spectroscopie IR :

Le spectre FTIR de l'hydroxyapatite est présenté dans la **figure III.4**, alors que dans le **Tableau III.1** sont regroupés les différentes attributions de groupements fonctionnels du spectre de HA avec les bandes correspondantes. On peut observer des bandes autour de 829-1034 cm^{-1} , qui sont caractéristiques de la structure cristalline des apatites. La bande à 1034 cm^{-1} est assignée à la vibration d'élongation asymétrique (ν_3) du groupement PO_4^{3-} , alors que la bande à 829 cm^{-1} correspond à l'élongation symétrique (ν_1) du groupement PO_4^{3-} . Les bandes d'absorption entre 606 et 560 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations de déformation antisymétrique du groupement PO_4^{3-} la séparation de ces deux bandes suggère qu'il y a présence d'apatite cristalline. Les bandes d'absorption observées dans la région de 775 et 1384 cm^{-1} sont dues aux vibrations du groupement CO_3^{2-} [73] et sont en agrément avec les résultats du RDX (voir **figure III.6**). Dans le cas de HA calciné, le groupement CO_3^{2-} est éliminé comme illustré dans **figure III.5**.

Les bandes observées à 3141 et 1637 cm^{-1} dans HA confirment la présence de H_2O absorbé qui est assez habituel tant que l'échantillon n'est pas calciné (**figure III.5**). La bande supplémentaire à 3426 cm^{-1} indique la présence de vibration d'élongation symétrique du groupement hydroxyle associée à la surface du groupement P-OH [73].

Attribution aux groupements	HA exp
PO_4 bending ν_4	560
PO_4 bending ν_4	606
PO_4 stretching ν_1	829
PO_4 bending ν_3	1034
groupement CO_3^{2-} (ν_3)	1384
H_2O adsorbé (ν_2)	1637
H_2O adsorbé	3141
OH stretching	3426

Tableau III.1 : Bande de FTIR et leurs groupements correspondant.

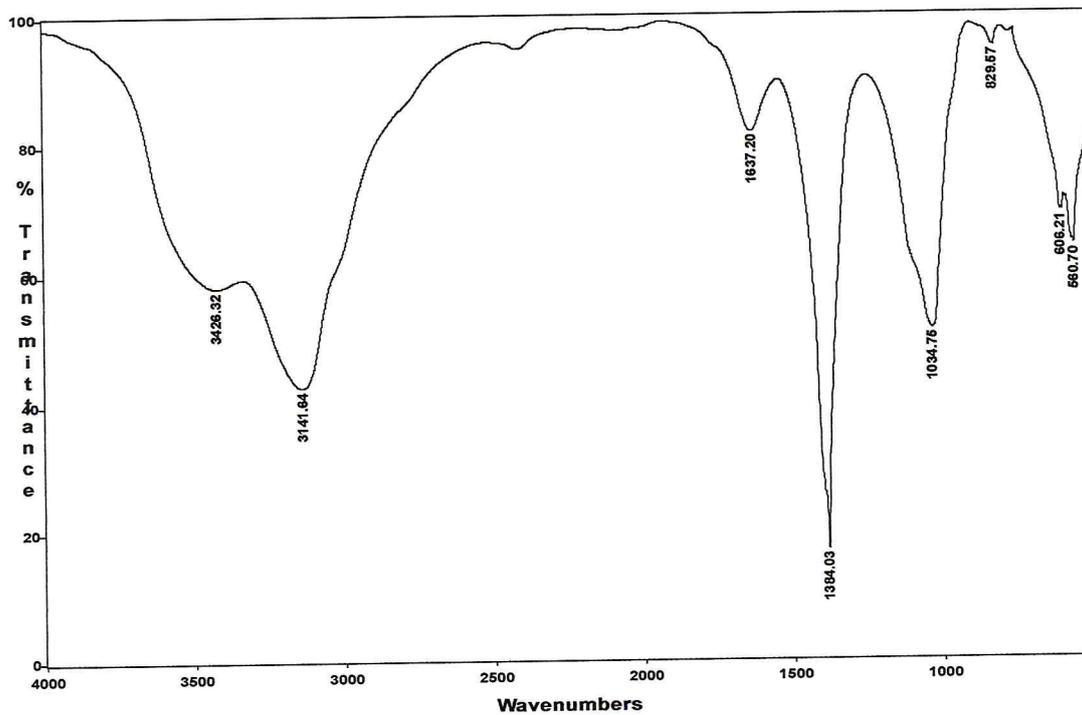


Figure III.4 : Spectre IR de l'hydroxyapatite préparé à partir des coquilles d'œuf

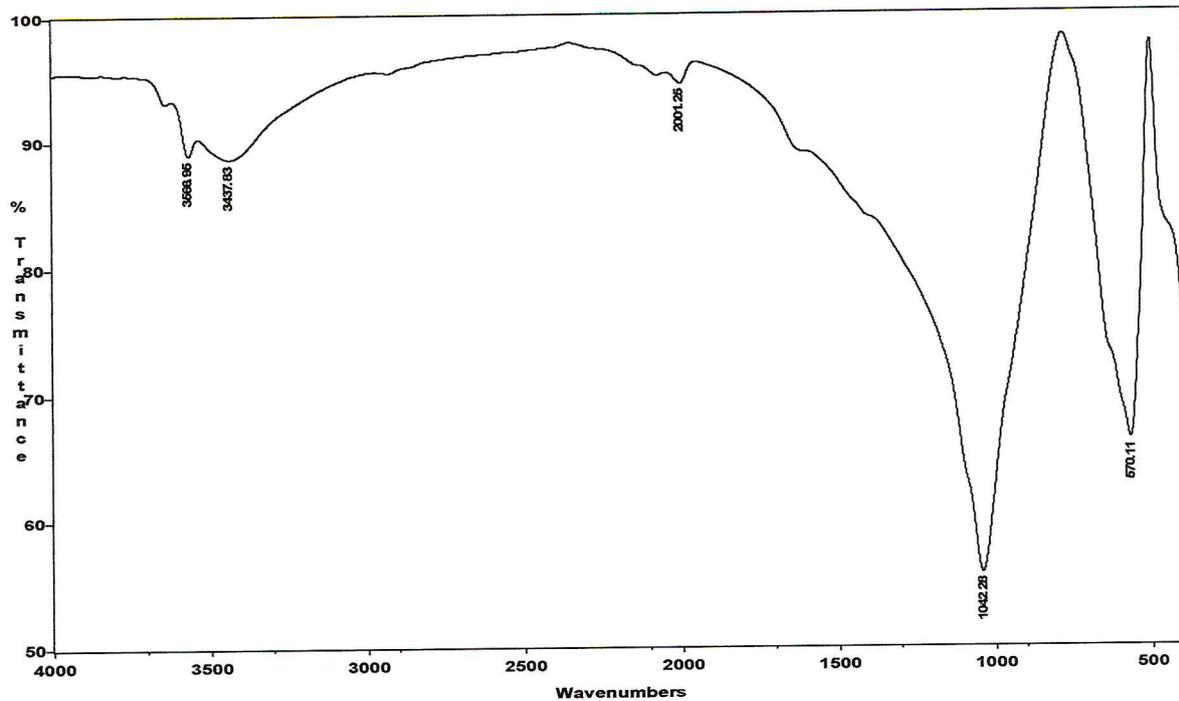


Figure III.5 : FTIR de l'hydroxyapatite préparé à partir des coquilles d'œuf calciné à 900°C.

c. Analyse par Rayon-x :

La diffraction XRD atypique de l'hydroxyapatite est présentée dans la *figure III. 6*. Les dimensions, intensité de HA sont comparés avec le standard SRM 2910 et sont résumés dans le *Tableau III.2*. Nous pouvons constater que dans l'ensemble, nous avons un bon accord entre les données expérimentales de la distance intramoléculaire pour HA à celles du standard. La diffraction maximale qui correspond à 31,78° (211) confirme la formation de l'hydroxyapatite pur dans sa forme cristalline [3]. Le pic à 29,28° est attribué au carbonate de calcium. L'absence de la raie à 37,360° indique l'absence de CaO libre, éliminé par l'acide citrique comme montré précédemment (§ I). Ces résultats semblent être en agrément avec ceux obtenus par Dasgupta *et al*, voir spectre de la *figure III. 7* [74].

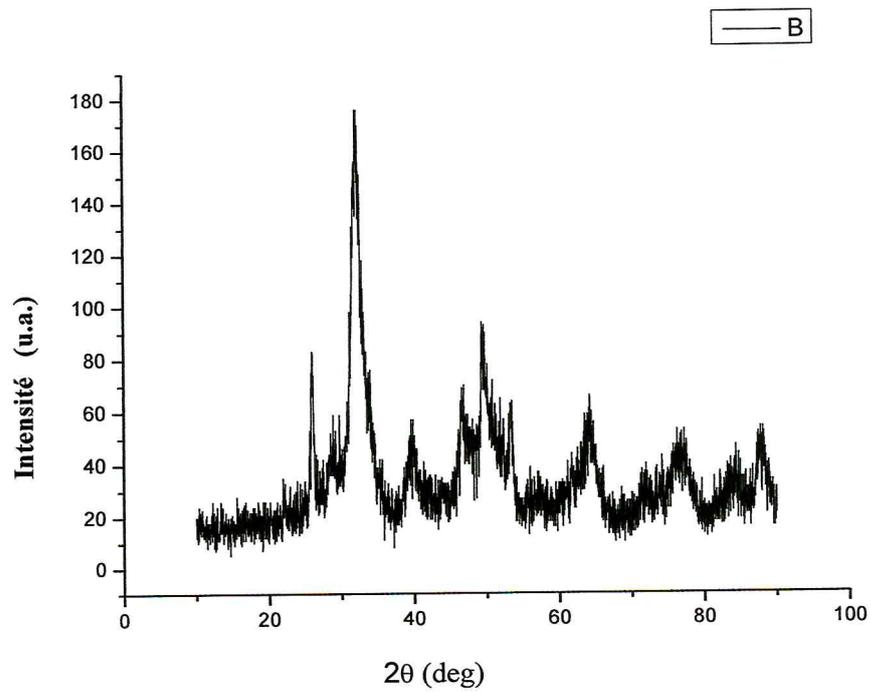


Figure III.6 : Spectre RDX de l'hydroxyapatite synthétisé à partir des coquilles d'œuf.

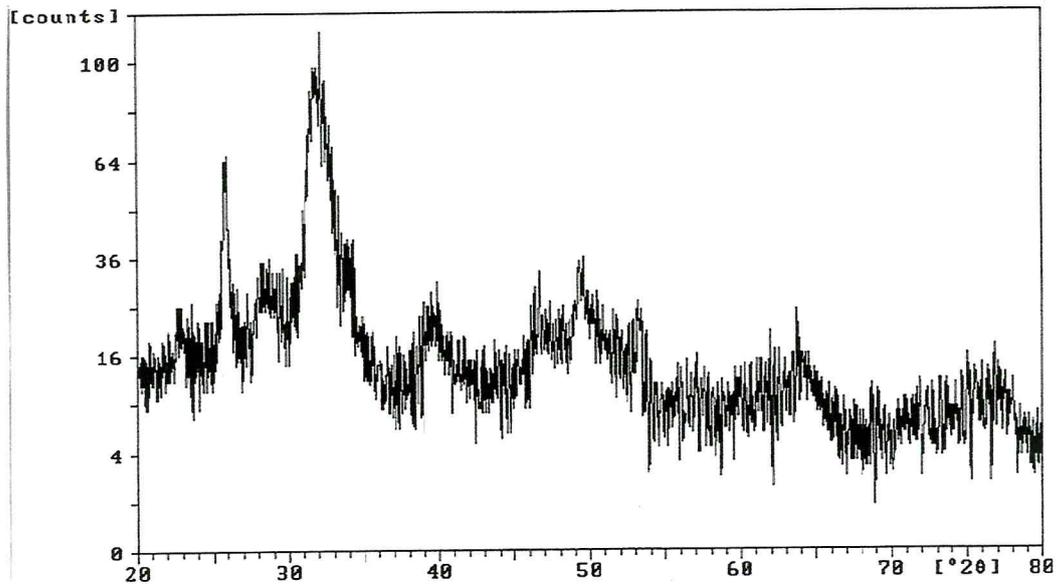


Figure III. 7: Spectre RDX de l'hydroxyapatite [74].

hkl	2θ(°)		Intensité (%)		d (nm)	
	Exp	SRM 2910	Exp	SRM 2910	Exp	SRM 2910
200	21.43	21.76	19	6	0.416	0.408
111	22.14	22.85	18	6	0.405	0.389
002	25.71	25.86	48	35	0.350	0.344
102	28.57	28.11	34	9	0.314	0.317
210	29.28	28.93	34	16	0.308	0.308
211	31.78	31.77	100	100	0.285	0.281
112	32.5	32.18	89	53	0.280	0.278
300	32.86	32.90	67	63	0.275	0.272
202	33.93	34.05	44	24	0.265	0.263
301	35.35	35.46	24	5	0.256	0.253
310	39.64	39.80	32	23	0.229	0.2263
311	41.43	41.99	24	6	0.218	0.2150
222	46.43	46.69	40	28	0.195	0.1944
213	49.28	49.46	55	32	0.184	0.1841
321	50.35	50.48	42	16	0.181	0.1806
402	51.78	52.07	38	12	0.177	0.1755
004	53.21	53.17	38	14	0.173	0.1721
322	55.35	55.86	21	5	0.167	0.1645
313	57.14	57.11	19	4	0.162	0.1611
501	58.21	58.03	17	2	0.158	0.1588
412	58.57	58.29	18	2	0.157	0.1582

Tableau III.2 : représentation de quelque donnée obtenu par RDX de l'hydroxyapatite

IV. Préparation des nanoparticules d'argent :

Nous sommes appelés dans nos préparations à utiliser des produits chimiques non-toxiques, des solvants écologiquement bénins et matières renouvelables. Malgré les propriétés nouvelles exposées par les nanoparticules Nps du métal dû aux effets de la dimension du quantum, leur protocole de la synthèse pose un problème de l'environnement majeur. La plupart des méthodes synthétiques rapportées se basées sur l'usage des solvants organiques et agents réducteurs toxiques [75].

Ainsi, dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des bio-polymères naturels tels que l'amidon et le chitosan comme réducteurs non-toxiques extraits respectivement des plantes, invertébrés marins, insectes et levure [76].

Le chitosan est un polysaccharide poly N-acétylglucosamine préparé par desacétylation alcaline de la chitine qui est présent communément dans les coquilles de crustacés marins et cellules moisit [77,78]. Le chitosan à une affinité forte et un pouvoir chélateur élevé envers les métaux lourd particulièrement avec Ag^+ [79]. Ses groupements amines et hydroxyles réagissent dans la réduction et la stabilisation lors de la synthèse des Nps-Ag [76, 80].

L'amidon qui est un polymère linéaire formé par liaison entre les glucoses et à une forme hélicoïdale dans une solution aqueuse, en dépit de son branchement léger. L'aldéhyde terminal de l'amidon réduit le nitrate d'argent en Nps-Ag, mais aussi, on a noté que les groupements hydroxyles participent à la réduction de Ag [75]. L'amidon est renouvelable, soluble dans l'eau et lié relativement faible avec les nanoparticules d'argent afin que la protection soit facilement réversible à plus hautes températures. le rendement cinétique de la réduction d'Ag peut être amélioré par l'usage des micro-ondes [81].

1. Réduction en présence de l'amidon :

L'organigramme de la *figure IV.1* présente un schéma d'ensemble de l'obtention des Np-Ag en utilisant comme agent réducteur l'amidon à une concentration de 1% avec différentes concentrations de $AgNO_3$ (0,1-1-2%).

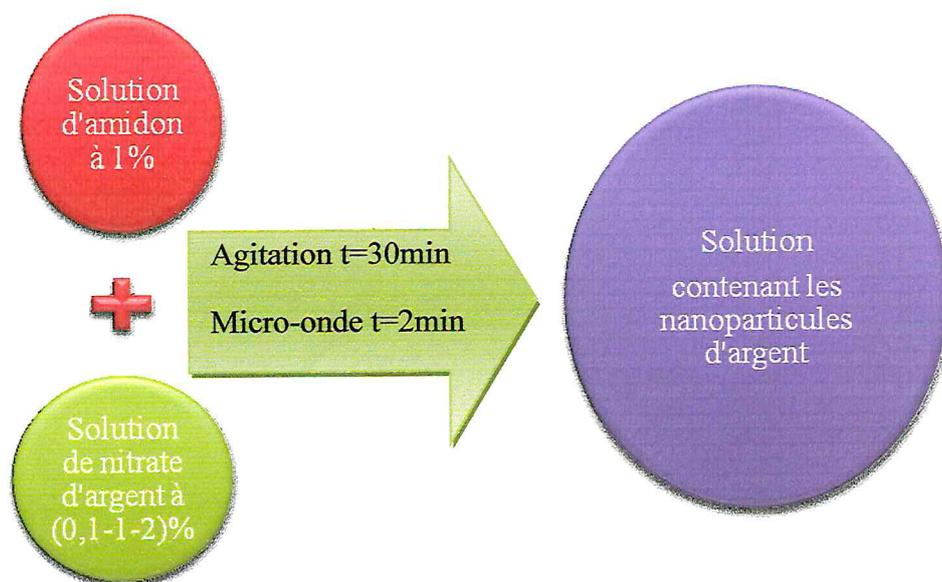


Figure IV. 1: *synthèse de Np-Ag/amidon.*

a. Caractérisation des Np-Ag obtenus par voie d'amidon:

Dans cette étude nous avons utilisé un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier 'FTIR' (FT/IR-4100 JASCO), un spectrophotomètre UV-VIS (UV-1201 SHIMADZU) pour identifier les principaux groupements fonctionnels ainsi que les diverses modifications chimiques.

b. Interprétation des résultats :

i. Aspect général :

Nous remarquons un changement de couleur avec la variation de la concentration du nitrate d'argent (**a,b,c Figure IV.2**), la couleur devient de plus en plus sombre (vert-marron), et qui sont différents des couleurs des produits de départ amidon et nitrate d'argent (**e et a** respectivement).

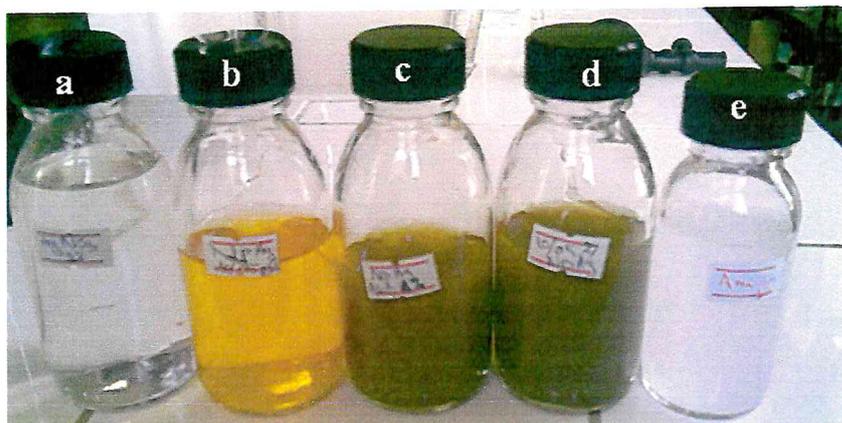


Figure IV.2: a/ solution de nitrate d'argent 2% ; b/ nanoparticule d'argent à 0,1% ; c/ nanoparticule d'argent à 1% ; d/ nanoparticule d'argent à 2% et e/ amidon à 1%.

ii. Analyse par Microscopie optique :

Les images microscopiques obtenues grâce à un microscope optique à caméra (TOPIC 102M), montrent une dispersion homogène des particules d'argent qui sont sphériques (la *figure IV.3*) [78, 71]. L'augmentation de nombre de Nps-Ag augmente avec la concentration de AgNO_3 (a, b, c respectivement).

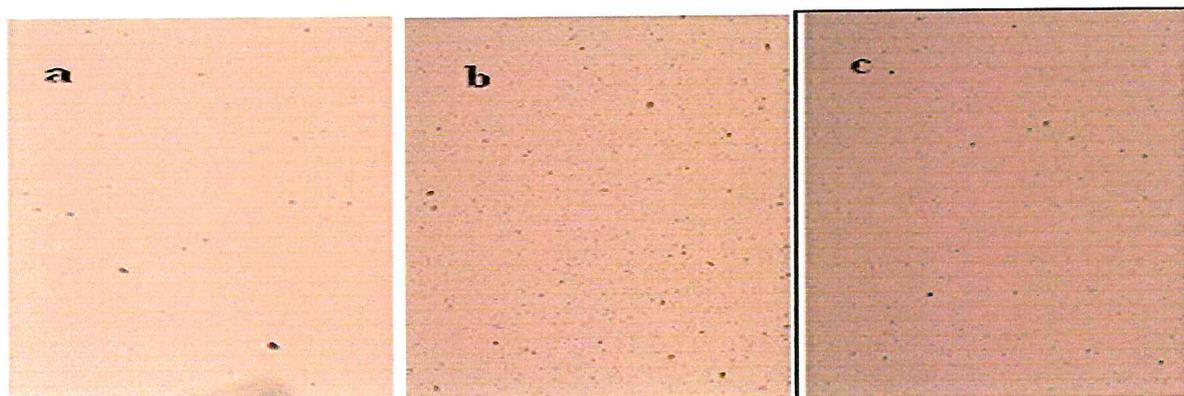


Figure IV.3: Image microscopique des nanoparticules d'argent a/ 0,1%, b/1%, c/2% de nitrate d'argent dans 1% d'amidon.

iii. Analyse par UV-VIS :

Les spectres UV-vis des différentes concentrations de AgNO_3 (0,1-1-2%) désignés par a, b et c sont présentés dans la *figure IV.4*. On observe des bandes de résonance entre 422-437nm attribuées généralement aux tailles nanométriques des particules d'argent [82, 75]. Le changement dans les longueurs d'onde est lié à la poly-dispersité croissante des Nps-Ag [82,

75]. On signal de plus, que l'intensité des bandes augmente avec l'augmentation de la concentration de AgNO_3 .

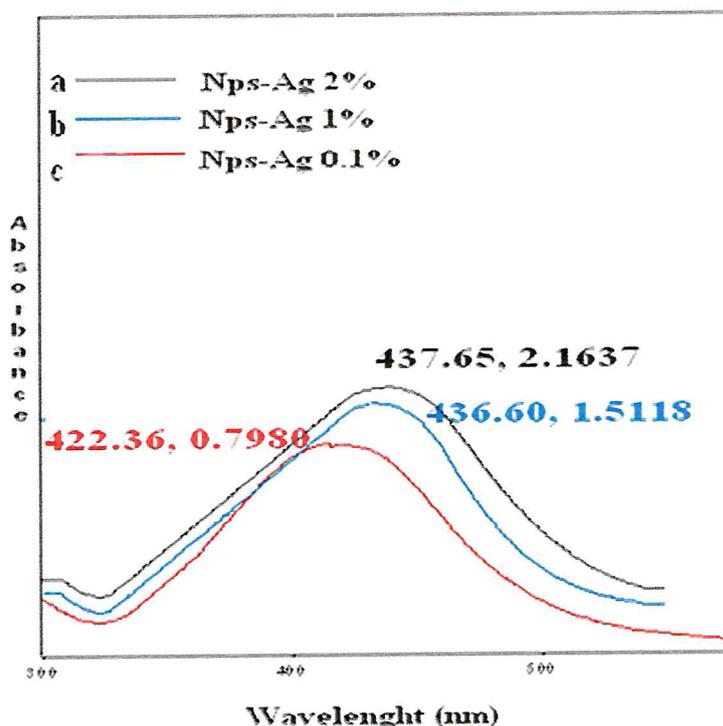


Figure IV.4: UV-vis des Nps-Ag (0,1-1-2%) de nitrate d'argent et 1% d'amidon

iv. Analyse par FTIR :

Les spectres FTIR des nanoparticules d'argent/amidon et amidon sont illustrés dans la *figure IV.5*. Une bande d'hydrogène liée au groupement hydroxyle (O-H) à 3426 cm^{-1} de l'amidon est déplacée vers 3481 cm^{-1} dans le cas de Np-Ag/amidon. Dans la région de l'empreinte digitale de l'amidon les bandes à 1083 et 1022 cm^{-1} sont attribués au groupement C-O de l'anhydroglucose qui n'apparait pas dans le spectre des Nps-Ag. Absence de la bande à 1387 cm^{-1} indique la réduction complète d' Ag^+ à Ag^0 [83].

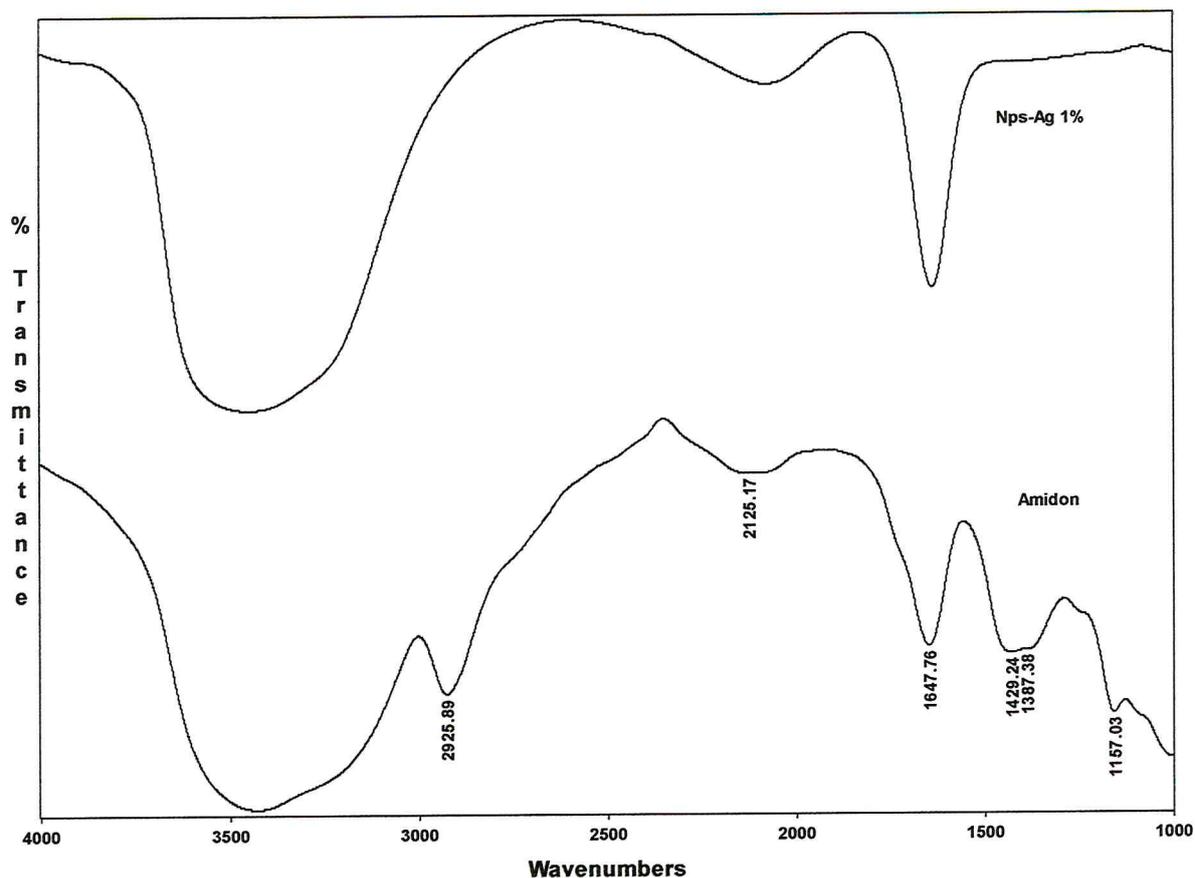


Figure IV.5: FTIR comparatif entre Np-Ag 1% et l'amidon

2. Réduction en présence du chitosan :

De même que dans le (§1), nous avons schématisé le processus de synthèse des Np-Ag qui est illustré par l'organigramme de la *figure IV.6* en utilisant le chitosan comme agent réducteur avec les mêmes concentrations de AgNO₃ (0,1-1-2%).

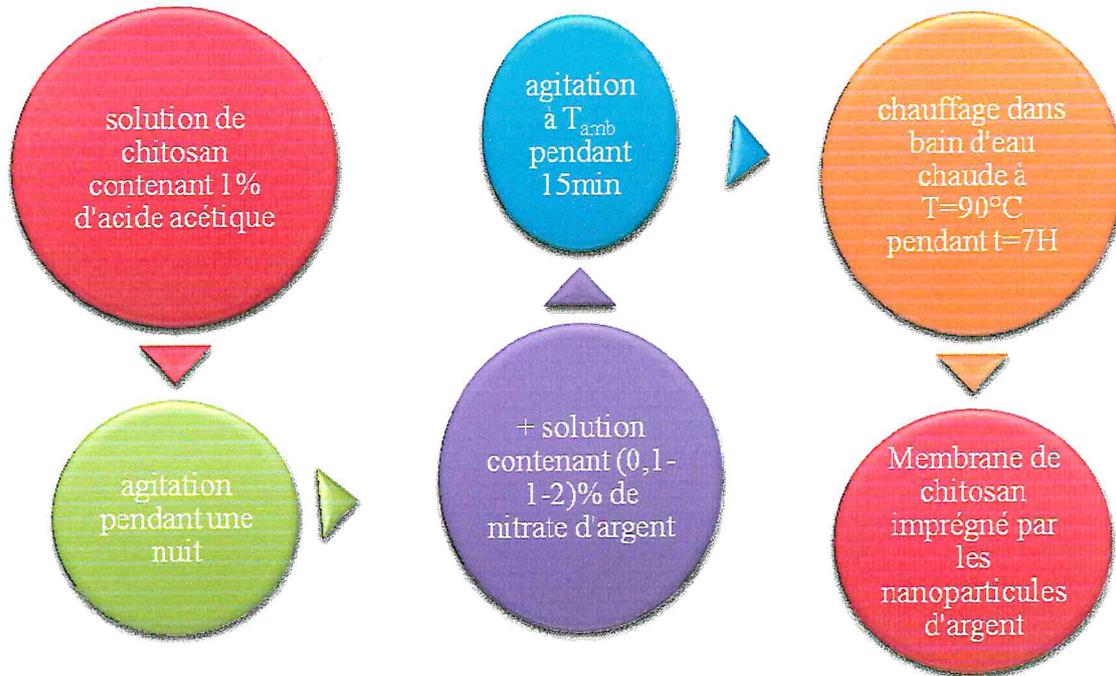


Figure IV.6: Synthèse de Np-Ag/chitosan.

a. Aspect physique:

Nous remarquons un changement de couleur avec la variation de la concentration du nitrate d'argent (a,b,c **Figure IV.7**), la couleur vire de plus en plus vers le marron brun (c) indiquant la présence de particules d'argent.

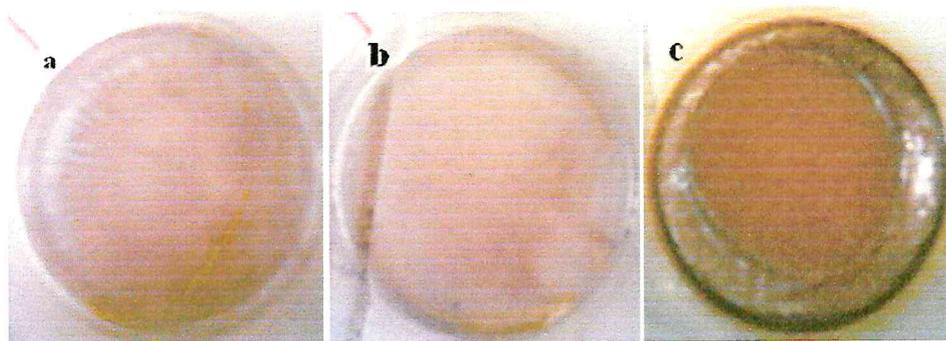


Figure IV.7 : Membrane imprégné par des nanoparticules d'argent a/ 0,1%, b/1%, c/2% de nitrate d'argent

b. Analyse par microscopie optique :

Les nanoparticules d'argent approximativement sphériques sont formées à l'intérieur de la membrane **figure IV.8**. On notera que plus la concentration de sels d'argent augmente (2%

et au delà) les Np-Ag ont une tendance à s'agréger plus fortement. Dans ce cas peu de molécules du chitosan pourront jouer le rôle de réducteur et stabilisateur [76, 80].

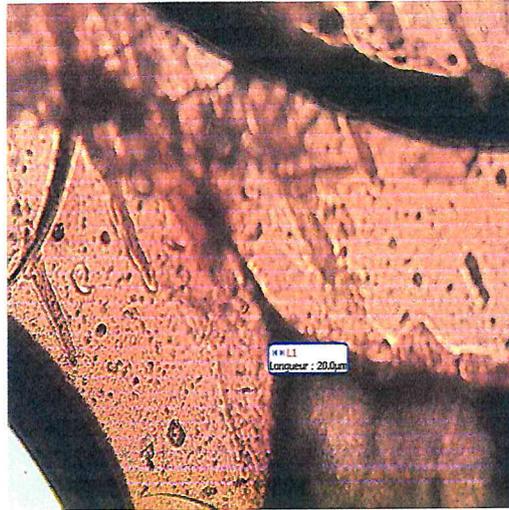


Figure IV.8: Image par microscope optique à caméra de la membrane de chitosan imprégné par les Np-Ag 2% (x100).

c. Analyse par UV-vis :

La même tendance spectrale est observée pour le chitosan comme réducteur. On enregistre un léger glissement de variation de bandes de 409-436nm (chitosan) attribuées également aux tailles nanométriques des particules d'argent [76, 80] (*figure IV.9*) par rapport à 422-437nm (amidon).

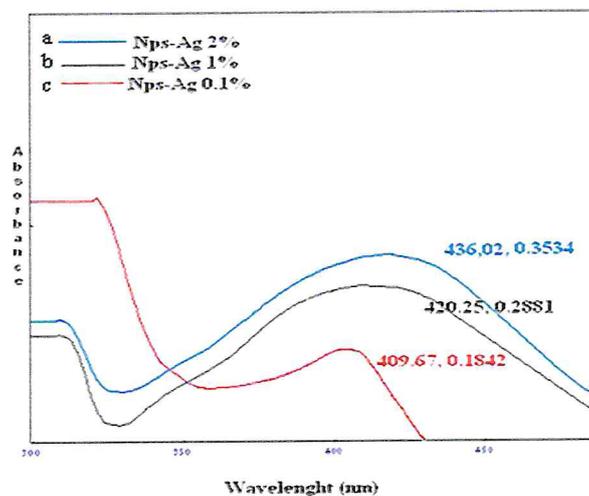


Figure IV.9 : UV-vis des membranes imprégnées par Nps-Ag (0,1-1-2% de nitrate d'argent)

d. Analyse par FTIR :

Dans la *figure IV.10* nous avons présenté les spectres FTIR du chitosan et Np-Ag/chitosan. Bien qu'il y ait la possibilité de chevauchement entre l'H-N et l'H-O, la bande forte à 3434cm^{-1} est caractéristique du groupement H-N. La baisse relative de l'intensité dans cette région indique que le groupement N-H a été affecté par le duo d'attachement par l'argent [79]. En revanche, le groupement H-N à 1628cm^{-1} s'est déplacé à 1530cm^{-1} avec une baisse graduelle de son intensité lorsque la concentration d' AgNO_3 augmente. Cela suggère aussi que nous avons un attachement de l'argent aux atomes d'azote résultant de la réduction de l'intensité de la vibration de N-H.

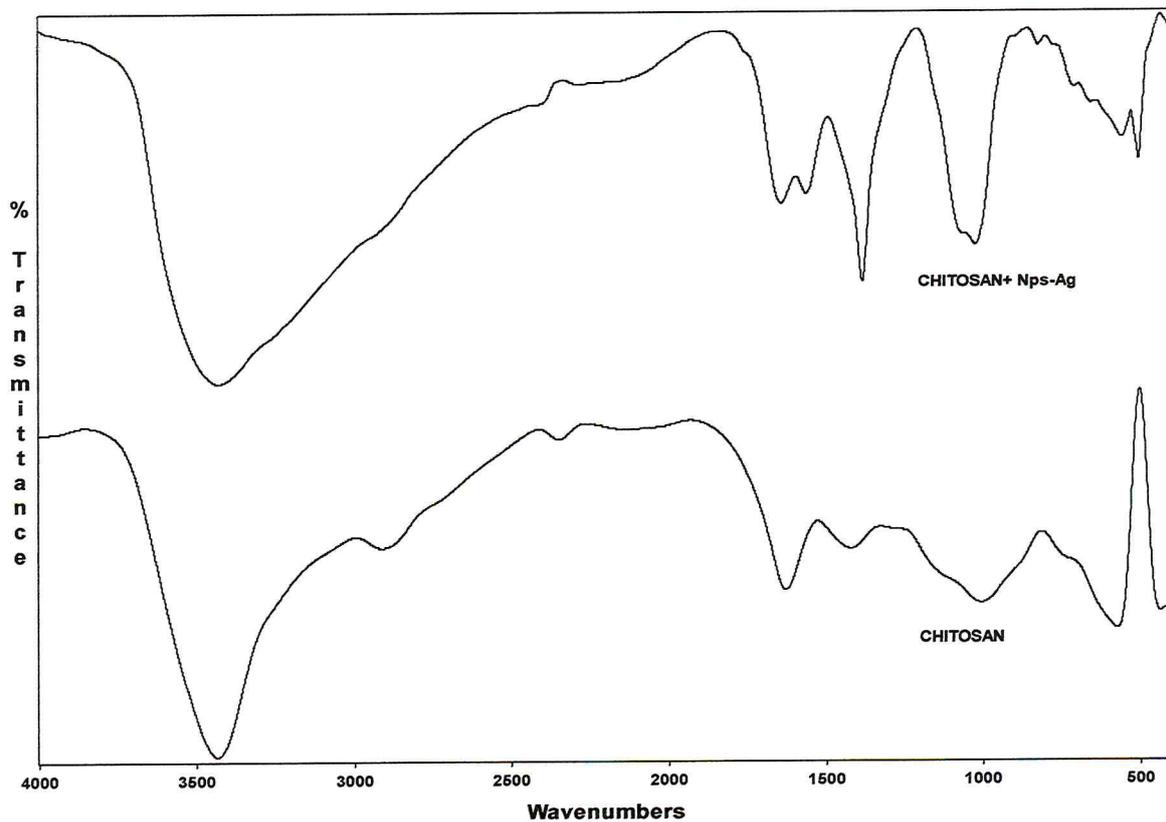


Figure IV.10 : FTIR comparatif entre chitosan et chitosan imprégné par les Nps-Ag 1%

V. Préparation des bio-composites HA/Nps-Ag :

Le schéma de la **figure V.1** indique le protocole expérimental qu'on a adopté lors de la synthèse du bio-composite HA/Np-Ag en présence de l'amidon et du chitosan. On a introduit une solution d'amidon ou membrane de chitosan imprégné par Np-Ag dans le même milieu réactionnel qui a permis de préparer l'HA sous agitation pendant 3h à 80°C (voir § I). Une vue d'ensemble des poudres obtenues sont présentées dans la **figure V.2**. Nous pouvons faire remarquer qu'une nuance de couleur (du beige au blanc cassé) peut être observée visuellement qui n'apparaît pas sur les présentes images.

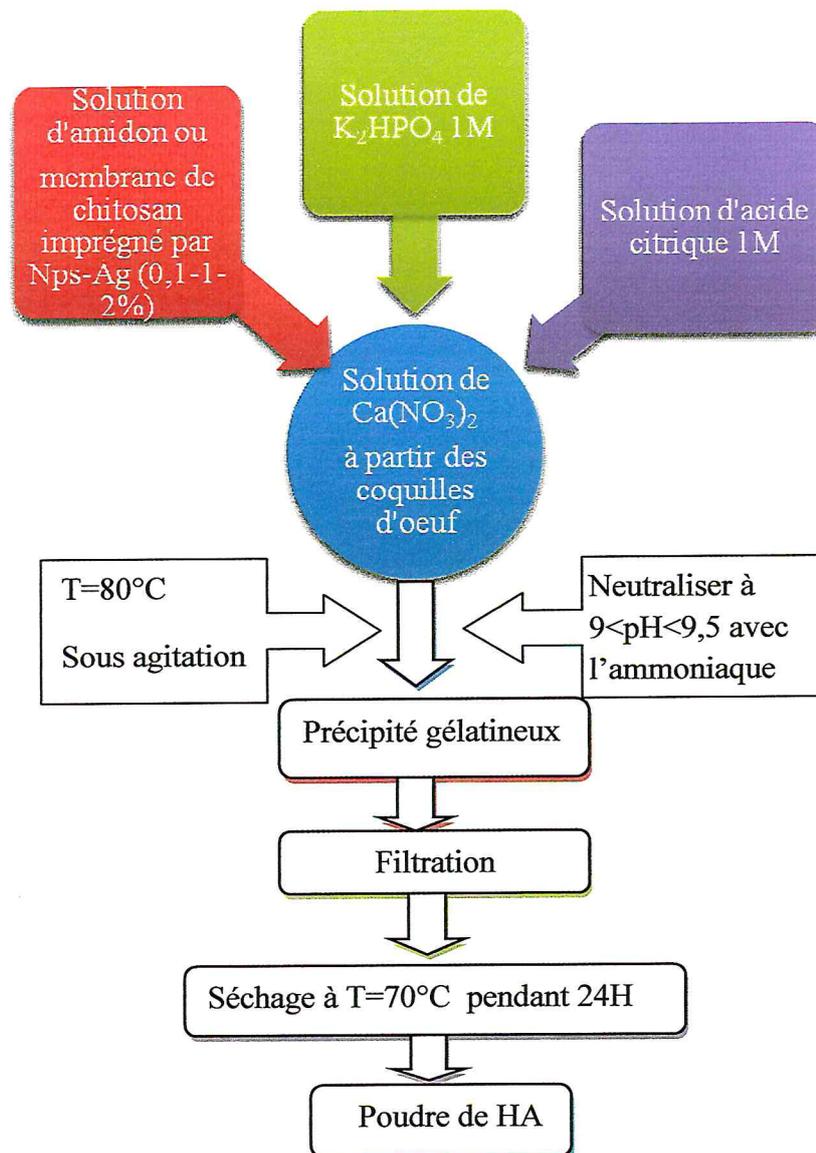


Figure V.1: Schéma directeur du Protocole d'expérience

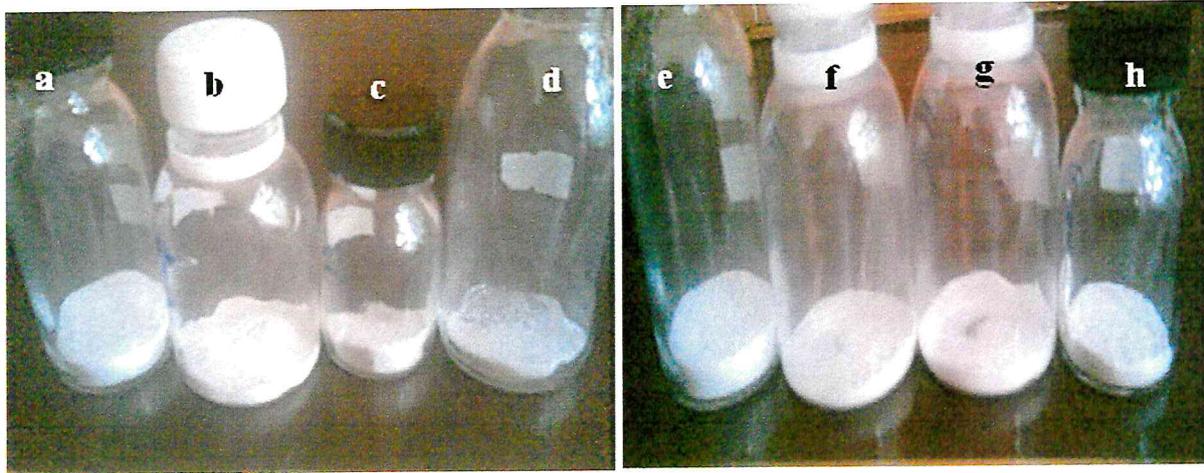


Figure V.2 : Image représentant *a et e/ HA, b, c et d/ HA/Np-Ag/Amidon* contenant 0,1-1-2% de $AgNO_3$ respectivement, *f,g et h/ HA/Np-Ag/chitosan* contenant les même concentration de $AgNO_3$

1. Analyse par microscopie optique :

La *figures V.3 (a, b)* présente les images microscopiques de HA/Np-Ag/amidon et HA/Np-Ag/chitosan respectivement montrant une distribution irrégulière des particules isolées et d'amas de particules de forme globulaire et de couleur grisâtre indiquant la présence de Ag. Avec un agrandissement de x100, nous pouvons faire une estimation approximative de la taille des particules de 150-300nm pour Np-Ag/amidon et de 160-400nm pour Np-Ag/chitosan. En général, l'augmentation de la concentration du sel d'argent augmente l'agglomération des Np-Ag et le taux d'imprégnation pour les deux cas de figure (Np-Ag/amidon et Np-Ag/chitosan).

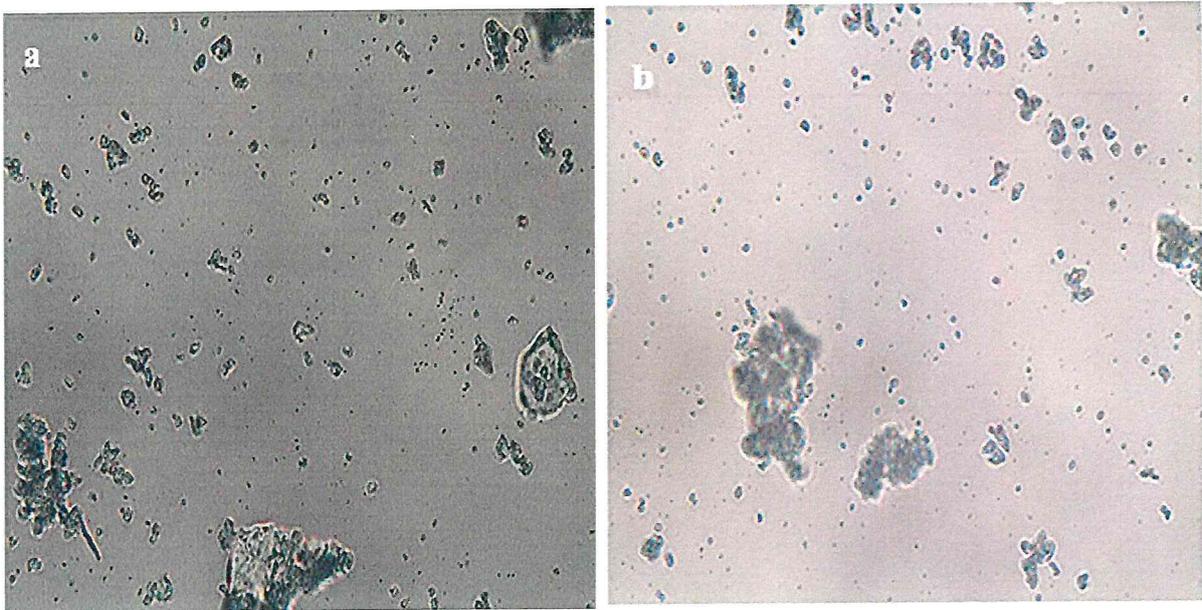


Figure V.3: images microscopiques des particules : a) HA/Np-Ag (0.1%)/amidon et b) HA/Np-Ag (0.1%)/chitosan (agrandissement x100)

2. Analyse par FTIR :

Les spectres FTIR des bio-composites HA/Np-Ag (0.1, 1 et 2%) en présence de l'amidon et en présence du chitosan sont présentés dans les *figures V.4 et figure V.5*. En tenant compte des principales bandes des complexes Np-Ag/amidon et Np-Ag/chitosan et HA (*figure V.6*), les bandes caractéristiques de HA sont bien présentes dans les bio-composites HA/Np-Ag/chitosan et HA/Np-Ag/Amidon et qui ont un aspect tout à fait similaire en ce qui concerne des groupes chimiques fonctionnels (voir *Tableau V.1*). Cela suggère que la structure de HA n'a pas été trop affectée, qui indique qu'on a vraisemblablement une simple imprégnation des Np-Ag dans la structure nano-poreuse de HA se liant probablement aux CO_3^{2-} . Par conséquent, le pic à 1384 cm^{-1} attribué à CO_3^{2-} devient moins intense indépendamment de la concentration des Np-Ag qui puisse être expliquée par une augmentation du poids de molécule après l'attache argentée.

Le spectre du bio-composite en présence du chitosan présente une intensité relativement élevée à 1636 cm^{-1} par rapport à celui préparé en présence de l'amidon, (*figure V.7*), dénotent

que le groupe d'amines acétylés (amide I) de la chitine indiquant que le chitosan utilisé dans cette expérience est désacétylaté partiellement (Degrés de Désacétylation DD de 85%).

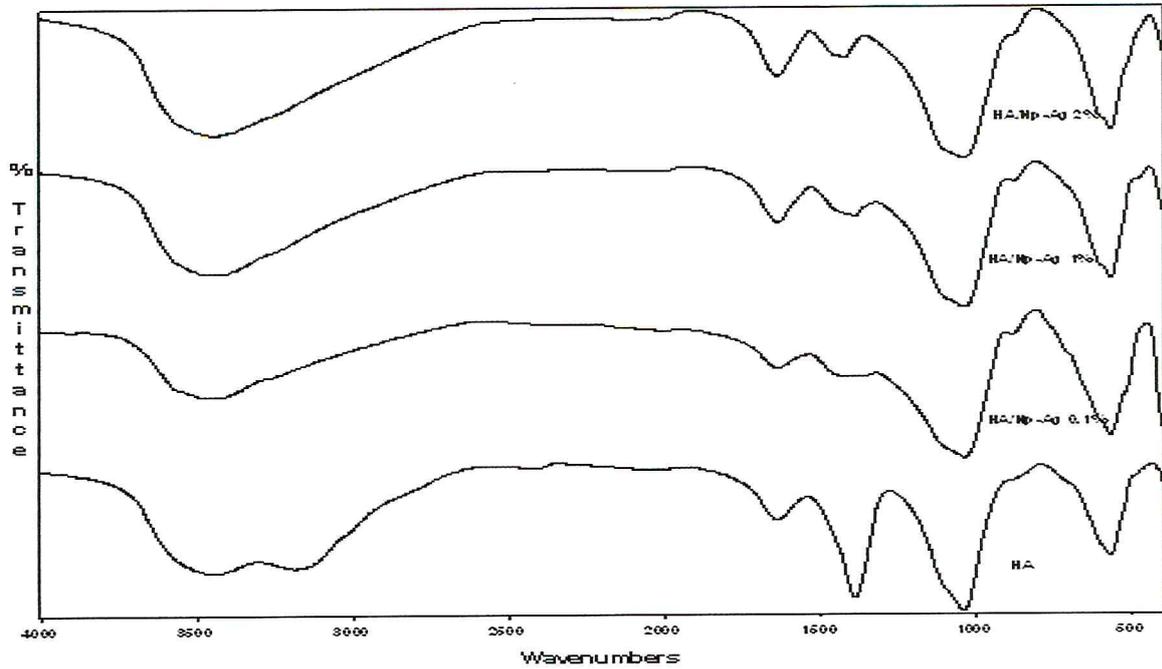


Figure V.4: FTIR de HA, HA/Np-Ag 0,1-1-2% (amidon).

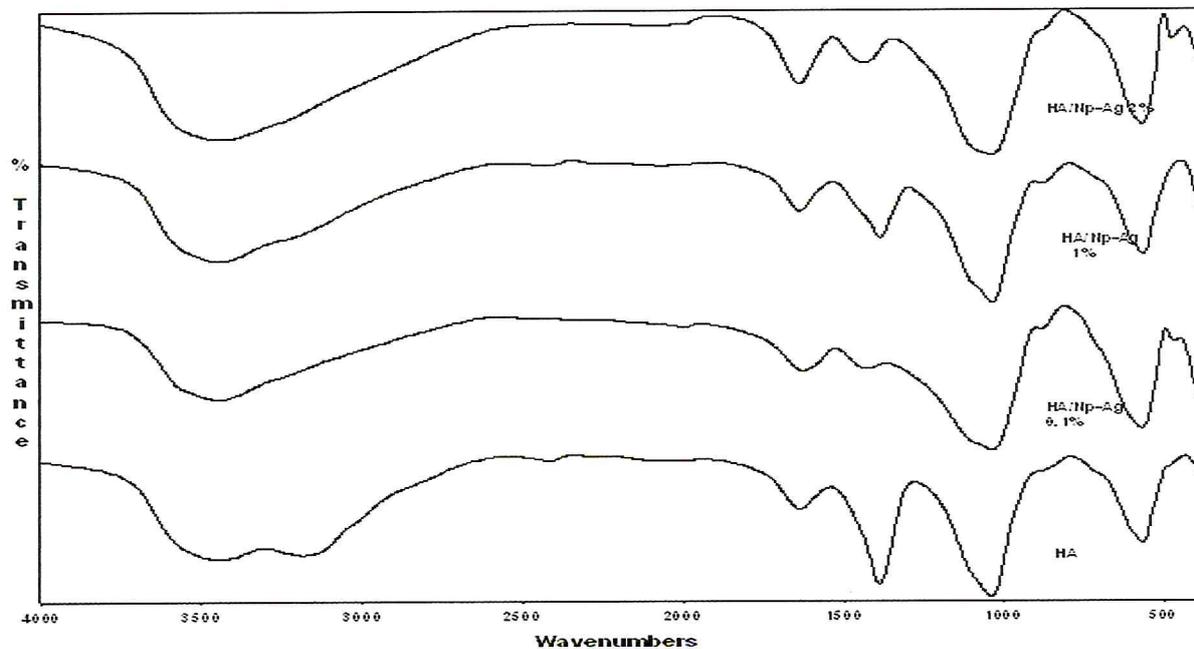


Figure V.5: FTIR de HA, HA/Np-Ag 0,1-1-2% (chitosan).

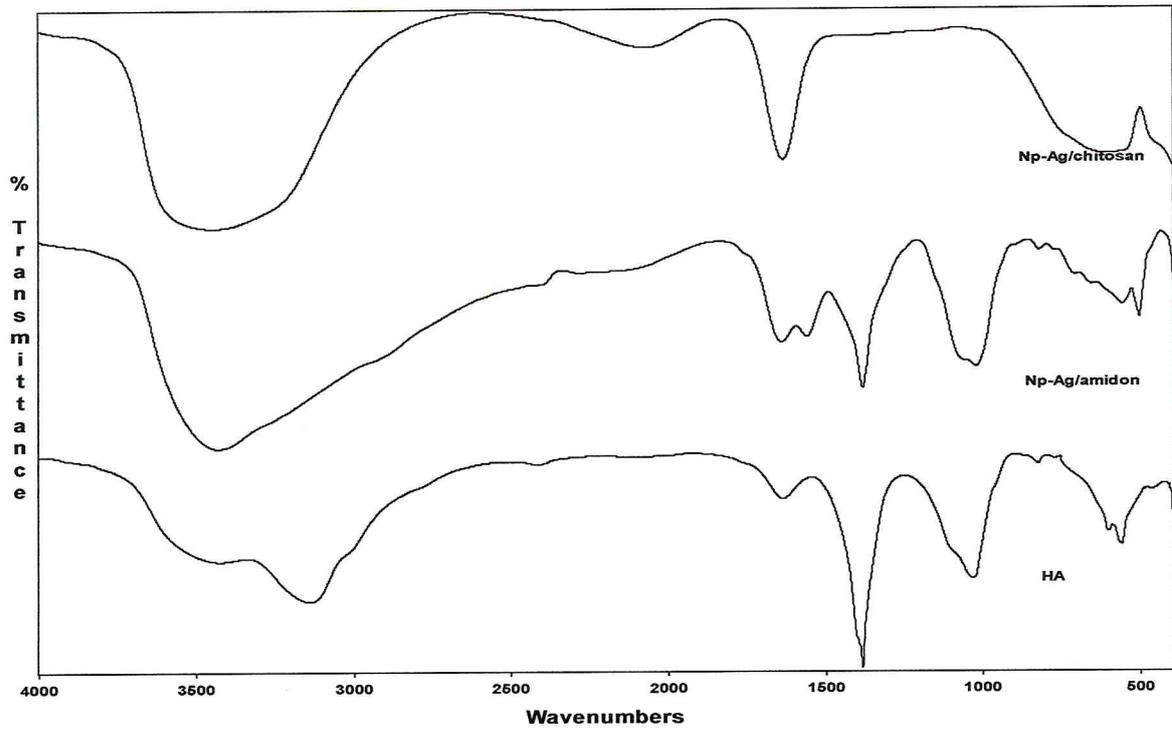


Figure V.6 : FTIR de HA, Np-Ag/amidon, Np-Ag/chitosan

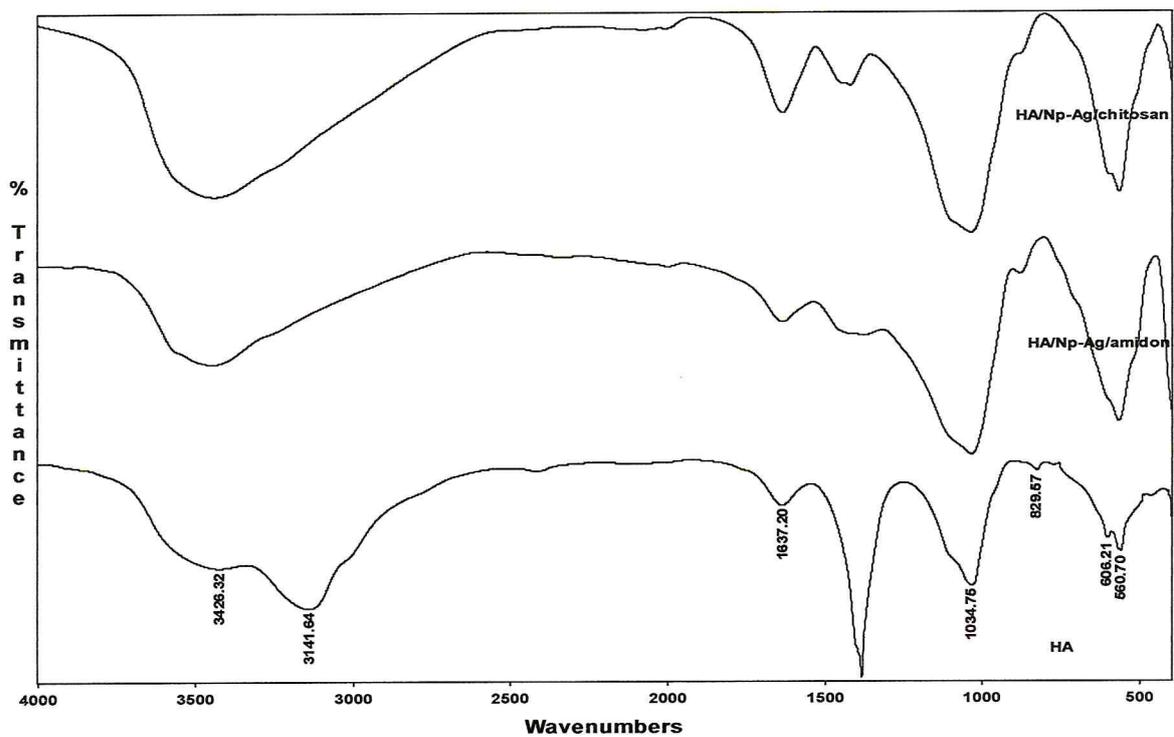


Figure V.7: FTIR de HA, HA/Np-Ag/amidon et HA/Np-Ag/chitosan

Bande caractéristique	HA	HA/Np-Ag/chitosan	HA/Np-Ag/amidon
<i>PO₄ bending ν₄</i>	561	568	567
<i>PO₄ bending ν₄</i>	600		598
<i>groupement CO₃⁻</i>	777		
<i>PO₄ stretching ν₁</i>	829	883	882
<i>PO₄ bending ν₃</i>	1034	1037	1038
<i>groupement CO₃⁻ (ν₃)</i>	1384	1418	1422
<i>H₂O adsorbé (ν₂)</i>	1637	1636	1637
<i>H₂O adsorbé</i>	3142		
<i>OH stretching</i>	3426	3448	3443

Tableau V.1: Attribution des Bandes caractéristiques des produits synthétisés

VI. Etude de l'activité antibactérienne :

La diffusion en milieu gélosé est une technique de détermination de la sensibilité d'une bactérie à un agent antibactérien, effectué en milieu solide. Elle consiste à imprégner des disques de papier (disques de Kirby et Baner) par une solution du composé bactéricide et les déposés dans des boites de gélose ou pousse une culture de germes à étudier. L'agent antibactérien se diffuse dans la gélose et s'il est actif sur le germe, inhibe la croissance de celui-ci suivant un cercle concentrique au disque et plus ou moins grand selon la sensibilité du germe à l'agent antibactérien en question.

Dans notre étude le milieu de culture utilisé est la gélose nutritive pour la croissance de *staphylocoque aureus* et *E. coli*. La souche bactérienne a été préparée sous forme d'une suspension avec une concentration de 12.10^8 UFC/ml.

Une quantité du bio-composite HA/Np-Ag/ chitosan et HA/Np-Ag/amidon est déposée à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec les cultures des souches (*E. coli* et *S. aureus*). Les résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion devraient être exprimés en mm sous forme de diamètre de la plage d'inhibition. Après une incubation à 24 h en anaérobiose à 37°, les disques s'entourent d'une zone d'inhibition circulaire correspondant à une absence de culture dont le diamètre permet de mesurer la concentration (*figure VI.2*). La lecture de cette zone se fait par un appareil spécifique (Antibiotic zone reader) FISHER-LILLY (*figure VI.1*).



Figure VI. 1: Lecteur des zones d'inhibition (FISHER-LILLY).

1. Protocole expérimental :

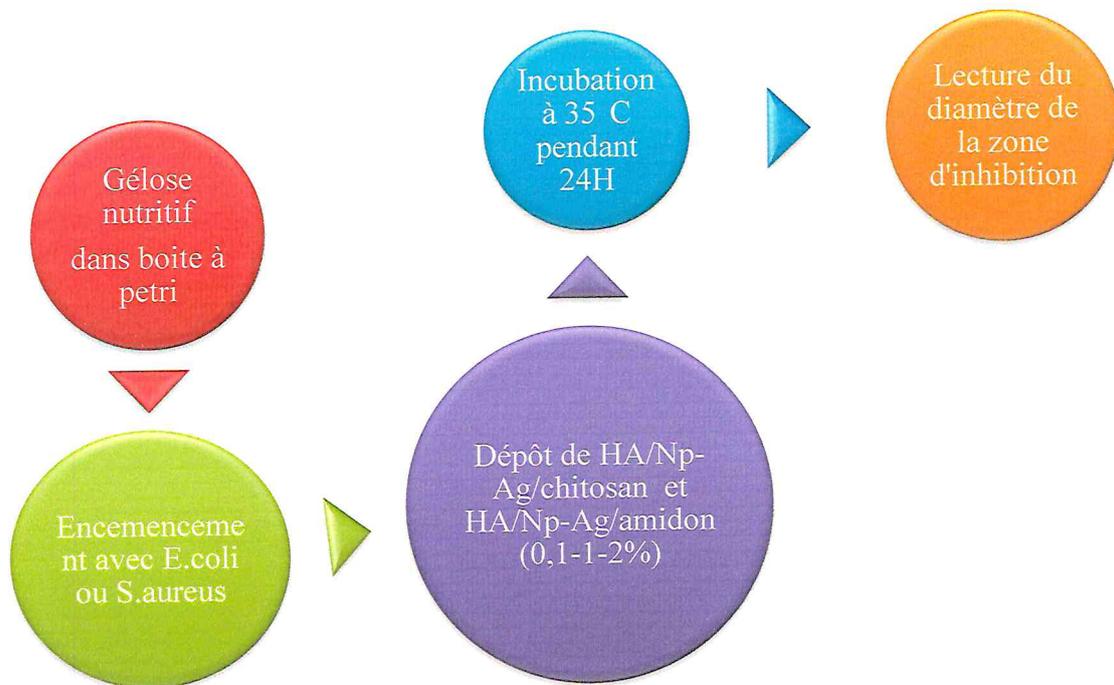


Figure VI. 2: Protocole expérimental de test de disque diffusion

2. Interprétation des résultats :

Après 24H, il s'établit un gradient de concentration du composite. L'interaction entre la bactérie et le composite s'exprime par une zone d'inhibition dont le diamètre est une expression indirecte de la CMI (concentration minimale inhibitrice).

Dans la **figure VI.3** est présenté les différents disques de diffusion imprégnés des échantillons à tester et qui montrent l'existence d'une zone d'inhibition **figure VI.3**. Sur les **figures VI.4 et VI.5 et VI.6**, nous avons présenté nos résultats sous forme d'histogramme mettant en évidence l'activité antibactérienne des produits synthétisés en fonction de la concentration d'argent mise en réaction. L'inhibition augmente avec la concentration d'argent (1%), puis diminue à 2%. Quelque soit la concentration et la nature du produit, les bactéries *E. coli* présente une meilleur résistance. Il semble qu'on a une meilleure activité du bio-composite préparé en présence d'amidon. L'analyse UV-Vis des nanoparticules obtenu en présence de l'amidon semble avoir une distribution homogène et stable permettant une bonne interaction avec la membrane bactérienne.

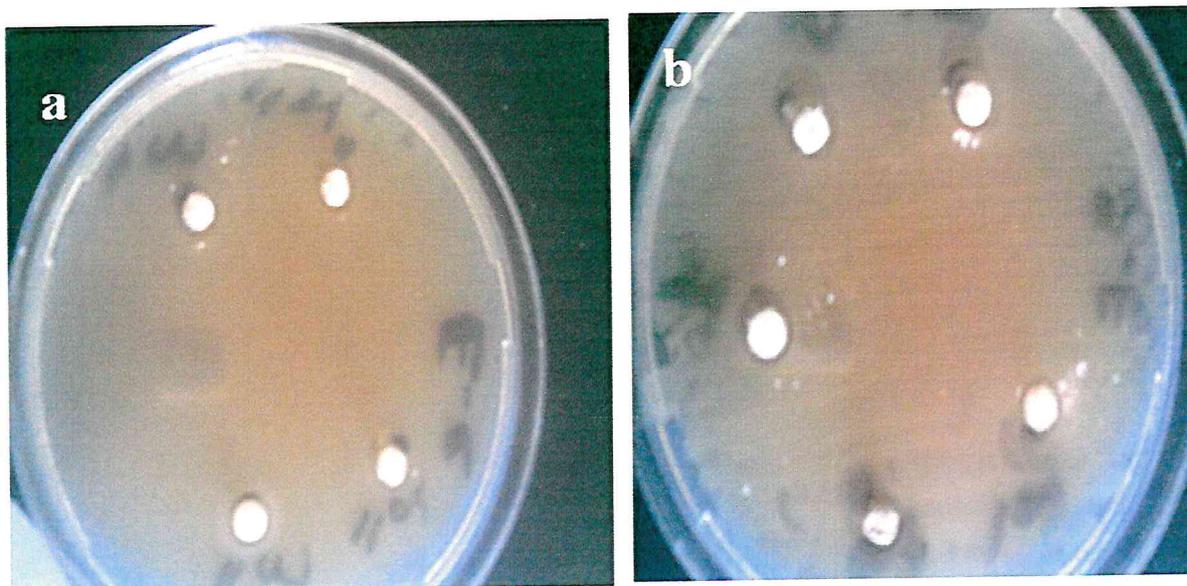


Figure VI.3 : images représentent les zones d'inhibition avec a/ *E. coli*, b/*S.aureus*.

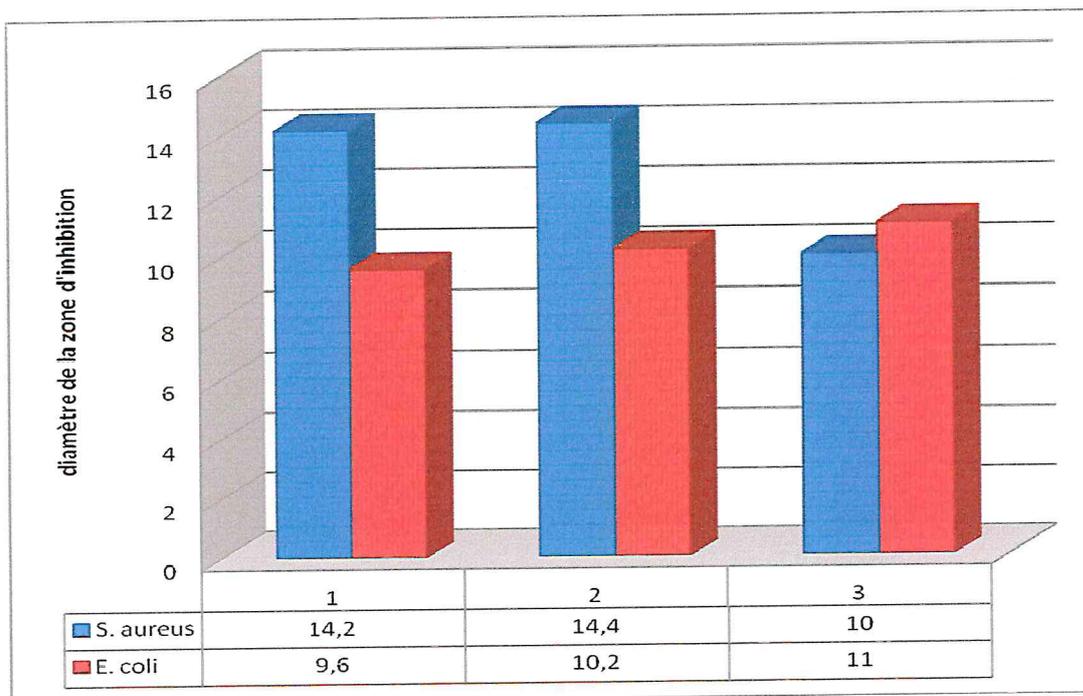


Figure VI.4: histogramme représentent la zone d'inhibition de HA/Np-Ag/Amidon (différentes concentration) avec *S.aureus* et *E. coli*

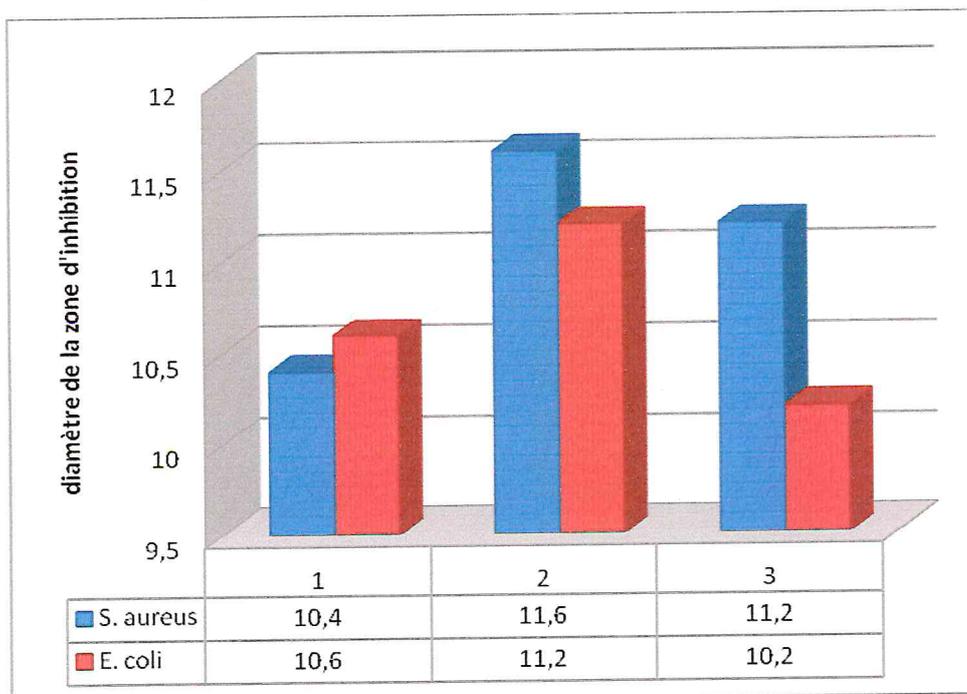


Figure VI.5 : histogramme représentent la zone d'inhibition de HA/Np-Ag/chitosan (différentes concentration) avec *S.aureus* et *E. coli*

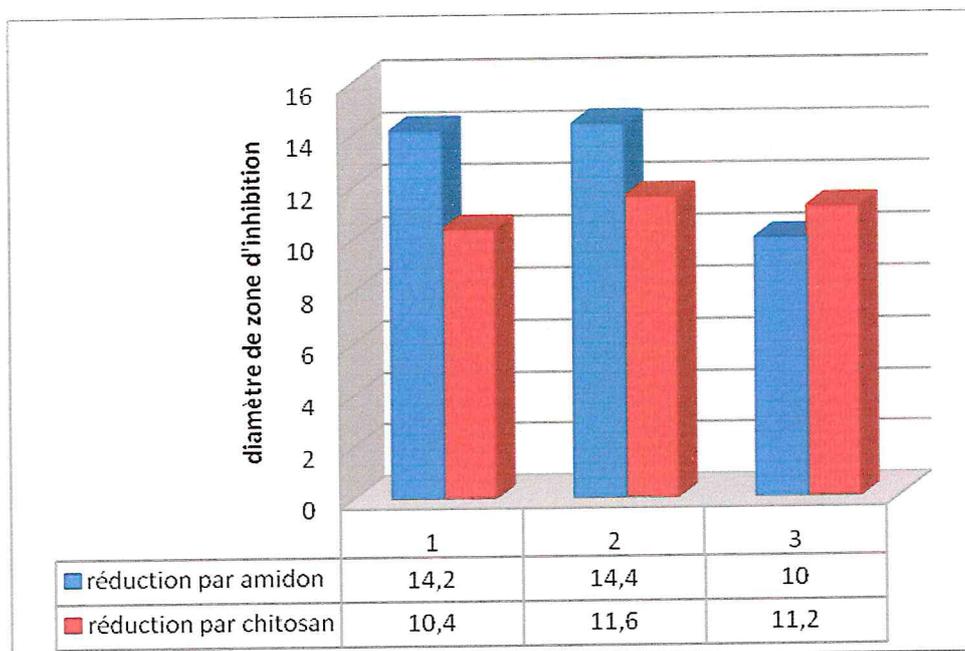


Figure VI.6: histogramme représentent la zone d'inhibition de HA/Np-Ag/Amidon et HA/Np-Ag/chitosan (différentes concentration) avec *S.aureus*

Conclusion générale

Au terme de cette étude et à la lumière des résultats obtenus de notre expérience devraient se dégager une conclusion se résumant par les principaux points suivants:

En premier lieu, nous avons procédé à la synthèse de l'hydroxyapatite à partir des déchets de coquilles d'œufs en vue d'une valorisation de ces produits alimentaires. L'analyse morphologique a montré que la taille des nanoparticules de HA varie approximativement entre 500-800nm. Les résultats obtenus par FTIR et RDX ont montré que HA apatite carbonaté présente une cristallinité qui est comparable au standard.

Deuxième étape de notre démarche expérimental a été consacré à la synthèse des Np-Ag ont utilisant des bio-polymères naturels (chitosan et amidon) comme agents réducteurs. Les résultats obtenus par Uv-vis pour les deux voies ont montré la présence de particules nanométrique. L'étude par microscope optique a montré que les Np-Ag semblent avoir une structure sphérique, qui ont une tendance à s'aggloméré au-delà de 2% d'AgNO₃ particulièrement en présence du chitosan.

La troisième synthèse de cette étude concerne l'élaboration du bio-composite ayant comme matrice HA et comme charge des Np-Ag (molécule active). A cet effet, un procédé a été établi et qui a permet d'obtenir des nanoparticules HA/Ag. L'effet d'imprégnation est confirmé où la structure des Np-HA n'a pas été affecté, cela a été confirmé par l'analyses FTIR.

Enfin, l'étude de l'activité antibactérienne à met en évidence l'inhibition de deux espèces bactériennes gram-positives « S. aureus » et les gram-négatives « E. coli ». Il apparaît que le complexe HA/Np-Ag synthétisé en présence de l'amidon a montré une activité antibactérienne plus relativement élevé observée pour les S. aureus.

Référence bibliographique

- [1] K PRABAKARAN, A BALAMURUGAN and S RAJESWARI, Development of calcium phosphate based apatite from hen's eggshell. *Bull. Mater. Sci.*, Vol. 28, No. 2, April 2005, pp. 115–119.
- [2] DE JONG W.F, La substance minérale dans les os, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1926, 45, p. 445-448. Pris par *Bone mechanics handbook* edited by Stephen C.Cowin
- [3] M. DIAZ, M.F BARBA, M. MIRANDA, Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite. *Journal of Nanomaterials*, Volume 2009 (2009), Article ID 498505, 6 pages
- [4] N. RAMESHBABU, T.S. SAMPATH KUMARS, Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, 80A, 581-591
- [5] F. RAHMANI, K.E BAL, Y BAL. Preparation characterization and in vitro release of gentamicin from hydroxyapatite-chitosan biocomposite bone cement', 4th International Symposium on Hydrocarbons and Chemistry (ISHC4), 24-26 Mars 2008 à GHARDAÏA, Faculté des Hydrocarbures et de Chimie BOUMERDES Algérie.
- [6] F. RAHMANI, K.E BAL, Y BAL. Chitosan-Calcium Phosphate Cement as a Biodegradable Biocomposite Carrier Material for Local Delivery of Oxytetracycline in Bone Infections", Septième Symposium National de Chimie Organique, Industrielle et Pharmaceutique (7^e SNCOIP), 13-14 décembre 2008, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen. Algérie.
- [7] N. VELMURUGAN, GNANA KUMAR, SANG SUB HAN, KEE SUK NAHM, and YANG SPP LEEL, *Iranian Polymer Journal* 18 (5), 2009, 383-392)
- [8] BISHARA S. ATIYEH, MICHEL COSTAGLIOLA, SHADY N. HAYEK, SAAD A. DIBO. *burns* 33 (2007) 139 – 148
- [9] T. N. KIM, Q. L. FENG, Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{+2}) in hydroxyapatite, *MATERIALS IN MEDICINE* 9 (1998) 129-134
- [10] JIN-KU LIU, XIAO-HONG YANG, Preparation of silver/hydroxyapatite nanocomposite spheres, *Powder Technology* 184 (2008) 21–24
- [11] Q. L. FENG, F. Z. CUI, Ag-substituted hydroxyapatite coatings with both antimicrobial effects and biocompatibility *Journal Of Materials Science Letters* 18 (1999) 559-561

- [12] Y. CHEN, X. ZHENG Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings, *Mater Med* (2008) 19:3603–3609
- [13] ELLIOT J.C., *Structure and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates Series*, 1994, Amsterdam, Elsevier. Editor.
- [14] P. DASGUPTA, A. SINGH, Synthesis and characterization of hydroxyapatite produced from Eggshell
- [15] SAMINA AHMED, MAINUL AHSAN, Synthesis of Ca-hydroxyapatite Bioceramic from Egg Shell and its Characterization *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 43(4), 501-512, 2008
- [16] ERIC M. RIVERA A, MIGUEL ARAIZA, Synthesis of hydroxyapatite from eggshells, *Materials Letters* 41 _1999. 128–134
- [17] M. A. FANOVIC and J. M. PORTO LOPEZ, “Influence of temperatures and additives on the microstructure and sintering behaviour of hydroxyapatite with different Ca/P ratios,” *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 9, 53-60 (1998).
- [18] A. SLOSARCZYK, and J. PIEKARCZYK, “Ceramic materials on the basis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate” *Ceram. Inter.*, 25, 561-565 (1999).
- [19] M. HADIOUI, thèse: synthèse de l’hydroxyapatite et de silices greffées pour l’élimination de métaux toxiques en solution aqueuse. Université MOULOUD MAMMERRI – TIZI-OUZOU Algérie 2007.
- [20] J. LEMAITRE, cours Biomatériaux "Histoire d'Os...", section science et génie des matériaux M1, Laboratoire de Technologie des Poudres-EPFL MX Ecublens, Lausanne SUISSE 2004
- [21] F.H JONES, *teeth and bones: application of surface science to dental materials and related biomaterials*
- [22] Dr M. ZAGHEZ -ANNABA-, mémoire : La chirurgie osseuse additive & matériaux de comblement en parodontie.
- [23] H.S.LIU, T.S.CHIN, hydroxyapatite synthesis by a simplified hydrothermal method, *ceramics International* 23 (1997) 19-25
- [24] RICHARD R, RIMAN, solution synthesis of hydroxyapatite designer particulates , *Solid State Ionics* 151 (2002) 393-402
- [25] H.K VARMA, J.M.G VENTURA, Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method, *Ceramics International* 31(2005) 109- 114

- [26] S. RAYNAUD, E. CHAMPION, calcium phosphate apatite with variable Ca/P atomic ratio I, Synthesis, characterisation and thermal stability of powders, *Biomaterials* 23 (2002) 1065-1072.
- [27] S. KANNAN, J.M.G VENTURA, Effect of sodium addition on the preparation of hydroxyapatites, and biphasics, *ceramics International* 34 (2008) 7-13
- [28] MAACHOU, K.E BAL, Y. BAL, "Study on preparation of chitosan/hydroxyapatite biomaterials by freeze-gelation method" *Trends in Biomaterials&Artificial Organs Journal (TB&AO)*, n°2, pp- 15-25 (2008)
- [29] A. CUNEY T AS, combustion synthesis of calcium phosphate bioceramics powders, *Journal of the European Ceramics Society* 20 (2000) 2389-2394
- [30] 'Hydroxyapatite' Wikipedia, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Hydroxyapatite>
- [31] Y. SHIKINAMI, M.OKUNO, Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): Part I. Basic characteristics *Biomaterials* 20 (1999) 859-877
- [32] S. DEVILLE, E. SAIZ, Freeze casting of hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 5480-5489
- [33] R. TAHIR, K. BANERT, Zinc bromide supported on hydroxyapatite as a new and efficient solid catalyst for Michael addition of indoles to electron-deficient olefins, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 246 (2006) 39-42
- [34] A. SMAHI, A. SOLHY, Potassium fluoride doped fluorapatite and hydroxyapatite as new catalysts in organic synthesis, *Applied Catalysis A: General* 250 (2003) 151-159
- [35] S. WUYTS, D.E. DE VOS, A heterogeneous Ru-hydroxyapatite catalyst for mild racemization of alcohols, *Journal of catalysis* 219 (2003) 417-424
- [36] J. BOISSON, A. RUTTENS, Evaluation of hydroxyapatite as a metal immobilizing soil additive for the remediation of polluted soils. Part1. Influence of hydroxyapatite on metal exchangeability in soil, plant growth and plant metal accumulation, *Environmental Pollution* 104 (1999) 225-233
- [37] P.K. CHATURVEDI, C.S SETH, Sorption kinetics and leachability of heavy metal from the contaminated soil amended with immobilizing agent (humus soil and hydroxyapatite), *Chemosphere* 64 (2006) 1109-1114
- [38] F. MONTEIL-RIVERA, M. FEDOROFF, Sorption of Selenite (SeO_3^{2-}) on hydroxyapatite: An Exchange Process, *Journal of Colloid and Interface Science* 211 (2000) 291-300
- [39] AMANULLAH M, YU L. *J Petrol Sci Eng* 2005;48:199.

- [40] VIGNESHWARAN N, NACHANE RP, BALASUBRAMANYA RH, VARADARAJAN PV. *Carbohydr Res* 2006;341:2012.
- [41] HUANG H, YANG X. *Carbohydr Res* 2004;339:2627.
- [42] RAVEENDRAN P, Fu J, WALLEN SL. *J Am Chem Soc* 2003;125:13940.
- [43] YIN YADONG, LI ZHI-YUAN, ZHONG ZIYI, GATES BYRON, VENKATESWARAN SAGAR. *J Mater Chem* 2002;12:522.
- [44] HE Y, WU Y, LU G, SHI G. *Mat Chem Phys* 2006;98(1):178.
- [45] KVÍTEK LIBOR, PRUCEK ROBERT, PANÁČEK ALEŠ, NOVOTNÝ RADKO, HRBÁČ JAN, ZBOŘIL RADEK. *J Mater Chem* 2005;15:1099
- [46] PANACEK A, KVITEK L, PRUCEK R, KOLAR M, VECEROVA R, PIZUROVA N, et AL. *J Phys Chem* 2006;110(33):16248
- [47] KVITEK L, PANACEK A, SOUKUPOVA J, KOLAR M, VECEROVA R, PRUCEK R, et AL. *J Phys Chem C* 2008;112:5825
- [48] SOUKUPOVA J, KVITEK L, PANACEK A, NEVECNA T, ZBORIL R. *Mater Chem Phys* 2008;111:77.
- [49] YU D, YAM VW-W. *J Am Chem Soc* 2004;126:13200.
- [50] YU D, YAM VW-W. *J Phys Chem B* 2005;109(12):5497.
- [51] COLLERA-ZUNIGA O, JIMENEZ FG, GORDILLO RM. *Food Chem* 2005;90:109.
- [52] JAGADEESH BH, PRABHA TN, SRINIVASAN K. *Plant Sci* 2004;167:1263.
- [53] Y. BAL, K.E. BAL, O. LAARBI-BOUAMRANE A. LALLAM "Copper (II) uptake by *Pleurotu Mutilus* biomass, Chitin and Chitosan" *Mineral Engineering Journal* 19 pp. 1456-1458 (2006)
- [54] WEINSTOCK IA. *Chem Rev* 1998;98:113.
- [55] TROUPIS A, HISKIA A, PAPACONSTANTINO E. *Angew Chem Int Ed* 2002;41:1911.
- [56] ZHANG G, KEITA B, DOLBECQ A, MIALANE P, SECHERESSE F, MISERQUE F, et AL. *Chem Mater* 2007;19:5821.
- [57] ARUMUGAM SK, SASTRY TP, SREEDHAR SB, MANDAL AS. *J Biomed Mater Res* 2007;80A:391.

- [58] RAMESHBABU N, KUMAR TS, SAMPATH S, PRABAHAKAR TG, SASTRY VS, MURTHY KVGK, et AL. J Biomed Mater Res 2007;80A:581
- [59] BRAYDICH-STOLLE L, HUSSAIN S, SCHLAGER J, HOFMANN MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germ line stem cells. Toxicol Sci 2005;88:412–9.
- [60] HUSSAIN S, HESS K, GEARHART J, GEISS K, SCHLAGER J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells. Toxicol In vitro 2005;19:975–83.
- [61] FENG QL, WU J, CHEN GQ, CUI FZ, KIM TN, KIM JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Biomed Mater 2000;52(4):662–8.
- [62] MORONES JR, ELECHIGUERRA JL, CAMACHO A, RAMIREZ JT. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005;16:2346–53
- [63] SONG HY, KO KK, OH LH, LEE BT. Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. Eur Cells Mater 2006;11:58.
- [64] KREIBIG U, VOLLMER M. Optical properties of metal clusters. Berlin, Germany: Springer; 1995.
- [65] MULVANEY P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. Langmuir 1996;12:788–800.
- [66] PAL S, TAK YK, SONG JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 2007;27(6):1712–20
- [67] RAIMONDI F, SCHERER GG, KOTZ R, WOKAUN A. Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis. Angew. Chem., Int. Ed. 2005;44:2190–209.
- [68] Y.SUN and Y.XIA, Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. Science 298, 2176 (2002).
- [69] J.S.KIM, E.K UK, K.N.YU, J.KIM, S.J.PARK, H.J.LEE, S.H. KIM, Y.K.PARK, Y.H.PARK, C.H WANG, Y.KIM, Y.LEE, D.H. JEONG, and M.CHO, Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 3, 5 (2007).
- [70] L. BERNARD, M. FRECHE, J.L. LACOUT, B. BISCANS, Powder Technol. 103 (1999) 19.

- [71] C.F. LI, F.T. MENG, *Mater. Letter* 62 (2008) 932.
- [72] M. De COMPOS . A.H BRESSIANI, *Bioceramics* 14 (2002) 171
- [73] S.SASIKUMAR and R.VIJAYARAGHAVAN, Low Temperature Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite from Egg Shells by Combustion Method, *Trends Biomater. Artif. Organs*, Vol 19(2), pp 70-73 (2006)
- [74] P. DASGUPTA, A. SINGH, S. ADAK and K. M. PUROHIT Synthesis and characterization of hydroxyapatite produced from eggshell, *International Symposium of Research Students on Materials Science and Engineering December 20-22, 2004, Chennai, India*]
- [75] N. VIGNESHWARAN, R.P. NACHANE, A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch, *Carbohydrate Research* 341 (2006) 2012–2018
- [76] DONGWEI WEI, WEIPING QIAN, Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 62 (2008) 136–142
- [77] WU, L.Q, GADRE, A.P., YI, H., KASTANTIN, M.J., RUBLOFF, G.W., BENTLEY, W.E., PAYNE, G.F., GHODSSI, R., 2002. Voltage-dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface. *Langmuir* 18, 8620–8625
- [78] RABEA, E.I., BADAWY, M.E.T., STEVENS, C.V., SMAGGHE, G, STEURBAUT, W, 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4,1457–1465.
- [79] VARMA, A.J., DESHPANDE, S.V., KENNEDY, J.F., 2004. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. *Carbohydrate Polymers* 55, 77–93
- [80] PALLAB SANPUI, A. MURUGADOSS, The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag nanoparticle composite, *International Journal of Food Microbiology* 124 (2008) 142-146
- [81] LIU F.K, HUANG P.W, CHU T.C and KO F.H 2005 *Mater. Lett.* 59 940
- [82] K J SREERAM, M NIDHIN, Microwave assisted template synthesis of silver nanoparticles, *Bull. Mater. Sci.*, Vol. 31, No. 7, December 2008, pp. 937–942.
- [83] L. JIN, R. BAI, *Langmuir* 18 (2002) 9765.