REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

ABDALLAH Nora

BOUDOUMI Manal

Thème :

Contribution à l'élaboration d'un biomatériau à usage biomédicale

Déposé le :04/06/2023, au jury composé de :

MADANI Leila	Grade : MCB	Univ-Médéa	Présidente
HACHACHE Naima	Grade : MAA	Univ-Médéa	Examinatrice
MAACHOU Hamida	Grade : MCA	Univ-Médéa	Encadreur
ZOUAMBIA Yamina	Grade : MCA	Univ-Médéa	Co-encadreur

Année universitaire : 2022/2023

ملخص

تعتمد هذه الدراسة بشكل أساسي على صياغة الأغشية القائمة على اثنين من البوليمرات الحيوية، وهما البكتين والكزانثان بطريقة تكوين الهلام للاستخدام الطبي الحيوي المحتمل. تم استخدام هيدروكسيباتيت كحشو معدني. الأغشية المتكونة هي أغشية معتمة مستمرة ذات سطح خشن. تم تسجيل أفضل نسبة انتفاخ (2470٪) لأغشية الكزانثان وحدها في الماء المقطر، بينما تم تسجيل نسب أقل لأغشية الكزانثان والهيدروكسيباتيت المركبة. كشفت الدراسة الحركية لتثبيت أيونات الكالسيوم والفوسفات بواسطة أغشية مغمورة في محلول مشابه لسوائل الجسم أن كمية الأيونات المثبتة خلال 21 يوم من المتابعة تصل إلى (3.2 ملغم) كالسيوم و (50-60 ملغم) فوسفات. تجدر الإشارة إلى أن استخدام كل من هيدروكسيباتيت الاصطناعية والتي تم الحصول عليها من عظام الدجاج أعطى نفس النتائج.

الكلمات المفتاحية: البوليمر الحيوي، الغشاء، هيدروكسيباتيت، النشاط الحيوي.

Résumé

Cette étude est principalement basée sur la formulation de membranes à base de deux biopolymères, à savoir la pectine et le xanthane par la méthode de formation de gel pour un usage biomédical potentiel. L'hydroxyapatite a été utilisé comme charge minérale. Les membranes formées sont des membranes opaques continues avec une surface rugueuse. Le meilleur taux de gonflement (2470%) a été enregistré pour les membranes de xanthane seul dans l'eau distillée, tandis que des taux plus faibles ont été enregistrés pour les membranes composites de xanthane et d'hydroxyapatite. L'étude cinétique de la fixation des ions de calcium et de phosphate par les membranes immergées dans une solution simulée de fluides corporels SBF révèle que la quantité des ions fixée pendant 21 jours de suivi atteint (3,2 mg) de calcium et (50-60 mg) de phosphate. Il est a noté que l'utilisation de l'hydroxyapatite synthétique et celle obtenue à partir des os de poulet ont donné les mêmes résultats.

Mots-clés : biopolymère, membrane, hydroxyapatite, bioactivité.

Abstract

This study is mainly based on the formulation of membranes based on two biopolymers, namely pectin and xanthan by the gelefication method for potential biomedical use. Hydroxyapatite has been used as a mineral filler. The membranes formed are continuous and opaque membranes with a rough surface. The best swelling rate (2470%) was recorded for xanthan membranes alone in distilled water, while lower rates were recorded for xanthan and hydroxyapatite composite membranes. The kinetic study of the fixation of calcium and phosphate ions by the membranes

immersed in a simulated solution of body fluids (SBF) reveals that the amount of ions fixed during 21 days of follow-up reaches (3.2 mg) calcium and (50-60 mg) phosphate. It is noted that the use of both synthetic hydroxyapatite and that obtained from chicken bones gave the same results.

Keywords: biopolymer, membrane, hydroxyapatite, bioactivity.



REMERCIEMENTS

Nous remercions Allah le Tout Puissant de nous avoir donné la force, la patience et la volonté pour effectuer ce travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde et sincère gratitude à **Dr MAACHOU Hamida** et à **Dr. ZOUAMBIA Yamina** pour m'avoir encadré et pour toutes les Connaissances scientifiques et les conseils qu'elles m'a apportés. Qu'il trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance pour l'aide permanente qu'elles m'ont apportée. C'est une chance inouïe d'avoir eu l'occasion de travailler sous leur direction.

Nous tenons à exprimer notre gratitude au **Dr. MADANI Leila** et **Mme HACHACHE Naima** pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à tous les enseignants du département des sciences de la matière de la faculté des sciences de l'université de Médéa qui ont participé à notre formation.

Nous n'oublierons pas également tous ceux et celles qui nous ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, notamment « MOSTFAUI Salma », de leur dire Merci beaucoup. Finalement, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicace

J’ai le grand plaisir de dédie ce modeste travail :

A l’homme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n’a jamais dit non à mes exigences et qui n’a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon merveilleux père « **Aissa** », que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A ce qui m’a donnée la vie, la lumière de mes yeux ma très chère mère « **Bakhta** ». Je ne trouve pas les mots pour exprimer ma gratitude en vers tout ce que tu as fait pour moi, pour ton soutien et aide, tu étais toujours à mes cotés,

Je vous serai éternellement reconnaissant

À mes grands-parents décédés «**Omlkhir** » et « **Mohamed** » Rabi yerhamhom.

A mes chères sœurs **Asmaa**, **Hafidha** et **Ritedj**.

A mon bras droit, mon chère frère « Mohamed ».

A mon cher cousin « **Hanane** ».

A mon Cher oncle « **SADAT Abdelrezek** ».

A mon binôme **Manal** que je remercie de m’accompagner au cours de ce travail.

A toute mes amies et mes collègues le long de mes études

A toute ma famille **ABDALLAH** et **SADAT**.

NORA

Dédicace

Je dédie ce mémoire a

Mes chers parents qu'ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu tout au long de ces longues années d'études.

En signe de reconnaissance qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour tout ce qu'ils ont consenti d'efforts et de moyens pour me voir réussir dans mes études

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, A mon cher père « **Omar** » et mon mère « **AGABI Zahiya** »

A mes sœurs **Salma**, **Meriem**, **Bochra** et **Sondos**

A ma lumière de mes yeux mon frère « **Abdou** »

A mon binôme **Nora ABDALLAHA**

A tous ceux qui m'ont soutenu dans mes études et dans ma vie

A mon amie **Sabrina**, **Jila**, **Naima** et **Ratiba**

A ma chère grande mère « **Nekhla BOUZIANI** » Rabi yerhamha

A toute ma famille **BOUDOUMI** et **AGABI**.

MANAL

LISTE DES ABREVIATIONS

UIPAC : l'Union internationale de chimie pure et appliquée.

ADEME : L'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.

PLA : acides polylactiques.

PHA : polyhydroxyalcanoate.

PHV : polyhydroxyvalérate.

PHBV : polyhydroxybutyrate-co-valérate.

GX : La gomme xanthane.

HA : Hydroxyapatite.

SBF: Simulated Body Fluide

LISTE DES FIGURES

Figure I.1: les organes peuvent être remplacés par des biomatériaux ……...7

Figure I.2 : Molécule de la pectine……...13

Figure I.3 : Structure de base de la pectine……...14

Figure I.4 : Pectines hautement méthylées……...14

Figure I.5 : Pectines faiblement méthylées……...15

Figure I.6 : Structure chimique du xanthane…….....18

Figure I.7 : Maille élémentaire de l'HA (Ca_{10} $(PO_4)_6(OH)_2$) suivant l'axe……21

Figure I.8 : Evolution de la nature des complexes de surface d'une apatite en fonction du Ph.....24

Figure II.1. Schéma du principe du spectromètre à transformée de Fourier…….....29

Figure II.2 : Spectre IRTF de la gomme de Xanthane……...31

Figure II.3 : spectre IRTF de pectine…….....31

Figure II.4 : Suspension de L'hydroxyapatite synthétisé……...35

Figure II.5 : Hydroxyapatite synthétique : après séchage (a) et après broyage (b)..…….....35

Figure II.6 : le spectre IRTF de l'HAs……...36

Figure II.7 : Poudre de l'os carbonisé……37

Figure II.8 : La poudre obtenu après calcination à 1000°C……38

Figure II.9 : Spectre IRTF de l'os avant traitement……...38

Figure II.10 : Le spectre IRTF de l'os après calcination à 400°C…….....39

Figure II.11 : Le spectre IRTF de l'os après calcination à 800°C…….....39

Figure II.12 : Le spectre IRTF de l'os après calcination à 1000°C……40

Figure II.13 : Membranes de Pectine et de GX élaborées…….....42

Figure II.14 : Spectre IRTF de M-P 3%.....43

Figure II.15 : Spectre IRTF de M-GX 1%.....43

Figure II.16 : Membranes chargées Pectine/HAs (M-P/HAs)……..45

Figure II.17 : Membranes chargées Xanthane/HA (M-GX/HAs et M-GX/HAn)……46

Figure II.18 : Spectre IRTF de : (a) M-GX/HAn : 30/70 et (b) M-GX/HAs : 30/70……..47

Figure II.19 : Spectre IRTF de : (a) M-GX/HAn : 50/50 et (b) M-GX/HAs : 50/50……47

Figure II.20 : Spectre IRTF de : (a) M-GX/HAn : 70/30 et (b) M-GX/HAs : 70/30……47

Figure II. 21 : Gonflement des membranes chargées M-GX/HAs……50

Figure II.22 : Gonflement des membranes chargées M-GX/HAn……50

Figure II.23 : Virage de la couleur lors du dosage volumétrique des ions de calcium……53

Figure II.24 : Quantité de calcium déposée sur les membranes quotidiennement……54

Figure II.25 : Quantité de calcium cumulative fixé sur les membranes pendant 21jours……...55

Figure II. 26 : Courbe étalonnage……57

Figure II.27 : La quantité de phosphate fixée sur les membranes chaque jour……57

Figure II.28 : La quantité cumulative de phosphate fixée sur les membranes pendant 21 jours…58

Les tableaux

Tableau II.1. Appareillage utilisé……..27

Tableau II.2 : Produits utilisés……..28

Tableau II.3 : Interprétation des spectres FTIR des biopolymères étudiés…….32

Tableau II.4. Taux d'humidité des biopolymères……..34

Tableau II.5 : Interprétation du spectre FTIR de l'HAs……36

Tableau II.6 : Différentes bandes des spectres FTIR de l'os naturel et après calcination à 400°C, 800°C et 1000°C…….41

Tableau II.7: Différentes bandes des spectres FTIR de M-P 3% et M-GX 1%.....44

Tableau II.8 : Pourcentage des biopolymères et de l'HA utilisés pour la préparation des membranes chargées……..45

Tableau II.9 : Interprétation des spectres FTIR des membranes M-GX/HA : 30/70……48

Tableau II.10 : Taux de gonflement des membranes……51

Tableau II.11 : Réactifs utilisés pour la préparation de 100 ml de SBF……52

Tableaux II.12 : Préparation de la courbe d'étalonnage……...56

Sommaire

Introduction générale 14

Chapitre I: Sènthèse bibliographique

I.1 Biomatériaux 2

I.1.1. Définition 2

I.1.2. Historique 2

I.1.3. Différents types de biomatériaux 3

I.1.3.1. Métaux et alliages métalliques 3

I.1.3.2. Céramiques 4

I.1.3.3. Polymères 5

I.1.3.4. Matériaux d'origine naturelle 5

I .1.4. Propriétés des Biomatériaux 5

I.1.4.1. Propriétés mécaniques 5

I.1.4.2. Propriétés physico-chimiques 5

I.1.4.3. Propriétés biologiques 6

I.1.5. Critères de qualité d'un biomatériau 6

I.1.6. Domaines d'applications des biomatériaux 6

I.2. Biopolymère 9

I.2.1. Définition 9

I.2.2. Types de biopolymères 9

I.2.3. Propriétés des biopolymères 10

I.2.3.1. Biodégradabilité 10

I.2.3.2. Biocompatibilité et biorésorbable 11

I.2.3.3. Propriétés chimiques 11

I.2.4. Avantages et inconvénients des biopolymères 11

I.2.5. Applications médicales 12

I.3. Biomatériaux utilisés dans cette étude 12

I.3.1. Pectine 12

I.3.1.1. Définition 12

I.3.1.2. Structure 13

I.3.1.3. Types de pectine 14

I.3.1.4. Propriétés physico-chimiques des pectines 15
I.3.1.5. Domaines d'application 17
I.3.2. Gomme Xanthane 17
I.3.2.1. Définition : 17
I.3.2.2. Structure 18
I.3.2.3. Caractéristiques physicochimique et rhéologique de la GX 18
I.3.2.4. Applications de la GX 19
I.3.3. Hydroxyapatite 20
I.3.3.1. Définition et structure 20
I.3.3.2. Propriétés de l'hydroxyapatite : 21
I.3.3.3. Applications de l'hydroxyapatite 25

Chapitre II: Partie expérimentale

II.1. Introduction 27
II.2. Matériels et produits utilisés 27
II.2.1. Matériels 27
II.2.2 produits 28
II.3. Caractérisation physicochimique des biopolymères 28
II.3.1. Aspect générale 28
II.3.2. Caractérisation par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) 29
II.3.3. Détermination du degré d'estérification de la pectine 32
II.3.4. Evaluation de la teneur en humidité 33
II.4. Synthèse de L'Hydroxyapatite 34
II.5. Hydroxyapatite récupéré à partir de l'os 36
II.6. Préparation des membranes 41
II.6.1. Préparation des membranes des biopolymères seuls 41
II.6.2. Préparation des membranes chargé par L'HA 44
II.6.3. Caractérisation des membranes chargés (M-GX/HA) 46
Conclusion Générale 59
Référence bibliographique 60

Introduction générale

Les biomatériaux sont actuellement utilisés pratiquement partout au niveau du corps humain et leur utilisation est très largement répondue. Les biomatériaux restent un domaine de recherche très actif car chaque nouvelle intervention médicale requiert pratiquement un nouveau biomatériau spécialement adapté.

L'os est un tissu vivant en perpétuel renouvellement. Le maintien de la masse osseuse à l'âge adulte est assuré grâce à l'activité simultanée de deux lignées cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Dans le cas de larges pertes de substances osseuses (ostéoporose ou suite à une exérèse tumorale), le mécanisme naturel de renouvellement n'est plus suffisant. Un apport de matière extérieur devient alors indispensable pour traiter le traumatisme. Les matériaux d'origine biologique ont connu une utilisation très large pour la reconstitution de défauts osseux. Cependant, les allogreffes présentent des risques de rejet alors que l'autogreffe nécessite un second site opératoire. Les progrès réalisés dans le domaine des matériaux ont permis de pallier ces inconvénients grâce au développement de greffons synthétiques biocompatibles (polymère, alliage métallique, céramique, verre...).

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressées à l'élaboration des membranes (Xanthane/Hydroxyapatite) et (pectine/Hydroxyapatite) à différentes concentrations, en passant d'abord par la synthèse de l'hydroxyapatite et son extraction à partir de l'os de poulet. Pour ce faire, ce manuscrit est structuré en deux chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique permettant de mieux appréhender, de façon générale les concepts théoriques de ce travail. Il rassemble les données essentielles sur les biomatériaux et leur Classification avec un rappel détaillé sur la structure et la caractérisation de pectine, xanthane et hydroxyapatite.
- Le deuxième chapitre concerne notre partie expérimentale (matériels, méthodes, résultats et discussions) dans lequel sont présentés les deux méthodes d'obtention de l'hydroxyapatite (par voie de synthèse et par récupération à partir des os de poulets), la préparation des membranes chargées d'hydroxyapatite, leurs caractérisations et leur test de bioactivité in vitro.
- Enfin, notre mémoire se termine par une conclusion générale relevant les principaux résultats de cette étude et les perspectives envisagés.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

I.1 Biomatériaux

I.1.1. Définition

Les Biomatériaux recouvrent une grande variété d'applications biomédicales puisqu'ils peuvent être à la fois des matériaux de réparation des lésions tissulaires et des matériaux implantables et être constitutifs de systèmes d'assistance extra corporelle. L'objectif de leur développement est de permettre la fabrication de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer les fonctions des organes lésés. Ils ne se définissent donc pas par une nature particulière mais par l'usage auquel on les destine : ils regroupent aussi bien des matériaux issus du génie de l'homme (métaux, alliages métalliques, céramiques, matières plastiques) que des matériaux d'origine naturelle (collagène et cellulose), mais aussi des matériaux d'un nouveau type associant un des matériaux précités à une matrice biologique [1].

Un Biomatériau est donc défini comme étant : "Un matériau non vivant utilisé et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques " [1].

I.1.2. Historique

D'après Jandt, l'évolution des biomatériaux au cours du dernier siècle peut se diviser en quatre générations de matériaux qui se distinguent, en tenant compte des différents besoins, des matériaux implantables en contact avec le corps humain et en milieu biologique.

La première génération comprend les matériaux en acier, en polyéthylène et les métaux nobles tel que l'or.

La deuxième génération comprend des matériaux utilisés auparavant dans l'aéronautique, mais ils sont inertes et passifs avec d'excellentes propriétés mécaniques. Ce sont le titane et ces alliages. Ces matériaux ont dominé le marché des biomatériaux. Le titane et ses alliages sont intensivement utilisés dans l'implantation à cause de leurs excellentes propriétés mécaniques, mais ils prennent du temps pour se greffer sur le tissu de l'os et parfois il y'a rejet de l'implant.

Afin d'améliorer la bio-activité des matériaux implantables, une troisième génération a fait son apparition. Elle comprend les matériaux qui ont des similitudes avec le tissu de l'os au moins dans sa composition chimique comme l'hydroxyapatite, les composés de phosphate de

calcium et les bio-glass. Ces matériaux présentent une excellente biocompatibilité, mais il y'a toujours des lacunes à améliorer à cause de leurs propriétés mécaniques très faibles.

La quatrième génération présente une véritable révolution. Il s'agit des matériaux implantables qui interagissent en profondeur avec les systèmes biologiques. Ces matériaux peuvent même lutter contre les infections qui apparaissent après l'implantation. Ces matériaux sont encore au stade de la recherche car ils demandent beaucoup d'argent et de temps. Pour cela cette génération ne pénètre que lentement sur le marché [2].

Actuellement, une interaction positive est clairement visée, dans le but d'une intégration plus rapide et durable des implants et une guérison des tissus. On cherche alors des matériaux dits 'bioactifs', qui présentent une affinité avec les tissus environnant et permettent une intégration plus rapide des biomatériaux [3-5].

I.1.3. Différents types de biomatériaux

D'après ce qui précède, le domaine des biomatériaux est très vaste et regroupe plusieurs produits. Les développements récents des biomatériaux céramiques ou polymères pourrait nous donner l'impression qu'il n'y a plus d'avenir pour les biomatériaux métalliques. En fait, si les céramiques et polymères présentent des caractéristiques intéressantes, ils présentent toujours des lacunes, spécialement dans leurs propriétés mécaniques. C'est pourquoi il est très important de penser en termes de biomatériaux métalliques, de rassembler les propriétés mécano-chimiques des deux types pour compenser leurs différentes faiblesses. Les différents types des biomatériaux peuvent être classés en quatre groupes :

- Les métaux et alliages métalliques,
- Les céramiques,
- Les polymères,
- Les autres matériaux d'origine naturelle ou composite.

I.1.3.1. Métaux et alliages métalliques

Ce sont en quelques sortes les « ancêtres » des biomatériaux puisque ce sont les premiers qui ont été utilisés pour faire des implants.

- **Aciers inoxydables :** l'intérêt de l'acier dans ce domaine réside dans ses excellentes propriétés mécaniques [6]. Ils sont largement utilisés en chirurgie orthopédique.
- **Alliages cobalt – chrome :** sont principalement utilisés dans le domaine des chirurgies cardiovasculaires, orthopédiques et l'implantation dentaire [7]. On les trouve également utilisés en implant dentaire, barre spinale et dans la reconstruction d'orbite oculaire. Les alliages les plus connus sont CoCrMoNi (Vitallium : Co :28%, Cr : 28%, Mo : 6%, Ni : 2%), CoCrWNi et CoCrMo.
- **Alliages à base de nickel :** Le nickel est un métal facile à travailler, donc les alliages à base de nickel ont servi pour la fabrication de prothèses dentaires. Ces matériaux sont aussi susceptibles d'être fissurés par corrosion, raison pour laquelle ils sont peu employés [8,9].
- **Alliages à base de titane :** Le titane et ses alliages sont de loin les biomatériaux métalliques les plus fréquemment utilisés, grâce à leurs bonnes propriétés mécaniques. Ils représentent des matériaux de choix pour les applications biomédicales.
- **Métaux nobles :** A cette catégorie, on rattache le tantale, le palladium, le platine, l'or, l'argent, l'iridium et le niobium. La plus connue est l'utilisation de l'or en dentisterie. Le coût élevé de ces matériaux rend leur utilisation de plus en plus rare.

I.1.3.2. Céramiques

Les céramiques se caractérisent par une température de fusion élevée et un comportement fragile, qui déterminent leurs domaines d'application. Elles incluent des oxydes, des sulfures, des borures, des nitrures, des carbures, des composés intermétalliques. Dans le domaine des biomatériaux, on rencontre principalement les céramiques bioinertes représentées par l'alumine et la zircone. Ils présentent des propriétés, principalement en compression. La plus connue, le tetragonal zirconiapolycrystal (TZP) (TZP– ZrO_2 + 3% Y_2O_3) est employée au sein de prothèses de hanche totale [10].

Il faut signaler tout particulièrement les utilisations et les développements de deux céramiques à base de phosphate de calcium dite bioactives : l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique. La caractéristique de ces céramiques est une composition chimique qui se rapproche le plus possible de celle de l'os naturel : le phosphate de calcium [11, 12].

I.1.3.3. Polymères

Les utilisations des polymères dans le domaine des biomatériaux sont extrêmement nombreux. Les deux grandes tendances de l'usage des polymères concernent : les polymères fonctionnels qui sont susceptibles d'avoir une fonction chimique particulière à l'interface matériau-tissu vivant, à savoir par exemple la capacité d'interaction avec les tissus osseux ; et les polymères résorbables tels que les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique qui sont utilisables en chirurgie orthopédique traumatologique [13].

I.1.3.4. Matériaux d'origine naturelle

Le souci de biocompatibilité a orienté les chercheurs vers des matériaux logiquement biocompatibles puisque d'origine naturelle. Ils se distinguent en biomatériaux d'origine végétale et biomatériaux d'origine animale [14].

I .1.4. Propriétés des Biomatériaux

Les biomatériaux doivent avoir des propriétés mécaniques et physico-chimiques aussi proches que possibles des propriétés de l'organe ou de la partie de l'organe où ils sont appelés à fonctionner. Ces propriétés peuvent être regroupées selon trois grands thèmes [15].

I.1.4.1. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques (module d'élasticité, dureté, résistance à la compression…etc.) doivent être aussi proches que possible des propriétés de l'organe remplacé. Elles doivent être garanties après implantation. Il est important de signaler qu'en fonction du type d'essai réalisé sur un échantillon, les modules d'Young obtenus peuvent être différents. Ceci s'explique principalement par les propriétés mécaniques de l'échantillon (comme l'anisotropie) mais également par l'essai lui-même. Dans les méthodes expérimentales de caractérisation, de nombreux paramètres influencent la mesure des propriétés mécaniques ou physiques : les dimensions, les conditions aux limites des échantillons, les modes de chargement (statique ou dynamique) et la précision des moyens de mesures [15].

I.1.4.2. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques (forme, taille, température de traitement, composition chimique, corrosion, biodégradation…etc.) ont également une importance pour réussir l'utilisation d'un biomatériau. La stérilité des matériaux implantables doit pouvoir être garantie et implique que ces matériaux puissent être stérilisés sans modification de leurs propriétés physico-chimiques et de façon à ne pas être vecteurs de germes [15].

I.1.4.3. Propriétés biologiques

Les caractéristiques biologiques (bio-adhésion, réactions allergiques et toxiques, biodégradation) se définissent par la réaction du vivant au contact des matériaux. Le matériau ne doit pas introduire de toxicité, ni par lui-même ni par ses produits de dégradation ou de relargage. Les biomatériaux doivent répondre à un cahier des charges précis afin de permettre une réponse biologique optimale [15].

I.1.5. Critères de qualité d'un biomatériau

En 1953, SCALES définit les critères de qualité d'un biomatériau qui sont toujours d'actualité. Il doit être [16] :

- ✓ Chimiquement et physiquement inerte
- ✓ Le moins inflammatoire possible
- ✓ Non cancérigène
- ✓ Non allergisant
- ✓ Non toxique
- ✓ Chimiquement et physiquement stable
- ✓ De caractéristiques mécanique proches du site de receveur
- ✓ Rétablissant une fonction
- ✓ Aisément introduit

I.1.6. Domaines d'applications des biomatériaux

La chirurgie réparatrice et celle de la suppléance fonctionnelle constituent le domaine D'application le plus important des biomatériaux. D'autres spécialités médicales recourent également à des outils d'investigation ou d'intervention endoscopique impliquant l'emploi des matériaux appelés aussi à être confrontés au milieu biologique [17]. La figure I.1 montre les organes pouvant être remplacés par des biomatériaux.

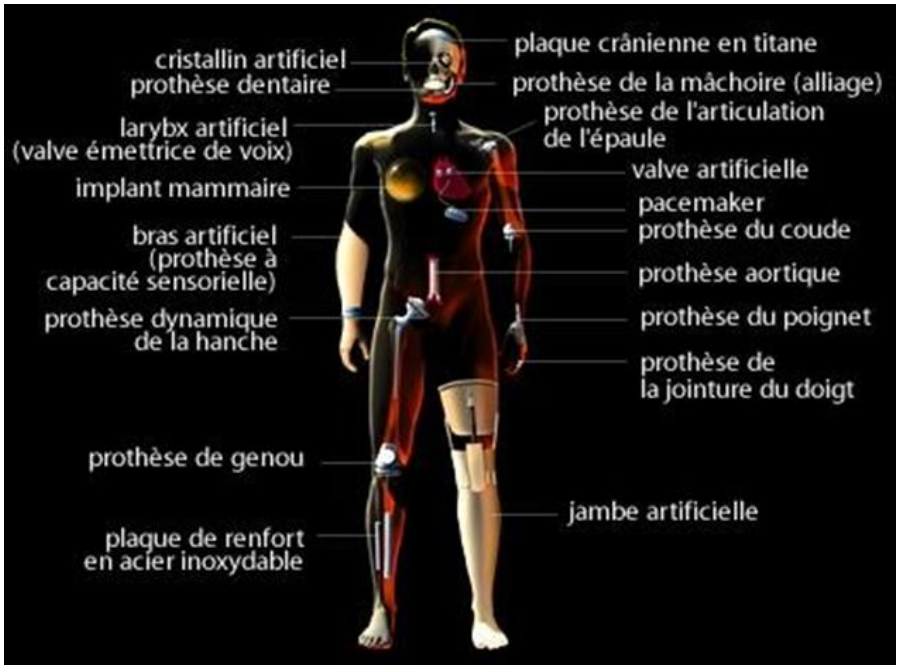


Figure I.1: les organes peuvent être remplacés par des biomatériaux [18]

Dans ce qui suit, on va énumérer les formes d'utilisation des biomatériaux dans le domaine biomédical [18].

- **Ophtalmologie**
- Lentilles
- Implants
- Coussinets de récupération
- Produits visqueux de chambre postérieure
- **Odontologie-stomatologie**
- Matériaux de restauration et comblement dentaire et osseux
- Traitements prophylactiques
- Orthodontie
- Traitement du parodonte et de la pulpe
- Implants
- Reconstruction maxillo-faciale
- **Chirurgie orthopédique**

- Prothèses articulaires (hanche, coude, genou, poignet, ...)
- Orthèses
- Ligaments et tendons artificiels
- Cartilage
- Remplacement osseux pour tumeur ou traumatisme
- Chirurgie du rachis
- Réparation de fractures (vis, plaques, clous, broches)
- Matériaux de comblement osseux injectable

o **Cardiovasculaire**

- Valves cardiaques
- Matériel pour circulation extracorporelle (oxygénateurs, tubulures, pompes, ...)
- Cœur artificiel
- Assistance ventriculaire
- Stimulateurs cardiaques
- Prothèses vasculaires
- Matériels pour angioplastie liminale coronarienne et stents
- Cathéters endoveineux

o **Urologie/ néphrologie**

- Dialyseurs
- Poches, cathéters et tubulures pour dialyse péritonéale
- Rein artificiel portable
- Prothèses de pénis
- Matériaux pour traitement de l'incontinence

o **Endocrinologie-chronothérapie**

- Pancréas artificiel
- Pompes portables et implantables
- Systèmes de libération contrôlée de médicaments
- Biocapteurs

o **Chirurgie esthétique**

- Matériaux et implants pour chirurgie esthétique
- Chirurgie générale et divers

- Drains de chirurgie
- Colles tissulaires
- Peau artificielle
- Produits de contraste
- Produits pour embolisation
- Produits pour radiologie interventionnelle

I.2. Biopolymère

I.2.1. Définition

Selon l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UIPAC), Les biopolymères se définissent comme étant des biomacromolécules synthétisées par des organismes vivants. Et selon l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables (biosources durables) de plantes, d'algues ou d'animaux [19]. Les biopolymères peuvent aussi être obtenus par polymérisation de monomères naturels et par la fermentation des micro-organismes.

Les biopolymères sont obtenus à partir de polymères naturels (biodégradables), de polymères synthétiques susceptibles d'être attaqués par des micro-organismes, ou d'un mélange des deux familles [20].

Les polymères qui intéressent l'industrie des matériaux composites sont ceux qui se dégradent en quelques années et présentent des performances mécaniques suffisantes pour des pièces techniques, puisqu'ils jouent le rôle de matrice dans la plupart des cas.

I.2.2. Types de biopolymères

On dénombre cinq types différents de biopolymères que l'on peut regrouper en trois classes :

a) Polymères de synthèse : ce sont des polymères d'origine fossile.

b) Polymères biodégradables : ce sont des polymères d'origine fossile (issus du pétrole) auxquels est ajouté un additif qui permet de favoriser leur dégradabilité.

c) Biopolymères de biomasse : ce sont les polymères issus de la biomasse ; il en existe trois sortes :

- Biopolymère issus de la faune et de la flore : cette famille comprend par exemple L'amidon, la cellulose, les protéines, etc.
- Biopolymères produits par polymérisation chimique : cette famille est essentiellement constituée des acides polylactiques (PLA).
- Biopolymères produits par des micro-organismes génétiquement modifiés : Comme par exemple, le polyhydroxyalcanoate (PHA), le polyhydroxyvalérate (PHV), le polyhydroxybutyrate-co-valérate (PHBV) [21].

I.2.3. Propriétés des biopolymères

De par leur structure chimique, les biopolymères présentent des propriétés particulières et intéressantes pour des applications bien spécifiques en industrie plastique. Parmi ces propriétés, on cite :

I.2.3.1. Biodégradabilité

La biodégradabilité est la propriété la plus importante pour caractériser l'impact d'un produit organique sur l'environnement. La biodégradabilité est un processus naturel de décomposition de la matière organique. Elle est due à la présence de liaisons facilement clivables comme les liaisons esters ou amides conduisant à la formation de molécules simples et de fragments de plus petite taille [22].

Quatre éléments y concourent : avant tout, les micro-organismes sans lesquels aucune biodégradation ne serait possible, l'humidité, l'oxygène et la température. La durée nécessaire pour une biodégradation totale des matériaux, pour la bio-assimilation, est importante à considérer, puisqu'en fonction de l'utilisation du matériau, une durée trop courte ou trop longue n'a pas nécessairement d'intérêt [23].

La biodégradabilité peut toutefois, dans certains cas, être très utile sans qu'il y ait compostage, c'est le cas de certaines applications agricoles telles que le paillage par exemple [23].

I.2.3.2. Biocompatibilité et biorésorbable

Un matériau biocompatible est un matériau qui est capable d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner. En plus de la biocompatibilité, on recherche également pour des applications médicales spécifiques des matériaux biorésorbables pouvant se décomposer tout naturellement dans l'organisme humain pour être remplacés après par un tissu vivant. Les biopolymères se dégradent naturellement dans l'organisme humain par hydrolyse (enzymatique) et libèrent des molécules assimilable et non toxique [24].

I.2.3.3. Propriétés chimiques

La présence de fonctions chimiques sur les molécules leur attribue des propriétés particulières et des facilités à réagir avec d'autres molécules. Leur réactivité est due à la présence des fonctions alcool, acide, amine, ou aldéhyde qui réagissent facilement grâce à leur site nucléophile et électrophile.

La présence de certaines insaturations et des groupements hydroxydes sur les chaines alkyles des triglycérides permet leur fonctionnalisation et conduit à la formation de polyuréthanes, polyamides ou polyesters. Dès lors, on peut modifier les propriétés physiques et mécaniques des polymères ainsi que leurs applications [25].

I.2.4. Avantages et inconvénients des biopolymères

- **Principaux avantages des biopolymères**

Les principaux avantages, que présentes les biopolymères sont [26] :

- Neutralité en termes de cycle CO_2,
- Gestion de fin de vie facilitée par le compostage,
- Panel varié de biopolymères disponibles,
- Issus de ressources abondamment renouvelables,
- Transformables par les processus traditionnels (extrusion, extrusion gonflage, injection, thermoformage),
- Haute valeur ajoutée.

- **Inconvénients des biopolymères**

Ils présentent aussi des inconvénients comme [26] :

- Prix de vente élevé (coût + faible production),
- Propriétés physiques parfois limitées,
- Flou normatif et législatif concernant la notion de biodégradabilité (secteur du polymère peu structuré internationalement),
- Compostage industriel des déchets bio-polymérique peu développé.

I.2.5. Applications médicales

L'utilisation des biomatériaux dans ce secteur nécessite une très bonne maîtrise de la technologie thérapeutique. Ainsi le choix de l'utilisation d'un matériau biosourcé dans un corps vivant doit être accompagné d'une connaissance approfondie de la relation contrôlée entre les propriétés mécaniques et le temps de dégradation [27]. On peut trouver ces biopolymères dans les fils de sutures chirurgicales, le greffage vasculaire, les peaux artificielles et comme système de libération contrôlée de médicaments [28].

I.3. Biomatériaux utilisés dans cette étude

I.3.1. Pectine

I.3.1.1. Définition

Les pectines ou plus largement les substances pectiques sont des substances d'origine végétale. Ce sont des polysaccharides complexes que l'on retrouve principalement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des plantes supérieures [29, 30]. Elles jouent un rôle important dans l'adhésion et le maintien des cellules des tissus végétaux en formant un ciment rattachant les cellules les unes aux autres [31].

Le terme pectine demeure néanmoins ambigu en ce sens qu'il décrit plusieurs catégories de molécules distinctes. En fait, il désigne une famille d'oligo et polysaccharides qui présentent des caractéristiques communes. Cependant, si l'on s'en réfère à leur structure fine, pourront être très différente. Il est à signaler que toutes les pectines présentent une caractéristique commune d'être riche en acide galacturonique qui est considéré comme monosaccharide marqueur [32].

I.3.1.2. Structure

Les polysaccharides pectiques sont formés de chaînes principales constituées de galacturonane et de rhamnogalacturonane, et de chaînes latérales constituées d'arabinane et de galactane [33].

Les pectines sont constituées essentiellement par des résidus d'acide galacturonique (GalA) liés entre eux par des liaisons α-(1-4), partiellement acétylés ou estérifiés par des groupes méthyles [34, 35]. La figure I.2 représente la structure de la chaine principale de la pectine.

La pectine est également constituée de xylose qui s'insère dans la chaîne principale [36]. Il existe principalement plusieurs substances pectiques, on y trouve les protopectines qui sont des pectines hydrolysées, puis les pectines qui sont des acides polygalacturoniques partiellement ou entièrement estérifiés. Ensuite les pectinates qui sont des sels de pectines, les acides pectiques qui sont essentiellement des acides polygalacturoniques non estérifiés. Enfin les pectates qui sont les sels d'acide pectique [36].

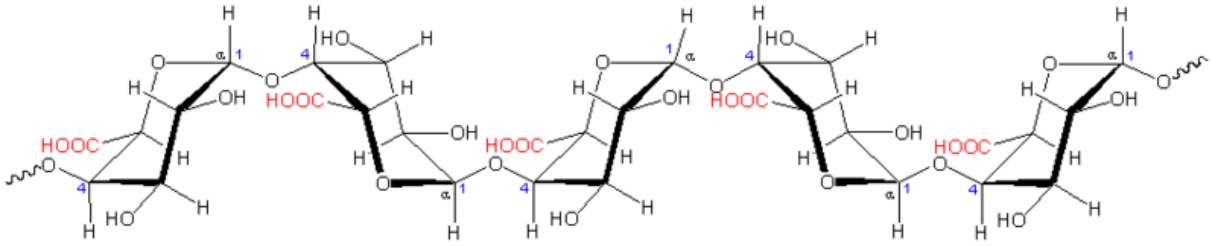


Figure I.2 : Molécule de la pectine [37]

Leur structure est souvent idéalisée par la succession de zones dites "lisses" constituées d'homogalacturonanes et de zones dites "hérissées" constituées d'un squelette principal "rhamnogalacturonane I" branché par des chaînes latérales d'oses neutres. Ces trois entités "homogalacturonane", "rhamnogalacturonane I", "chaînes latérales d'oses neutres" forment les domaines constitutifs des pectines. Les oses constitutifs des pectines sont estérifiés par différents substituants non osidiques. Les acides galacturoniques constitutifs des zones homo-

et rhamnogalacturoniques peuvent être estérifiées en C-6 par du méthanol et en C-2 et/ou en C-3 par de l'acide acétique. La figure I.3 représenté la ramification de la chaine de pectine.

Chez certains végétaux, les oses constitutifs des chaînes latérales (arabinose et galactose) sont estérifiés par l'acide férulique [38].

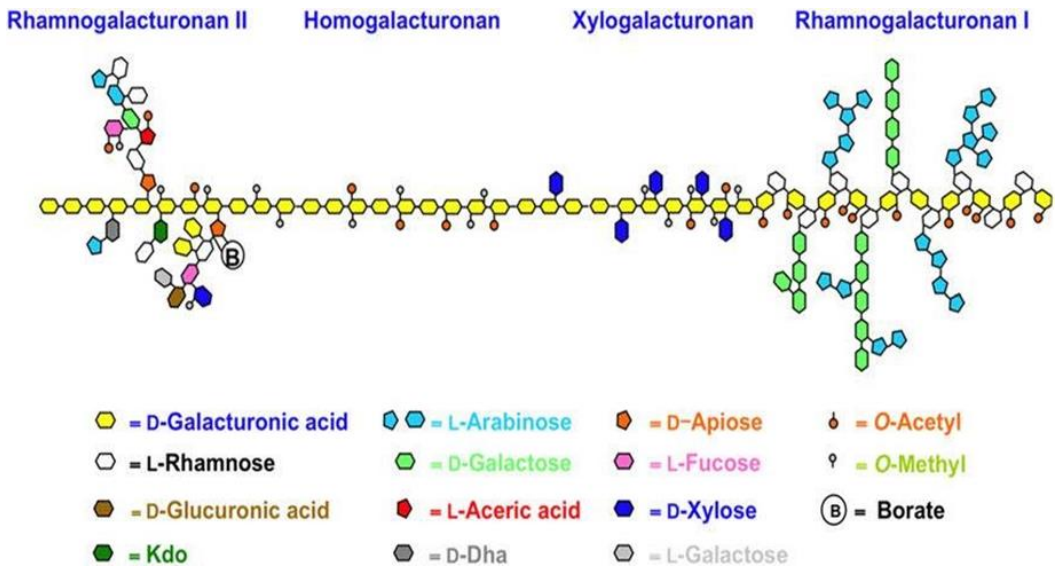


Figure I.3 : Structure de base de la pectine [39].

I.3.1.3. Types de pectine

Le substituant méthanol joue un rôle majeur dans les propriétés des pectines. On distingue ainsi deux grandes catégories.

- Les pectines "hautement méthylées" (HM pour High Méthoxyl) (Figure I.4) ayant un DM>50 %, majoritairement présentes dans la nature [40].

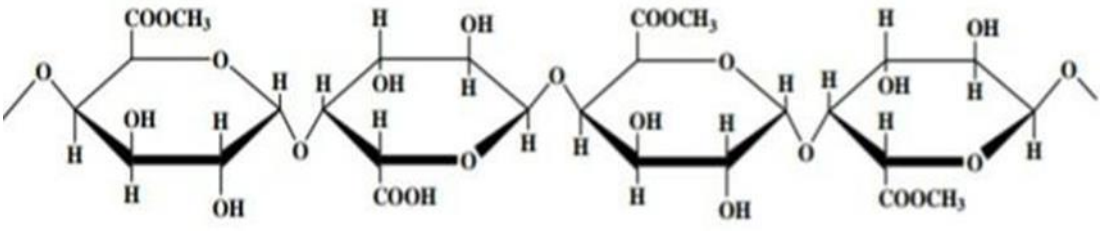


Figure I.4 : Pectines hautement méthylées [40].

- Les pectines "faiblement méthylées" (LM pour Low Méthoxyl) (Figure I.5) ayant un DM<50 % obtenues à partir des pectines HM par différentes réactions chimiques [41].

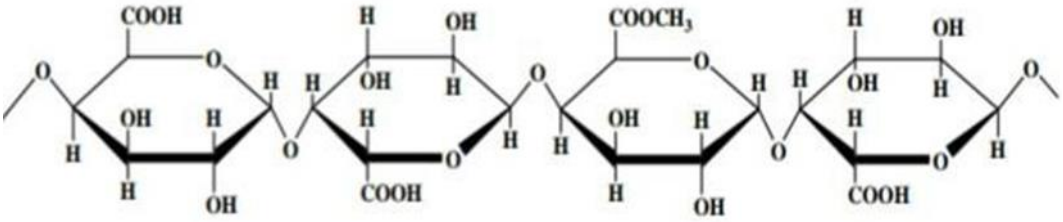


Figure I.5 : Pectines faiblement méthylées [40]

I.3.1.4. Propriétés physico-chimiques des pectines

Les substances pectiques ont plusieurs propriétés physico-chimiques, celles qui sont importantes sont décrites ci-dessous :

a) Solubilité

La solubilité des substances pectiques dépond de leur masse moléculaire, de la présence de chaine latérale et du degré de méthylation ainsi que la distribution des groupes méthyles le long de la chaine principale.

D'une façon générale, un polyholoside constitué de monomères identiques non substitués est insoluble dans l'eau car les macromolécules du fait de cette régularité structurale, peuvent facilement s'associer entre elles par de nombreuses liaisons hydrogènes. Ainsi, un acide polygalacturonique, est insoluble dans l'eau et ne deviendra soluble qu'après neutralisation des fonctions carboxylique.

En général, les pectines sont solubles en milieux aqueux (eau, solutions tampons à faible force ionique) comme le formamide, le dimethyl-formamide, et le glycérol [42].

b) Stabilité

Les pectines en solution sont stables à pH 3-4. Pour des pH<3, et à basse température, les groupements acétyles et méthyles sont déstabilisés et les sucres neutres sont hydrolysés. Si la température augmente, l'hydrolyse est accélérée. En milieu alcalin et à basse température, les groupements esters sont saponifiés. En milieu neutre et à température ambiante, la saponification est accompagnée de la réaction de dépolymérisation. Cette dégradation a lieu uniquement dans les liaisons glycosidiques et dans les résidus de l'acide galacturonique méthoxylés. À des températures >60°C, la dégradation n'a lieu qu'à pH légèrement acide (pH proche de 5) [43].

c) Viscosité des pectines

Cette propriété est obtenue quand les molécules modifient le comportement de la phase continue du fait de leur structure (PM/encombrement/...) sans pouvoir créer de zones de jonctions. Les pectines HM de haut poids moléculaire dans les milieux non propices à la gélification (ex : boisson fruitée) présentent cette propriété. En ce qui concerne les pectines LM, on parlera plutôt de comportement typiquement viscoélastique, dont chacune des composantes peut être modifiée en fonction, par exemple, de la teneur en calcium du milieu réactionnel. Ces pectines sont largement exploitées dans les confitures, gelées et marmelades. La viscosité des solutions de pectines totalement méthylées est indépendante du pH au contraire des solutions de pectines comportant des fonctions carboxyliques libres [44].

d) Pouvoir stabilisant et pouvoir épaississant

Dans ce cas, la propriété recherchée permet d'éviter la séparation d'un milieu hétérogène (ex : mix pour glace/préparation de fruits avec morceaux/boissons cacaotées...). Cette propriété peut être obtenue de différentes manières :

- Soit par augmentation de la viscosité, mais qui peut être un facteur limitant pour certaines applications où une forte viscosité est incompatible avec la rhéologie du produit.

- soit par création d'un réseau suffisamment efficace pour maintenir des particules en suspension mais suffisamment faible pour ne pas être perceptible (ex : les gels-liquides) [45].

I.3.1.5. Domaines d'application

a) Pectines dans la nutrition et l'industrie alimentaire

Les pectines forment un gel dans certaines conditions. Cette propriété leur donne un grand intérêt dans l'industrie alimentaire. Elles sont utilisées comme ingrédient dans la préparation des confitures, des marmelades et des gelées. Des études récentes ont montré qu'elles peuvent être utilisées comme stabilisateur d'émulsion et notamment pour les acides des produits laitiers [46].

b) Pectines dans la médecine et l'industrie pharmaceutique

Jusqu'en 2002, la pectine était l'un des ingrédients principaux utilisés dans des pastilles pour le mal de gorge comme adoucissant. Dans les produits cosmétiques, elle agit en tant que stabilisateur et est employée dans les préparations curatives de blessures et particulièrement et surtout dans les adhésifs médicaux, tels que les dispositifs de colostomie [46].

Comme prophylactique naturel, la pectine agie contre l'empoisonnement des cations toxiques. Elle s'est montrée efficace dans l'élimination du plomb et du mercure dans l'appareil gastro-intestinal et les organes respiratoires. Lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse, elle réduit le temps de coagulation du sang prélevé. De ce fait, elle est utile dans le contrôle de l'hémorragie ou de saignement local. Les combinaisons de celle-ci avec d'autres colloïdes ont été largement utilisées pour traiter la diarrhée, particulièrement chez les enfants en bas âge [47]. Cependant, elle a une action antimicrobienne in vitro à l'égard de quelques souches bactériennes [45]. Dans les formulations à libération contrôlée, les hydrogels de pectine se trouvent dans les comprimés comme liant.

I.3.2. Gomme Xanthane

I.3.2.1. Définition :

La gomme xanthane (GX) est un polysaccharide exo cellulaire hydrosoluble de masse moléculaire élevée. C'est un polysaccharide synthétisé par l'espèce bactérienne *Xanthomonas campestris*. Le xanthane est complètement soluble dans l'eau chaude ou froide, s'hydrate rapidement une fois disperser et facilite la rétention d'eau en produisant des solutions très visqueuses à faible concentration. De plus, ses solutions ont des viscosités uniformes dans un

intervalle de températures allant de la congélation à presque l'ébullition et une stabilité thermique excellente.

Cette gomme a une bonne stabilité dans des conditions acides ou alcalines, sa stabilité en présence de sels et sa résistance aux enzymes le converti en un des principaux polymères utilisés dans l'industrie alimentaire [48].

I.3.2.2. Structure

Le xanthane est un hétéropolysaccharide anionique (Figure I.6) constitué d'un squelette cellulosique linéaire de β -D-glucoses dont une unité sur deux est substituée en C3 par une chaine latérale trisaccharidique. Cette dernière comporte un α-D-mannose, un acide β-D-glucuronique et un β-D-mannose terminal [49,50].

Le xanthane comporte également des groupements acétate et pyruvate, situés respectivement sur le carbone 6 du mannose interne et sur les carbones 4 et 6 du mannose terminal. La proportion de ces groupements varie d'une gomme xanthane à une autre selon la nature de la souche bactérienne utilisée [51,52] et des conditions de fermentation [53, 54].

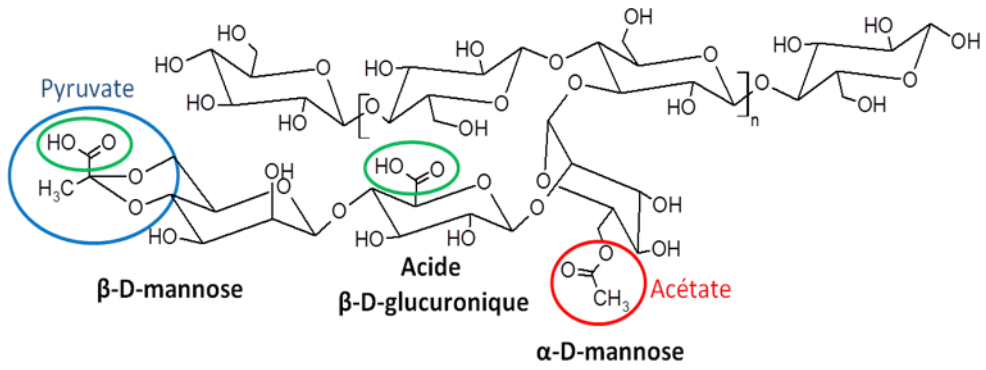


Figure I.6 : Structure chimique du xanthane.

I.3.2.3. Caractéristiques physicochimique et rhéologique de la GX

La rigidité moléculaire structurelle de cette gomme lui donne des propriétés inhabituelles telles que la stabilité à la chaleur, la tolérance aux milieux acides et basiques ainsi elle lui donne une viscosité stable ce qui lui confère une résistance à la dégradation enzymatique. Dans ce qui suit, on va aborder les propriétés les plus intéressantes de la GX.

a) Solubilité

Le xanthane n'est pas soluble dans les solvants organiques. Il se dissout complètement et facilement dans des solvants inorganiques notamment l'eau. Mais la solubilité de la GX diminue en présence d'éthanol.

b) Viscosité

Les solutions aqueuses de GX sont très visqueuses. Cette viscosité n'est pas affectée par la température ni par le point de congélation et point d'ébullition c'est pourquoi il est choisi par l'industrie agroalimentaire car les propriétés des produits finis dans lesquels ils sont utilisés restent inchangées, qu'ils soient en réfrigération, à la température ambiante ou même dans des zones chaudes.

c) Propriétés rhéologiques

Les solutions de xanthane ont une importance dans la stabilisation des suspensions et des émulsions. La propriété pseudo-plastique de la GX améliore les caractéristiques sensorielles du produit final (sensation en bouche, libération d'arôme). Ces solutions sont aussi très sensibles aux changements de pH, par exemple à un pH de 9 ou supérieur, le xanthane se desacétyle progressivement.

Toutes ces propriétés font de la gomme de xanthane un ingrédient très prisé dans l'industrie alimentaire, car elle offre de nombreux avantages [55].

I.3.2.4. Applications de la gomme Xanthane

Les applications de la gomme du xanthane dans l'industrie sont nombreuses et variées. En effet, grâce à sa nature et à ses propriétés, il est possible de l'utiliser comme agent texturant ou viscosifiant ou encore comme substituts de certains additifs, conservateurs ou gluten qui sont nocifs pour la santé pris en excès ou pour certaines personnes allergiques [56].

Le principal domaine d'application du xanthane est l'agroalimentaire [57,58]. Cette gomme est autorisée dans l'industrie alimentaire aux Etats-Unis depuis 1969 [58], en France depuis 1974 et en Europe depuis 1982 (additif E415) [59]. Il est présent notamment dans les assaisonnements de salade, les boissons, les plats cuisinés et surgelés en tant qu'épaississant,

agent stabilisant. Le xanthane est également employé dans l'industrie pétrolière (pour la récupération assistée du pétrole), les produits cosmétiques et pharmaceutiques, les revêtements de surface (peinture, vernis, impression sur papier ou textile) ou encore les explosifs [57, 58, 60].

I.3.3. Hydroxyapatite

L'hydroxyapatite, principal composant minéral du tissu osseux, est également un produit couramment obtenu par synthèse et utilisé comme biomatériau. Présentant une excellente biocompatibilité et étant bioactif, l'hydroxyapatite est utilisée pour substituer l'os soit comme matériau de comblement sous forme massive, soit comme revêtement de prothèses [61-67]. Une propriété remarquable de l'hydroxyapatite synthétique est sa bioactivité, en particulier la capacité, par exemple après l'implantation, pour former une liaison chimique avec les tissus durs environnants [68-71]. Cependant, la plupart des apatites synthétiques sont formées par des procédés à haute température (par exemple frittage), ce qui donne une structure bien cristallisée, qui a peu ou pas d'activité en biorésorption. Cela contraste avec les nanocristallines ou les apatites de biocristaux, qui sont généralement non stœchiométriques, et qui présentent généralement un degré de bioactivité beaucoup plus élevé.

I.3.3.1. Définition et structure

L'hydroxyapatite (HA) appartient à la famille des apatites qui ont une formule générale de type $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$, dans laquelle [72] :

Me : est un cation bivalent (Ca^{+2}, Pb^{+2}, Cd^{+2}...).

XO_4 : est un anion trivalent (PO_4^{-3}, VO_4^{-3}, AsO_4^{-3}, ...).

Y : est un anion monovalent (OH^-, Cl^-, F^-…).

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 de solutions aqueuses : les ions Ca^{2+} peuvent être substitués (totalement ou partiellement) par des

cations tels que les ions de métaux toxiques, et les ions PO_4^{3-} peuvent être remplacés par des anions tels que AsO_4^{3-}, CO_3^{2-}, ... etc. [73].

L'hydroxyapatite, de formule chimique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, est un phosphate de calcium dont l'anion monovalent est un (OH^-). En général, l'HA cristallise dans le système hexagonal P63/m, ses paramètres de la maille sont : a = b = 9.432 Å et c = 6.881 Å. Sa structure cristallographique consiste en un empilement de groupements phosphate qui forment deux types de tunnels parallèles à l'axe c. Le premier coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Ces tunnels sont occupés par des ions calcium notés Ca(I). Le second type de tunnel, dont l'axe coïncide avec l'axe sénaire hélicoïdal du réseau, est bordé par des atomes d'oxygène et les autres ions calcium, notés Ca(II), et est occupé par les ions OH [74,75]. Plus rarement observée par synthèse thermique, l'HA peut avoir une structure monoclinique P21/b, dont les paramètres de la maille sont : a = 9.4214 Å, b = 2a, c = 6.8814 Å, β= 120° [76]. La figure I.6 représente une maille élémentaire de l'HA.

L'HA stœchiométrique est caractérisé par le rapport molaire (Ca/P= 1.67), dont le Ca représente 40.3% et le P 18.4% (en masse) [77]. Des études théoriques récentes ont montré que les deux structures (monoclinique et hexagonale) sont énergétiquement acceptées pour HA [78].

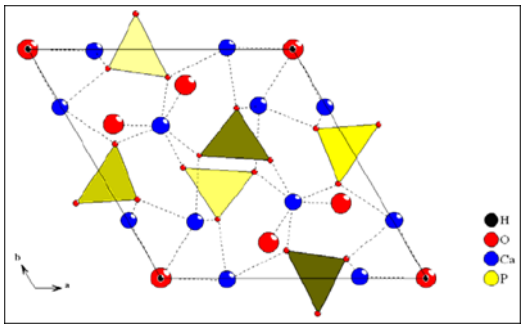


Figure I.7 : Maille élémentaire de l'HA (Ca_{10} $(PO_4)_6(OH)_2$) suivant l'axe c [79].

I.3.3.2. Propriétés de l'hydroxyapatite :

L'hydroxyapatite est très largement utilisée dans beaucoup domaines suite à ses propriétés fondamentales et spécifiques qui jouent un rôle important pour diverses applications. Parmi ces propriétés, on trouve :

a) Propriétés physico-chimiques

Cette partie est dédiée aux propriétés remarquables que développe l'hydroxyapatite au contact d'une solution aqueuse. La solubilité et les groupements fonctionnels de surface de l'hydroxyapatite sont notamment les principaux facteurs de la rétention des ions métalliques.

- **Solubilité de l'hydroxyapatite**

La solubilité de l'hydroxyapatite se généralise sous la forme :

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \quad \leftrightarrow \quad 10\ Ca^{2+} + 6\ PO_4^{3-} + 2\ OH^- \qquad (1)$$

Cet équilibre est régi par une constante de dissolution-précipitation, appelée produit de solubilité, défini comme suit [80] :

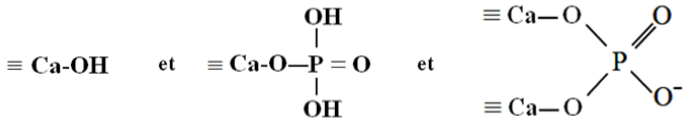
$$Ks\ (Ca_{10}\ (PO_4)_6(OH)_2) = 6{,}62\ 10^{-126}$$

La solubilité est contrôlée par l'équilibre thermodynamique de dissolution- précipitation mais également par les équilibres acides/basiques des ions phosphates et calcium, et par le processus interfacial d'adsorption-désorption. En effet, l'hydroxyapatite placée au contact d'une solution aqueuse est capable de libérer ou de fixer des quantités non négligeables d'ions calcium et phosphates avant d'atteindre l'équilibre de dissolution- précipitation [81,82-84]. Il a été montré que ces ions contrôlent en partie l'équilibre de dissolution, et sont à l'origine des dissolutions incongruentes observées par certains auteurs [85-87]. La solubilité de l'HA 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 de carbonates dans l'HA augmente sa solubilité tandis que la présence de fluorures la diminue [88].

- **Origine de la charge de la surface de l'hydroxyapatite**

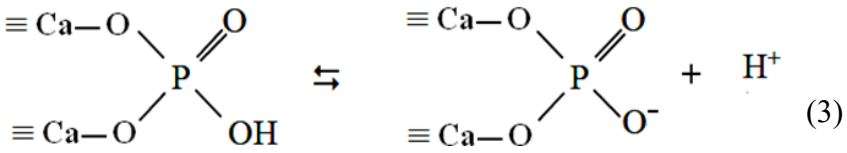
Les apatites possèdent incontestablement une charge de surface puisque cette dernière a été mise en évidence par exemple par des mesures de potentiel zéta. Cependant, quelle est l'origine de cette charge de surface ? En se basant sur des considérations d'ordre cristallographique, de

la solubilité de l'hydroxyapatite [89,90] et d'évaluations de la concentration en sites de surface à l'aide de traceurs radioactifs ^{45}Ca et ^{32}P, plusieurs auteurs [91,92] ont supposé l'existence des sites suivants :



Ces groupements sont susceptibles d'adsorber ou de libérer les ions H^+ selon les réactions suivantes :

(2) $\equiv \mathbf{Ca\text{-}OH} + H^+ \leftrightarrows \equiv \mathbf{Ca\text{-}OH_2^+}$



(3)

Les groupements $\equiv PO^-$ et $\equiv CaOH^{2+}$ sont les sites prédominants pour une valeur de pH proche du pH_{ZPC} (charge nulle de la surface). Les sites ≡POH et ≡CaOH deviennent quant à eux significatifs, respectivement pour une valeur de pH inférieure et supérieure au pH_{ZPC}. La figure I.7 représente la nature des complexes de surface d'une apatite en fonction du pH.

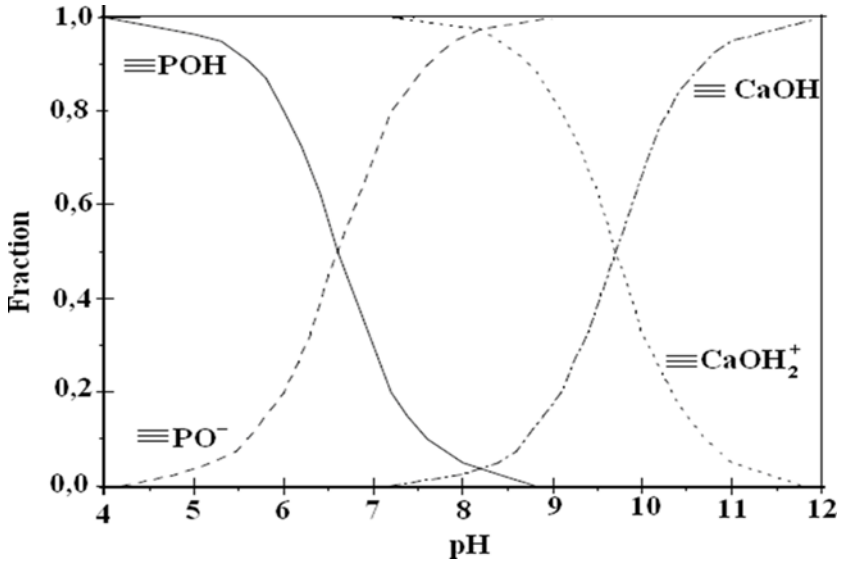


Figure I.8 : Evolution de la nature des complexes de surface d'une apatite en fonction du pH [93].

Wu et col al. [94] ont montré que les groupements phosphates peuvent être liés à un seul atome de calcium de surface pour assurer l'électroneutralité de l'interface. Les équilibres de protonation et de déprotonation des groupements de surface ont été définis comme suit :

$$\equiv Ca - OH_2^+ \overset{H^+}{\leftrightarrows} \equiv Ca - OH \overset{H^+}{\leftrightarrows} \equiv Ca - O^-$$

$$\equiv Ca - O - \underset{\displaystyle OH}{\overset{\displaystyle OH}{P}} = O \quad \overset{H^+}{\leftrightarrows} \quad \equiv Ca - O - \underset{\displaystyle OH}{\overset{\displaystyle O^-}{P}} = O \quad \overset{H^+}{\leftrightarrows} \quad \equiv Ca - O - \underset{\displaystyle O^-}{\overset{\displaystyle O^-}{P}} = O$$

- **Stabilité thermique**

Par définition, une céramique subit un traitement thermique de frittage au cours duquel sa stabilité doit être assurée. Outre la température de frittage ; une poudre d'HA stœchiométrique perde ses groupements hydroxyles par déshydratation sous air à partir de

900°C (850°C sous vide) formant une oxy-hydroxyapatite (Eq. I.1). Une fois transformée en oxyapatite, elle se décompose à haute température (>1350°C sous air) en TCP et TTCP.

$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-2z}O_z(OH)_z + z\ H_2O$ ….Eq(5)

$C(PO)_6O \rightarrow 2\ Ca_3(PO_4)_2 + Ca_4O(PO_4)_2$ ……. Eq (6)

Au-delà de 1000°C, HA et β-TCP sont les deux seuls orthophosphates stables. À haute température l'HA se décompose au phosphate tricalcique (β-TCP : $Ca_3(PO_4)_2$) et phosphate tétracalcique (α-TCP : $Ca_4(PO_4)_2O$) [95].

- La composition chimique, la cristallinité et la morphologie de l'hydroxyapatite dépend fortement du processus de synthèse [96].

b) **Propriétés biologiques**

L'HA possède de très bonnes propriétés de biocompatibilité et notamment des propriétés d'adsorption spécifique des cellules ou des protéines [97,98]. Ci-après, sont énumérées les principales propriétés biologiques de l'HA.

- **Biocompatibilité**

C'est la capacité du matériau à être toléré par les tissus environnants. D'autre façon la biocompatibilité est définie par « la capacité d'un biomatériau à être utilisé avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique ».

- **Bioactivité**

C'est la capacité à promouvoir des échanges chimiques avec les tissus vivants ; et à terme, être substitué par un os néoformé.

- **Ostéoconduction**

C'est la capacité à recevoir la repousse osseuse par invasion vasculaire et cellulaire [99,100].

I.3.3.3. Applications de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est un matériau inorganique très important en biologie et en chimie [101], elle est utilisée en tant que biomatériau. Elle joue un rôle important dans beaucoup domaines à cause de ses propriétés de bioactivité et de biocompatibilité [102-107].

L'hydroxyapatite, du fait de sa composition chimique très proche des phases minérales osseuses, est utilisée dans la chirurgie des tissus durs, grâce à sa nature bioactive. Sous forme dense et agglomérée, l'hydroxyapatite est employée pour la réparation des défauts d'os dans les sites dentaires et orthopédiques, le remplacement immédiat de dent, le couvrement de pulpe et la reconstruction faciale etc. [108]. En effet, elle est très utilisée pour l'élaboration de substituts osseux ou dentaires, sous formes de céramiques, de revêtements, de ciments ou de composites. Donc, elle est très utilisée depuis de nombreuses années en chirurgie humaine comme matériaux de substitution osseuse [109].

L'HA peut être utilisée sous diverses formes : poreuse, dense, granule, sous forme d'un revêtement des implants métalliques et aussi comme matière composée des matrices des polymères biocompatibles [110].

Outre le domaine biomédical, l'HA a plusieurs autres applications :

- Support catalytique en synthèse organique [111-112] dans le domaine de la catalyse hétérogène.
- Matériau de remblayage entrant dans la composition des barrières construites pour le confinement des déchets radioactifs [113].
- Additif potentiel pour le traitement des sels pollués
- Phase stationnaire dans les colonnes chromatographiques pour la séparation de diverses molécules telles que la vitamine D3 et ses composés dérivés [114].

Chapitre II :
Partie expérimentale

II.1. Introduction

Cette étude, réalisée au niveau du laboratoire de chimie de la faculté des sciences de l'université de Médéa, vise l'élaboration et la caractérisation d'un biomatériau sous forme des membranes à base d'un biopolymère pour biomédical. Pour ce faire, nous avons divisé notre travail en trois parties :

- La première partie est consacrée à la caractérisation physicochimique de deux biopolymères (pectine, xanthane) et de l'hydroxyapatite.
- La deuxième partie concerne l'élaboration des membranes composites à base des deux biopolymères et de l'hydroxyapatite et leur caractérisation physicochimique.
- La dernière partie est relative à l'usage des membranes composites dans le domaine biomédical : test de bioactivité in-vitro.

II.2. Matériels et produits utilisés

II.2.1. Matériels

L'ensemble du matériel utilisé pour la réalisation de cette étude est résumé dans le tableau II.1

Tableau II.1. Appareillage utilisé

Appareillage	Marque
Balance analytique	ALS 220-4N
Agitateur magnétique	AGIMATIC-N
Etuve	Memmert
Spectrophotomètre Infrarouge	FTIR-8400S
Spectrophotomètre UV-visible	UVmini-1240 SMIHADZU
pH-mètre	Methrom 827 pH Lab
Four de calcination	Nabertherm

II.2.2 produits

Les produits utilisés au cours de cette étude sont résumés dans le tableau II.2

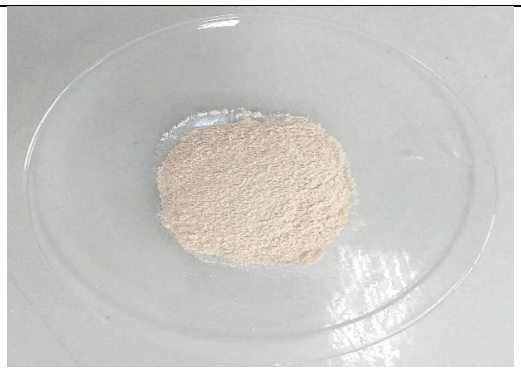
Tableau II.2 : Produits utilisés

Le nom chimique	La formule	La masse molaire
Acide chlorhydrique	HCl	36,458 g /mol
Acide phosphorique	H_3PO_4	97,994 g/mol
Acide sulfurique	H_2SO_4	98,079g/mol
Acide ascorbique	$C_6H_8O_6$	176,12 g/mol
Molybdate d'ammonium	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1 163,9 g/mol
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292,2438 g/mol
Hydroxyde de calcium	$Ca(OH)_2$	74,093 g/mol
Hydroxyde de sodium	NaOH	39,997g/mol
Chlorure de sodium	NaCl	58,44 g/mol
Chlorure de potassium	KCl	74,5513 g/mol
Chlorure de magnésium hexahydraté	$MgCl_2.6H_2O$	203,31 g/mol
Phosphate de sodium dihydraté	$Na_2HPO_4.2H_2O$	141,96 g/mol
Sulfate de sodium	Na_2SO_4	142,04 g/mol
Bicarbonate de sodium	$NaHCO_3$	84,007 g/mol

II.3. Caractérisation physicochimique des biopolymères

II.3.1. Aspect générale

La figure II.1, montre l'aspect macroscopique et une brève description des deux biopolymères utilisés.

	
La pectine est une poudre fine sans odeur caractéristique et de couleur marron.	La gomme Xanthane est une poudre très fine sans odeur et de couleur beige clair.

II.3.2. Caractérisation par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

A. Principe de la spectroscopie IRTF

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (en anglais FTIR Spectroscopy : Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau à analyser. Elle permet la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques et l'identification des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectroscope à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption. **La Figure II.1** décrit le schéma d'un spectroscope à transformée de Fourier [115]

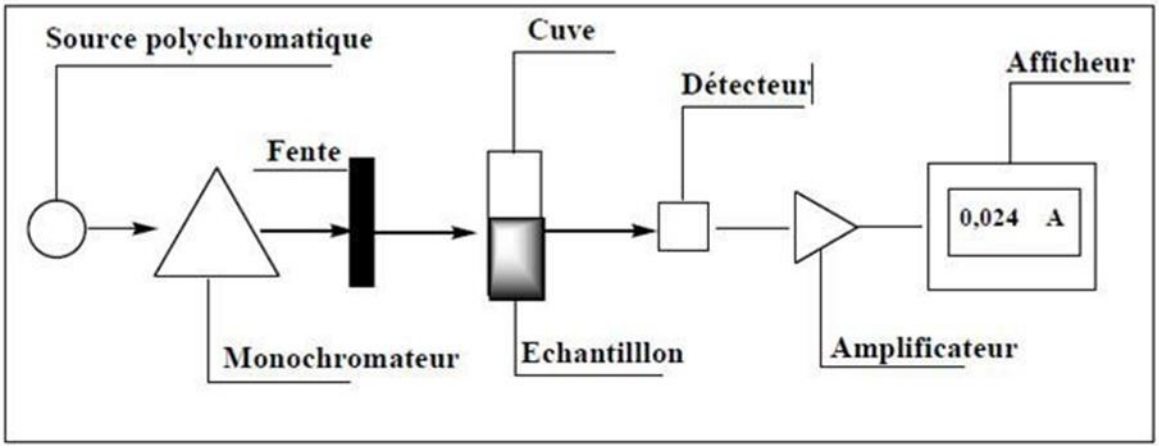


Figure II.1. Schéma du principe du spectromètre à transformée de Fourier.

Le faisceau infrarouge provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre, le faisceau lumineux arrive sur la Séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique. Par conséquent, à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau [116].

B. Protocole expérimentale

Le spectrophotomètre IRTF utilisé pour caractériser les deux biopolymères étudiés est de type FTIR-8400S (Laboratoire d'analyse physicochimique). L'échantillon à analyser sous forme de poudre, a été mélangé avec du KBr et comprimé pour former une pastille translucide. La pastille a été mise dans la trajectoire du faisceaux lumineux. Les spectres IR des deux biopolymères ont été enregistrés dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 4000 et 400 cm^{-1}.

C. Résultats et discussion

Les spectres infrarouges de la gomme de Xanthane et de la pectine sont présentés respectivement sur **les Figures II.2** et **II.3**.

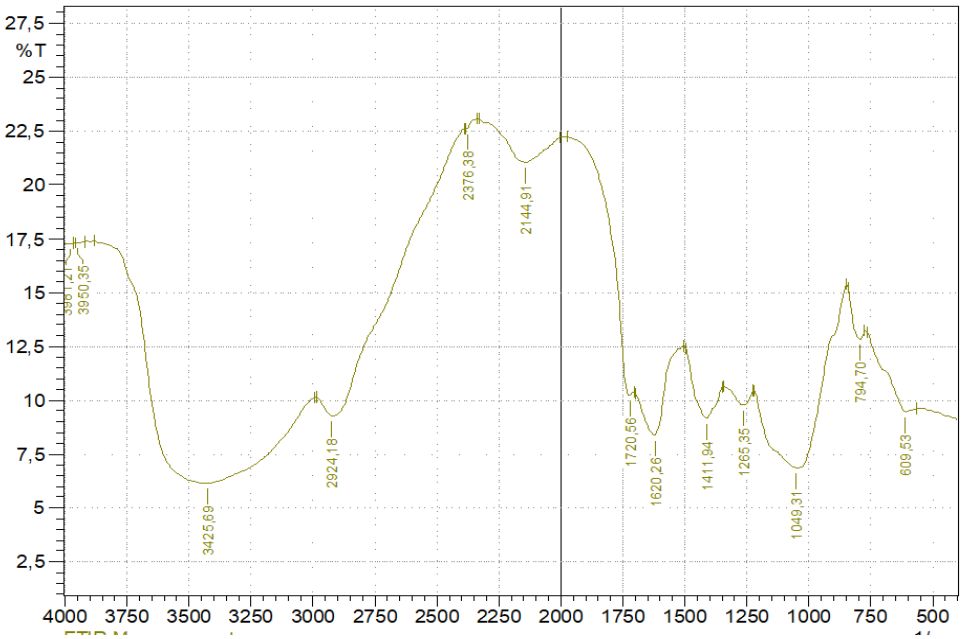


Figure II.2 : Spectre IRTF de la gomme de Xanthane.

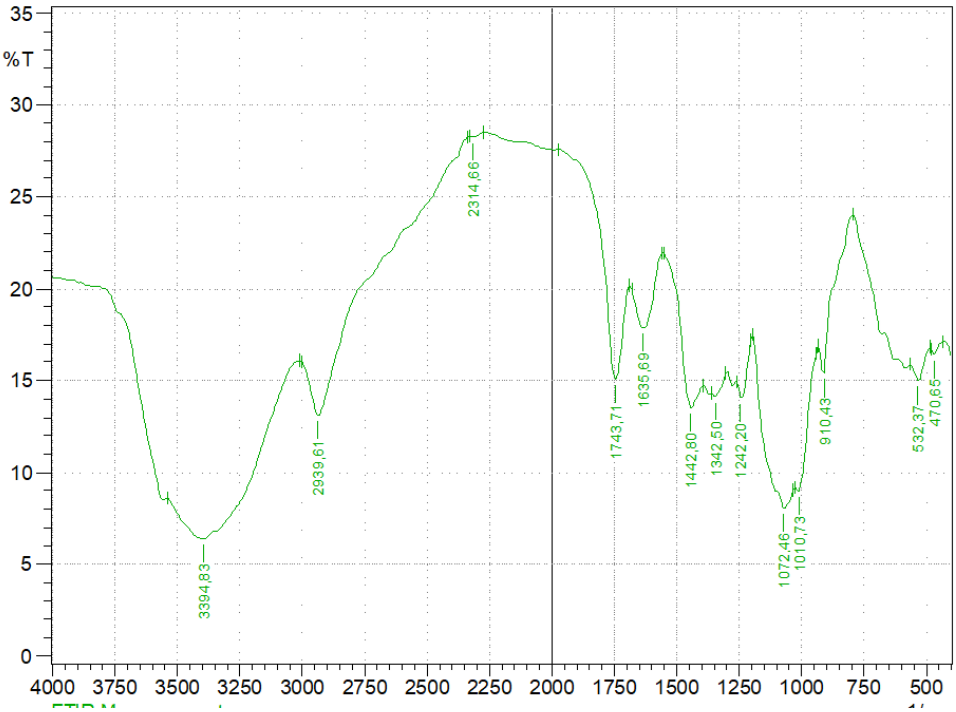


Figure II.3 : spectre IRTF de pectine.

Les spectres IRTF obtenu montre des bandes d'absorption caractéristiques des groupements fonctionnels présents dans la gomme Xanthane et dans la pectine. Les principaux pics caractéristiques sont récapitulés dans le Tableau II.3.

Tableau II.3 : Interprétation des spectres IRTF des biopolymères étudiés

Nombre d'onde		**Attribution**
Xanthane	**Pectine**	
3425.69	3394.83	Liaisons O-H groupements hydroxyles
2924.18	2939.61	Liaison C-H dans les groupements CH_2 ou CH_3.
1720.56	1743.71	Liaisons C=O des groupements carbonyles esters ($COOCH_3$) et des groupements carboxyliques (COOH).
1620.26	1635.69	Liaison C=O des ions carboxyles COO^- (carboxylate)
1411.94 1265.35	1442.80 1342.50 1242.20	Liaison C=O des groupements COO^- Liaisons C-OH alcooliques
1049.31	1072.46 1010.73	Liaison C-OH des alcools primaires et secondaires Liaison C-O-C du cycle.

II.3.3. Détermination du degré d'estérification de la pectine

A. Protocole expérimentale

En s'inspirant des travaux antérieurs [95], la détermination du degré d'estérification de la pectine a été faite par la méthode titrimétrique. Un échantillon de pectine (0.2 g) est mis dans un erlenmeyer (250 ml), 1ml de l'éthanol et 20 ml d'eau distillé sont ajoutés successivement. Le mélange est maintenu sous agitation à 40 °C jusqu'à la dissolution complète (2h). La solution obtenue est titrée par NaOH (0.1M) en présence de phénophtaléine. Le volume de NaOH ajouté est enregistré comme le titre initiale. A la solution présidant, 10 ml de NaOH ont été ajoutés, et le mélange est agité

pendant 2 heures à la température ambiante, puis 10 ml d'HCl (0.1M) ont été ajouté puis agité jusqu'à la disparition de la couleur rose. La solution ainsi obtenue est titrée avec NaOH (0.1M) jusqu'au changement de la couleur (apparition de la couleur rose). Ce volume de titrage est enregistré comme le titre final. Le degré d'estérification, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante [95] :

$$\text{DE (\%)} = \frac{titre\ finale}{titre\ initial + titre\ final} \times 100$$

B. Résultats et discussion

Le degré d'estérification de la pectine obtenue est de 83%. Cette valeur est supérieure à 50% ce qui indique que la pectine utilisée est hautement méthylée. Il est à noter que le DE est un paramètre important qui affecte fortement la solubilité de la pectine et sa tendance à former un gel.

II.3.4. Evaluation de la teneur en humidité

Le taux d'humidité est défini comme étant la masse d'eau contenue dans la matière à étudier par rapport à la masse totale de l'échantillon. Il nous renseigne sur la conservation de la matière, plus il est petit plus la matière est stable et peut être conservée facilement. Si le taux d'humidité est < 10%, la matière est considérée comme stable.

A. Protocole expérimentale

Le Principe d'évaluation de la teneur en humidité est basé sur le séchage d'une masse connue d'échantillon de biopolymère à 105°C jusqu'au poids constant. Dans cette expérience, 1 g de chaque biopolymère est placé dans une étuve à 105°C. Après 24 h, chaque échantillon est refroidi et pesé de nouveau pour calculer sa teneur en humidité. L'humidité exprimée en pourcentage est égale à :

$$\mathbf{H\ (\%)} = \frac{masse\ initiale - masse\ finale}{masse\ initiale} \times 100$$

B. Résultats et discussion

Les résultats de la détermination des taux d'humidité des deux biopolymères étudiés sont regroupés dans le tableau II.4.

Tableau II.4. Taux d'humidité des biopolymères

	Pectine	**GX**
H (%)	12.90	12.60

L'analyse des résultats montre que les deux biopolymères (pectine et xanthane) sont hygroscopiques avec des taux d'humidité supérieur à 10% : 12.90% pour la pectine et 12.60% pour le Xanthane. La teneur en humidité est affectée par le mode de stockage. Donc, il est intéressant de stocker ces biopolymères dans des flacons hermétiquement fermés et dans des endroits secs.

II.4. Synthèse de L'Hydroxyapatite

L'objectif principal de cette étude est d'élaborer un biomatériau composite pour la régénération osseuse. De ce fait, nous avons besoin d'une charge minérale sous forme d'hydroxyapatite, composant majoritaire de l'os. Dans ce qui suit, nous allons aborder la synthèse de l'hydroxyapatite par voie de précipitation.

A. Protocole expérimentale

L'Hydroxyapatite a été synthétisé par voie de précipitation. Pour ce faire, 42.52 ml d'une solution de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4 ; 0.3528 M) ont été ajoutés, à un débit de 1ml/min, à un volume de 50 ml d'hydroxyde de calcium ($Ca(OH)_2$; 0.5M) sous agitation vigoureuse. Le pH a été maintenu supérieur à 10.5 par ajout d'une quantité suffisante de KOH. La suspension obtenue (Figure II.4) est laissée maturer et décanter pendant 24 heures. Enfin, le précipité a été séparé du surnagent puis a été séché dans une étuve à 87°C pendant 24 heures.

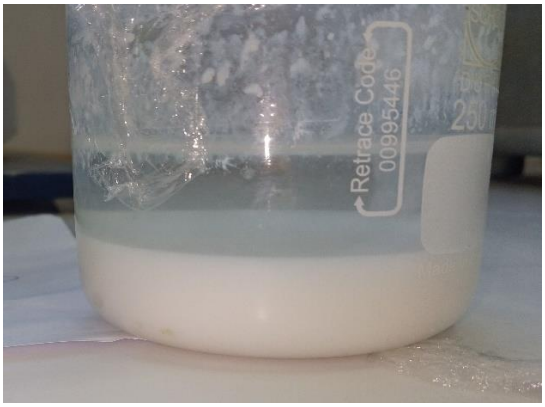


Figure II.4 : Suspension de L'hydroxyapatite synthétisé

Le produit obtenu a été broyer pour l'obtention d'une poudre fine et a été analysé par le spectrophotomètre IRTF.

B) Résultat et discussion

La figure II.5 montre le produit obtenu après séchage (a) et broyage (b). Le résultat final est une poudre fine de couleur blanc sale.

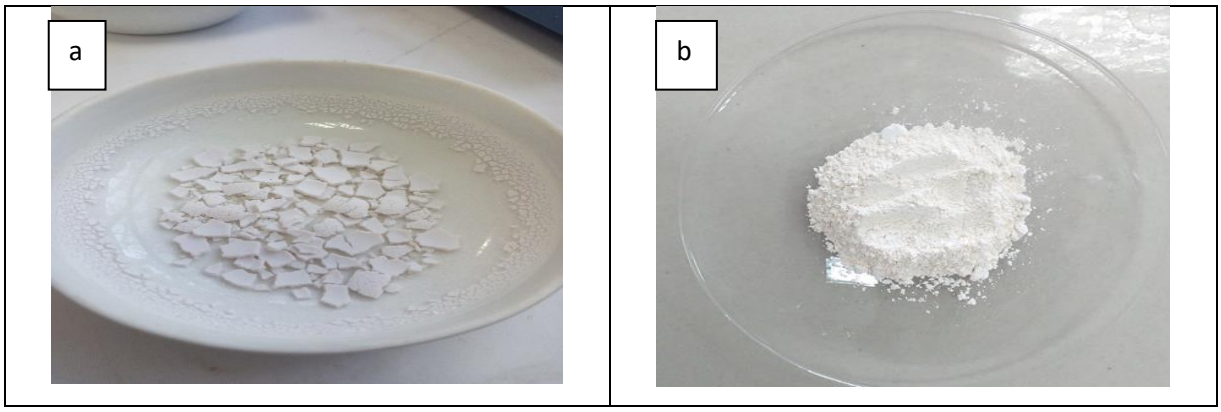


Figure II.5 : Hydroxyapatite synthétique : après séchage (a) et après broyage (b).

L'analyse par IRTF, de l'hydroxyapatite synthétisé (HAs), a donné le spectre de la figure II.6. Les principales bandes de ce spectre sont récapitulées dans le tableau II.5.

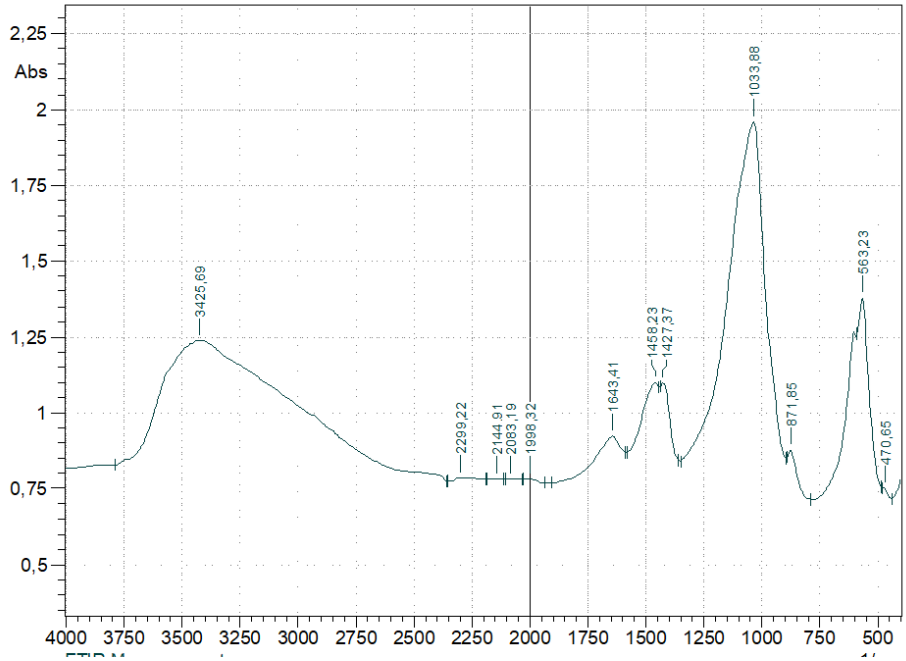


Figure II.6 : Spectre IRTF de l'HAs

Tableau II.5 : Interprétation du spectre IRTF de l'HAs.

Nombres d'ondes	Attribution
3425.69	Bande caractéristique des liaisons OH
1427.37 1458.23	Bande caractéristique des liaisons C=O des groupements CO_3^{2-}
1033.88	PO_3^{2-} élongation antisymétrique
563.2	PO_3^{2-} déformation antisymétrique

II.5. Hydroxyapatite récupéré à partir de l'os

Dans cette partie, nous nous intéressés à l'utilisation des os de poulets comme source naturelle de l'hydroxyapatite. L'obtention de l'HA dans ce cas demande beaucoup d'énergie (traitement à haute température), mais elle permet en revanche d'obtenir assez facilement de

l'HA. Le principe de cette méthode repose sur la calcination, généralement entre 900°C et 1100°C.

A. Protocole expérimentale

La récupération de l'HA à partir des os de poulets a été faite en deux étapes.

Première étape : Les os ont été nettoyés des impuretés adhérentes et macroscopiques et des substances comprenant les ligaments et les tissus collés sur les os. Ils ont été dégraissés et nettoyés à ébullition puis séchés à température ambiante. Les os sont ensuite carbonisés et enfin broyés pour réduire leur taille et obtenir une poudre. La carbonisation sur feu permet de réduire la fumée dans le four durant la calcination.

Deuxième étape : La calcination de la poudre de l'os a été réalisée à haute température (400°C, 800°C, puis 1000°C successivement) pendant 30 min en utilisant un four de calcination de marque Nabertherm (30-3000°C) avec une vitesse de chauffage de 10 °C/min. La poudre a été analysé par le spectrophotomètre FTIR après chaque traitement.

B. Résultat et discussion

La poudre obtenue après la première étape est une poudre fine et noir (Figure II.7). Après calcination, la couleur de la poudre est devenue blanche (Figue II.8).



Figure II.7 : Poudre de l'os carbonisé.



Figure II.8 : La poudre obtenu après calcination à 1000°C

Les spectres infrarouges sont présentés respectivement sur **les figures II.9, II.10, II.11** et **II.12**.

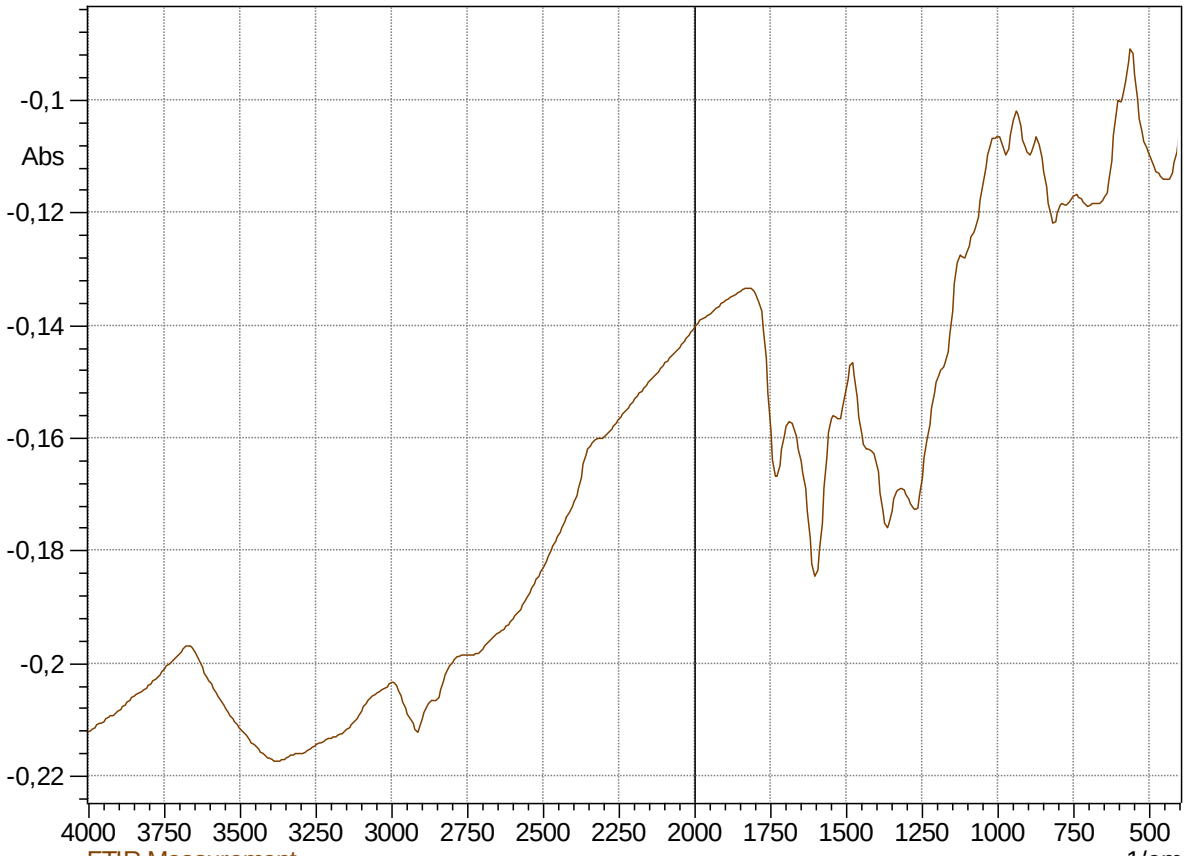


Figure II.9 : Spectre IRTF de l'os avant traitement

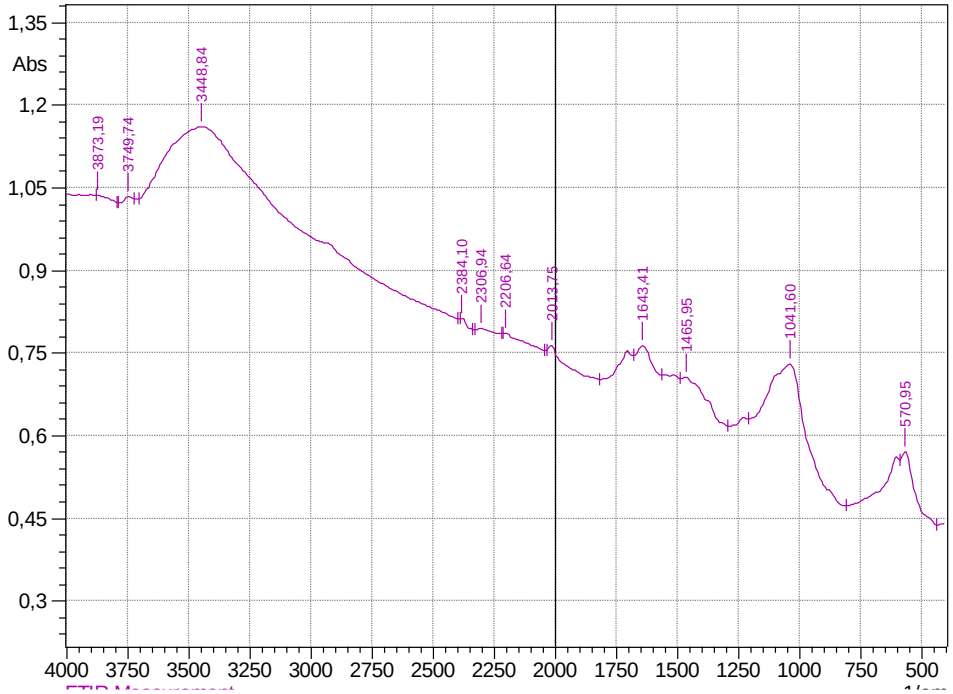


Figure II.10 : Le spectre IRTF de l'os après calcination à 400°C.

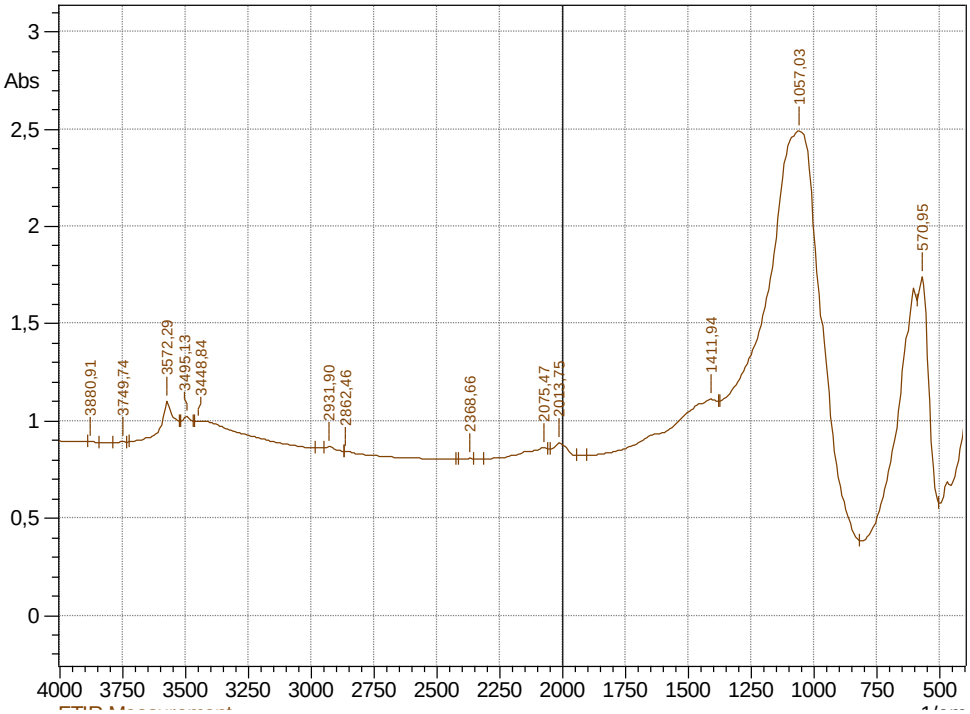


Figure II.11 : Le spectre IRTF de l'os après calcination à 800°C.

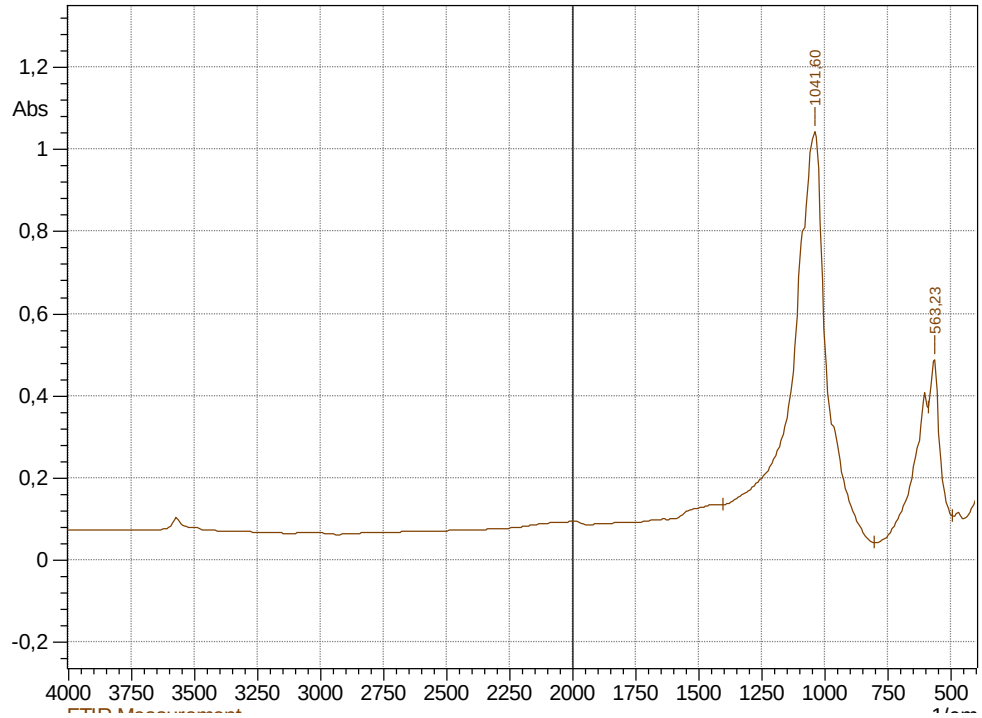


Figure II.12 : Le spectre IRTF de l'os après calcination à 1000°C

Les principales bandes des spectres infrarouges de calcination sont représentées dans le tableaux II.6.

Tableau II.6 : Différentes bandes des spectres de l'os naturel et après calcination à 400°C, 800°C et 1000°C.

Nombres d'ondes				**Attribution**
Os naturel	**400°C**	**800°C**	**1000°C**	
3650	3448.84	3572.84 3448.84	3550	Liaison OH
2350	2384.10	-	-	Liaison C-H des groupement CH_2-CH_3
1650	1643.41	-	-	Liaison C=O des groupement carboxyle
1475	1465.95	-	-	Liaison C-O
1000	1041.60	1057.03	1041.60	PO_3^{2-} élongation antisymétrique
550	570.95	570.95	563.23	PO_3^{2-} déformation antisymétrique

II.6. Préparation des membranes

II.6.1. Préparation des membranes des biopolymères seuls

A. préparation des membranes de pectine et xanthane seuls

En s'inspirant des travaux antérieurs [117], les membranes de xanthane et celles de pectine ont été préparées par la méthode de gélification. Des volumes de 20 ml de chacune des solutions de pectine à (2%,3% et 3.5%) et de Xanthane à 1% ont été coulé séparément dans des boites Pétri, puis séchés dans l'étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'un film continu. Après le séchage, une solution de $CaCl_2$ (1M) a été ajoutée le long de la surface de la membrane et laissée agir 1h. Enfin, les membranes obtenues sont lavées à l'eau distillée plusieurs fois, démoulées puis séchées à 40°C. Les membranes de xanthane sont notées M-GX et celles de pectine M-P.

B. Résultat et discussion

Les membranes de Xanthane (1%) et de pectine (3% et 3.5%) obtenues sont sous formes de films continus très fins et transparents (Figure II.12). Cependant, dans le cas de la membrane de pectine à 2%, nous avons remarqué sa dégradation (déchirure) dès l'ajout de la solution de $CaCl_2$ dans la boite. De ce faite, cette membrane n'est pas utilisée pour la suite du travail.

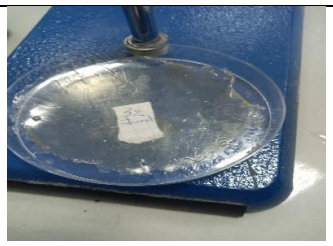
<table>
<tr><td colspan="3">
M-GX 1%.</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>M-P 2%</td><td>M-P 3%</td><td>M-P 3.5%</td></tr>
</table>

Figure II.13 : Membranes de Pectine et de GX élaborées.

L'analyse par FTIR a été effectuée sur la membrane de GX et sur celle de pectine à 3%. Les spectres obtenus sont représentés dans les figures II.13 et II.14 et leur interprétation est donnée dans le tableau II.7.

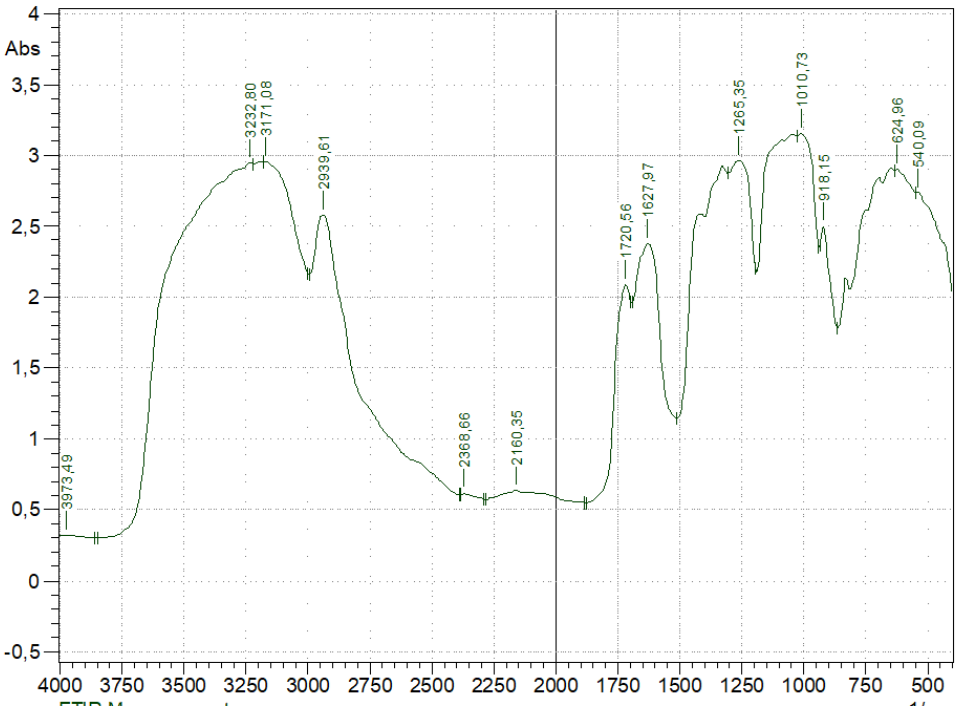


Figure II.14 : Spectre IRTF de M-P 3%

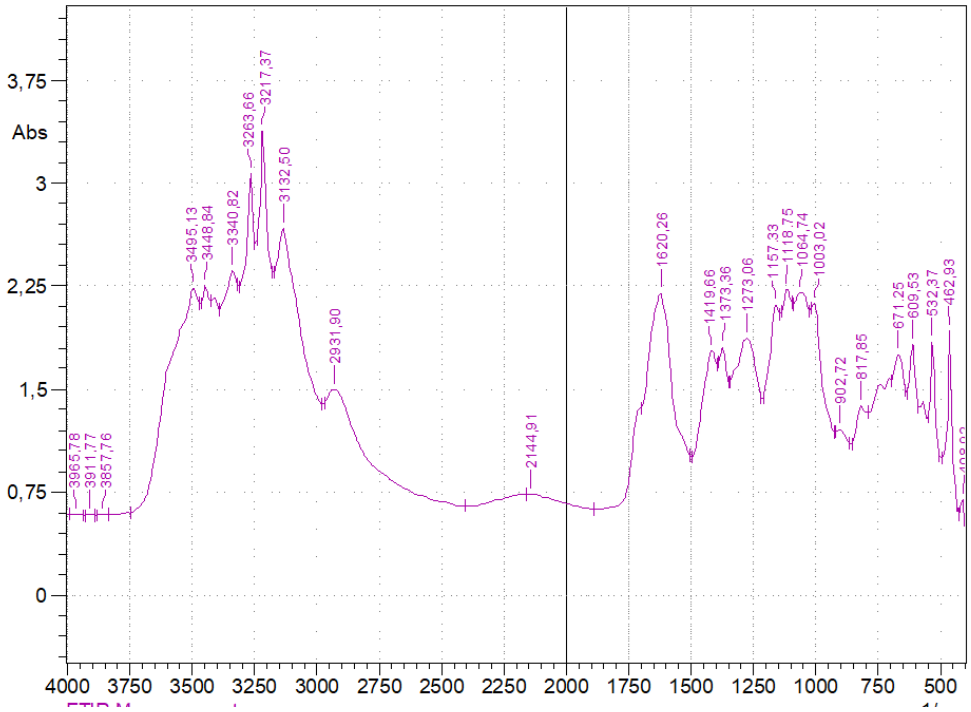


Figure II.15 : Spectre IRTF de M-GX 1%.

Tableau II.7: Différentes bandes des spectres IRTF de M-P 3% et M-GX 1%

Nombres d'ondes		Attribution
M-P 3%	**M-GX 1%**	
3232	3495	Liaison O-H alcoolique Liaison O-H acide
2939	2931	Liaison C-H du groupement CH_2-CH_3
1720	-	Liaison C=O
1627	1620	Liaison C=O du groupement carboxyle (COOH)
-	1373	Liaison C=O
1265	1273	Liaison C-OH
-	1064	Liaison C-OH alcoolique
1010	1003	Liaison C-O-C du cycle

II.6.2. Préparation des membranes chargé par L'HA

A. Protocol expérimental

La préparation des membranes composites (chargées d'HA) a été également effectuée par la méthode de gélification. Tout d'abord, une quantité suffisante de l'HA (Tableau II.8) est dispersée dans 20 ml d'eau distillée, puis la quantité de pectine ou de xanthane (Tableau II.8) est ajoutée pour obtenir des solutions en 3% et 3.5% en pectine et en 1% en xanthane. Les solutions obtenues sont coulées dans des boites Pétri puis séché dans l'étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'un film continu. Après le séchage, une solution de $CaCl_2$ (1M) est ajoutée le long de la surface de la membrane et laissée agir 1h. Enfin, les membranes obtenues sont lavées à l'eau distillée plusieurs fois, démoulées puis séchées à 40°C.

Nous avons utilisé les deux types d'HA préparés par nos soins : l'HA synthétique noté HAs et l'HA préparé à partir de l'os calciné à 1000 °C noté HAn.

Tableau II.8 : Pourcentage des biopolymères et de l'HA utilisés pour la préparation des membranes chargées

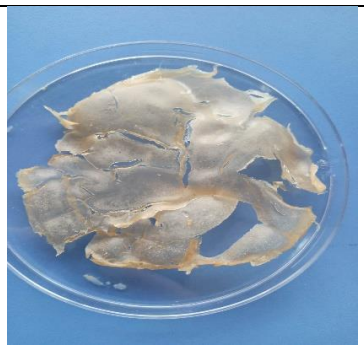
Xanthène ou pectine (%)	HAs ou Han (%)
30	70
50	50
70	30

B. Résultat et discussion

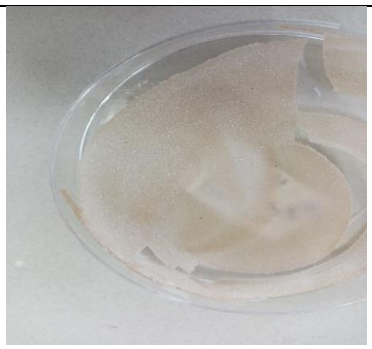
Les figures II.15 et II.16 montrent les membranes chargées (composites) obtenues.



M-P 3% /HAs : 30/70



M-P3%/HAs : 50/50



M-P3% /HAs : 70/30

Figure II.16 : Membranes chargées Pectine/HAs (M-P/HAs).

L'observation macroscopique à l'œil nu des membranes chargées M-P3%/HAs (Figure II.15) montre que le rapport P/HAs: 70/30 a donné un film continu, épais et opaque. Par contre le rapport P/HAs: 50/50 a donné un film non continu présentant des déchirures et difficile à manipuler. Enfin, pour le rapport P/HAs: 30/70 nous avons remarqué la dégradation du film avant l'ajout de la solution de $CaCl_2$. Suite à ces résultats, les membranes chargées à base de pectine ne peuvent pas être utilisées pour la suite de cette étude.

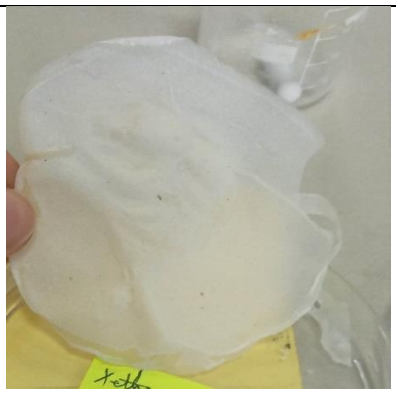
		
M-GX/HAs : 30/70	M-GX/HAs : 50/50	M-GX/HAs : 70/30
		
M-GX/HAn : 30/70	M-GX/HAn : 50/50	M-GX/HAn : 70/30

Figure II.17 : Membranes chargées Xanthane/HA (M-GX/HAs et M-GX/HAn).

En comparant l'aspect des membranes M-GX/HA par rapport à celui de M-GX, on remarque que les membranes chargées par l'HAs ou l'HAn sont plus épaisses et opaques. L'épaissement et la cohésion augmente avec l'augmentation de la teneur en HA. D'après ces résultats, les membranes M-GX/HA sont retenue pour la suite de travail.

II.6.3. Caractérisation des membranes chargés (M-GX/HA)

II.6.3.1. Analyse par FTIR

Les membranes obtenues ont été analysées par spectroscopie infrarouge à transformer de fourrier (IRTF). Les différents spectres infrarouges obtenus sont présentés dans les figures II.17, II.18 et II.19.

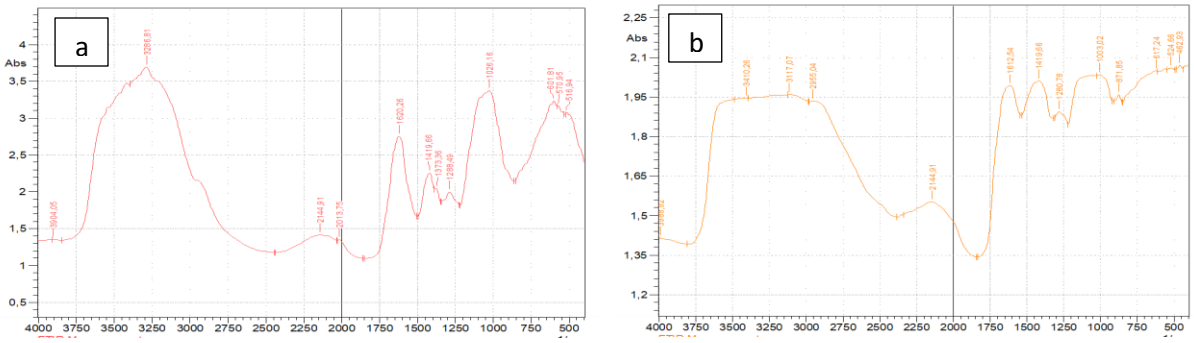


Figure II.18 : Spectre IRTF de : (a) M-GX/HAn : 30/70 et (b) M-GX/HAs : 30/70.

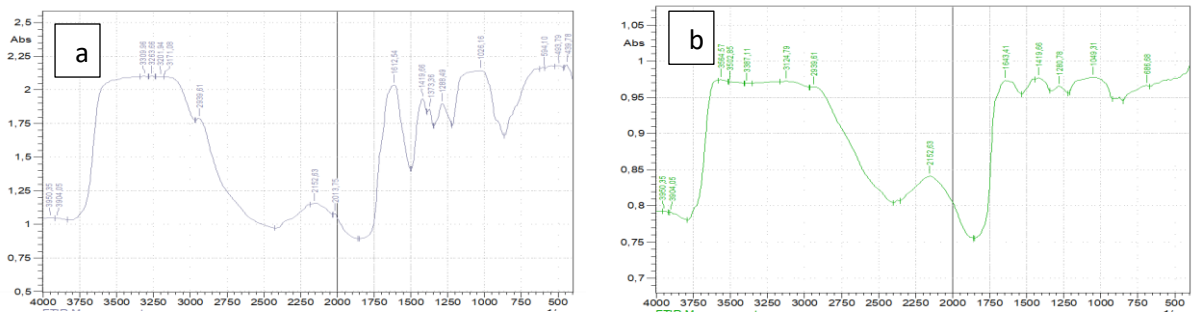


Figure II.19 : Spectre IRTF de : (a) M-GX/HAn : 50/50 et (b) M-GX/HAs : 50/50.

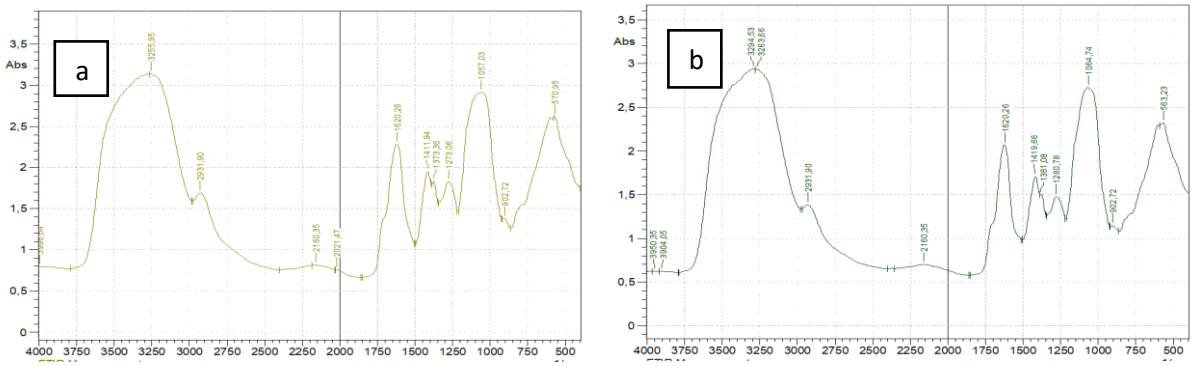


Figure II.20 : Spectre IRTF de : (a) M-GX/HAn : 70/30 et (b) M-GX/HAs : 70/30.

L'analyse de ces spectres nous a permis de conclure que toutes les membranes chargées rassemblent tous les pics ou bandes caractéristiques de la gomme xanthane et ceux de l'hydroxyapatite. Il est à noter que la bande entre 3600 et 3000 cm^{-1} devient de plus en plus large avec l'augmentation de la teneur en HA suite à la présence des liaisons O-H dans la gomme xanthane et dans l'HA. De plus la largeur des bandes autour de 1400 cm^{-1} et l'épaulement autour de 800 cm^{-1} dans les spectres de M-GX/HAs sont dues à la présence des carbonates. Le tableau

II.9 regroupe les principales bandes ou les principaux pics et leurs attributions aux liaisons caractéristiques des groupements fonctionnels présents dans la membrane M-GX/HA: 30/70.

Tableau II.9 : Interprétation des spectres IRTF des membranes M-GX/HA : 30/70

Nombre d'onde		**Attribution**
M-GX/HAn : 30/70	M-GX/HAs : 30/70	
3600-3000	3000-3600	-Liaison O-H alcoolique -Liaison O-H acide -Liaison O-H dans HA
≈ 2900	≈ 2900	Liaison C-H des $-CH_2$ ou $-CH_3$
2013	-	Liaison C=O
1620	1612	Liaison C=O du groupement carboxyle (COOH)
1419 et 1373	1419	Liaison C=O des groupements COO^- Liaison C=O des carbonates
1288	1280	Liaison C-O du cycle pyranose
1026	1003	Liaison C-O-C du cycle pyranose Liaison C-OH des alcools primaires et secondaires P-O des PO_4^{3-}
-	871	Liaison C=O des carbonates
500-600	500-600	Liaison P-O des PO_4^{3-}

II.6.3.2. Test de gonflement

Sous l'action d'un liquide, un composé macromoléculaire peut subir une augmentation de volume désigné par le nom de gonflement. En faisant l'analogie entre le gonflement et le phénomène osmotique. Durant le gonflement, l'eau passe dans la région la plus concentrée en polymère, et celui-ci gonfle. Ceci continu jusqu'à ce que la tension générée par la déformation du polymère soit suffisante pour empêcher le flux d'eau vers l'intérieur [117]. Dans ce qui suit, nous allons déterminer le taux de gonflement des membranes élaborées.

A. Protocole expérimentale

Le test de gonflement des différentes membranes élaborées a été évalué dans l'eau distillé. Un morceau de chaque membrane (0.05 g) a été immergé dans un volume de 5 ml de l'eau distillé à température ambiante. La masse de chaque membrane est enregistrée à des intervalles de temps régulier (5 mn) jusqu'au poids constant.

Le taux de gonflement est calculé par la relation :

$$\textbf{TG (\%)} = \frac{(masse\ finale - masse\ initiale)}{masse\ initiale} \times 100\%$$

B. Résultat et discussion

Les variations des poids des membranes en fonction du temps sont présentés dans les figures II.20 et II.21 et les taux de gonflement sont donnés dans le tableau II.10.

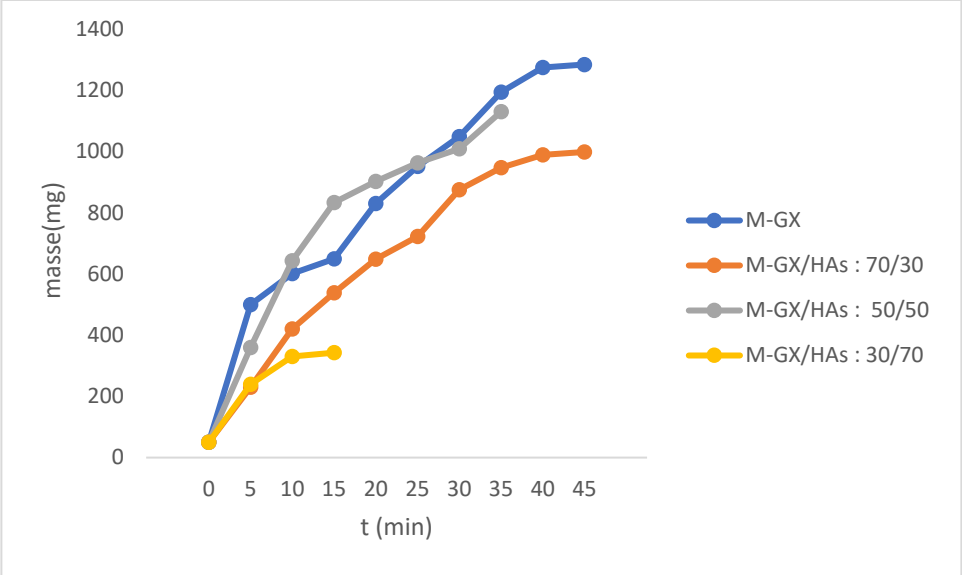


Figure II. 21 : Gonflement des membranes chargées M-GX/HAs.

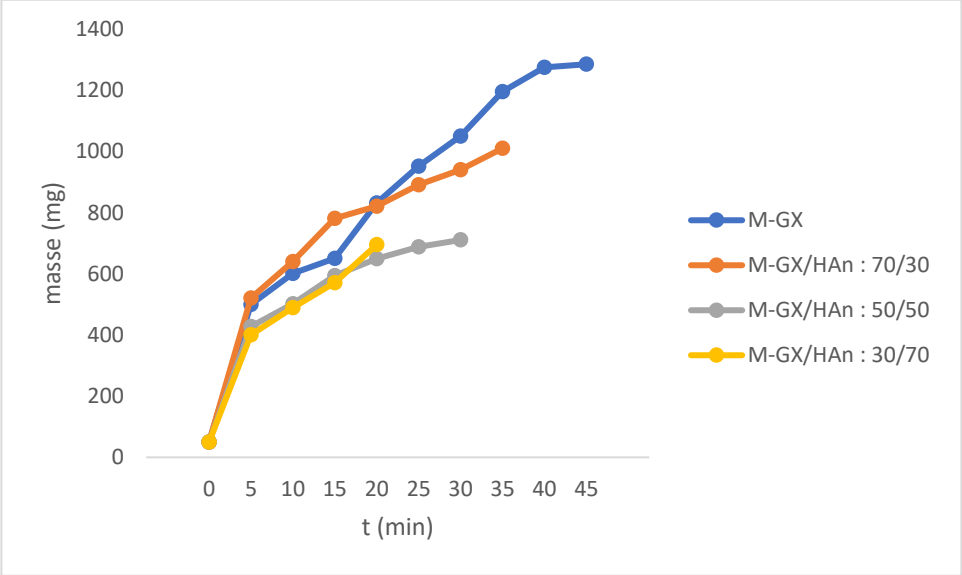


Figure II.22 : Gonflement des membranes chargées M-GX/HAn.

L'analyse de ces résultats montre que la membrane de M-GX présente la valeur la plus élevée de TG (2470%) du fait que le xanthane ait un pouvoir absorbant très élevé, il est connu comme superabsorbant. Le taux de gonflement est inversement proportionnel à la teneur en HA. On note également une dégradation rapide des deux membranes (M-GX/HAs : 30/70) et (M-GX/HAn : 30/70) après 15-20 min d'immersion.

Tableau II.10 : Taux de gonflement des membranes.

Membranes	TG (%)
M-GX/HAs : 30/70	585.8
M-GX/HAs : 50/50	2160.6
M-GX/HAs : 70/30	1898.2
M-GX/HAn: 30/70	1289.8
M-GX/HAn: 50/50	1321.2
M-GX/HAn: 70/30	1920.4
M-GX	2470

II.6.3.3. Test de bioactivité in vitro

L'application visée dans cette étude est une application biomédicale, plus précisément la régénération osseuse. A cet effet, nous avons choisi le fluide physiologique simulé (SBF) comme milieu d'immersion pour effectuer le test de bioactivité in vitro.

A. Préparation de SBF

Le fluide physiologique simulé « Simulated Body Fluide, SBF » est un fluide préparé dans des conditions semblables aux conditions physiologiques du corps humain. Le pH et la température sont à peu près égaux à ceux du plasma sanguin. Il est préparé à une température de 37 ± 0,5 °C, en utilisant la formulation de Kokubo et Taka dama [118]. Les Réactifs utilisés pour la préparation de la solution SBF sont listés par ordre de dissolution dans le tableau II.10. On fait dissoudre les quantités des sels par ordre mentionné ci-dessous. Le pH de la solution est ajusté avec du HCl ajouté goutte à goutte jusqu'à ce qu'il atteigne une valeur variant de 7,2 à 7,4. La solution préparée est bien scellée et stockée à une température de 4 °C afin d'éviter la précipitation des sels [119].

Tableau II.11 : Réactifs utilisés pour la préparation de 100 ml de SBF

Ordre	Réactifs par ordre de dissolution	Quantité (g)
1	Chlorure de sodium NaCl	0.6547
2	Hydrogénocarbonate de sodium $NaHCO_3$	0.2268
3	Chlorure de potassium KCl	0.0373
4	Phosphate de sodium dihydraté $Na_2HPO_4.2H_2O$	0.0178
5	Chlorure de calcium hydraté MgCl2.6H2O	0.0305
6	Acide chlorhydrique HCL(1M)	1.5ml
7	Chlorure de calcium dihydraté $CaCl_2.2H_2O$	0.0368
8	Sulfate de sodium Na_2SO_4	0.0071

B. Immersion des membranes chargées

Un morceau de chaque membrane, de surface 4 cm^2, est immergé dans un volume de 20 ml de SBF. Le récipient est mis dans une étuve à une température de 37°C pendant 21 jours. La solution SBF est renouvelée chaque jour. La solution SBF récupérée est préservée pour déterminer sa teneur en calcium et en phosphate et de ce fait déduire le dépôt des phosphates de calcium sur les membranes.

Cependant, nous avons remarqué que toutes les membranes avec des rapports GX/HA de 50/50 et 70/30 ont été dégradées après 24 heures d'immersion dans la solution SBF. Par conséquent, nous avons suivi seulement le comportement des membranes avec un rapport GX/HA de 30/70.

C. Dosage des ions de calcium (Ca^{+2}) par la méthode volumétrique

Le dosage volumétrique est une méthode d'analyse quantitative permettant de déterminer la quantité précise de substance (ou sa concentration) contenue dans un échantillon. Il est basé sur la réaction entre deux solutions, l'une de concentration connue (solution titrante) et l'autre de concentration inconnue (solution à titrer ou à doser).

La méthode consiste à déterminer le volume de la solution titrante nécessaire pour réagir complètement avec la substance à doser contenue dans un volume donné de la solution à titrer.

Le point d'équivalent est le moment de la fin de la réaction, c'est-à-dire le moment où le nombre d'équivalent de la solution titrante est égale au nombre d'équivalent de la solution à titrer. Généralement il se détermine par le changement de la couleur de la solution titrée.

Afin de déterminer la teneur en calcium de la solution SBF, un volume (5ml) de SPF est mis dans un bécher avec 2 ml de NaOH (2N). La solution est titrée par EDTA (0.001M), en présence d'un indicateur coloré, jusqu'au virage de la couleur du rose violacé au violet Figure II. 22, le point d'équivalent est atteint.

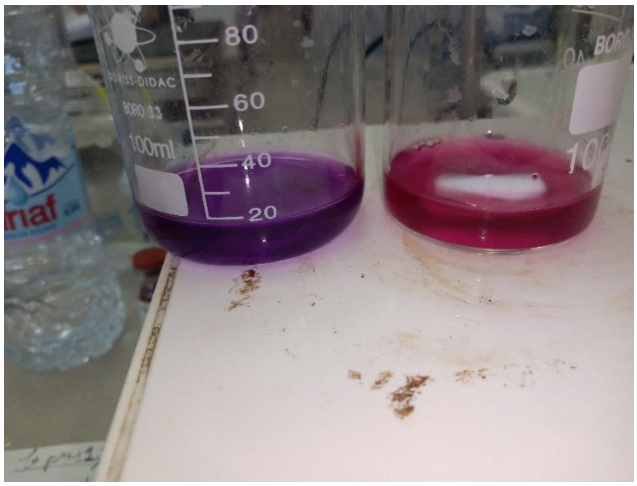


Figure II.23 : Virage de la couleur lors du dosage volumétrique des ions de calcium

Avec cette méthode on peut déterminer la teneur en calcium des solutions de SBF récupérées chaque jour et par conséquent on peut déduire la quantité de calcium fixée par les membranes. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure II.23.

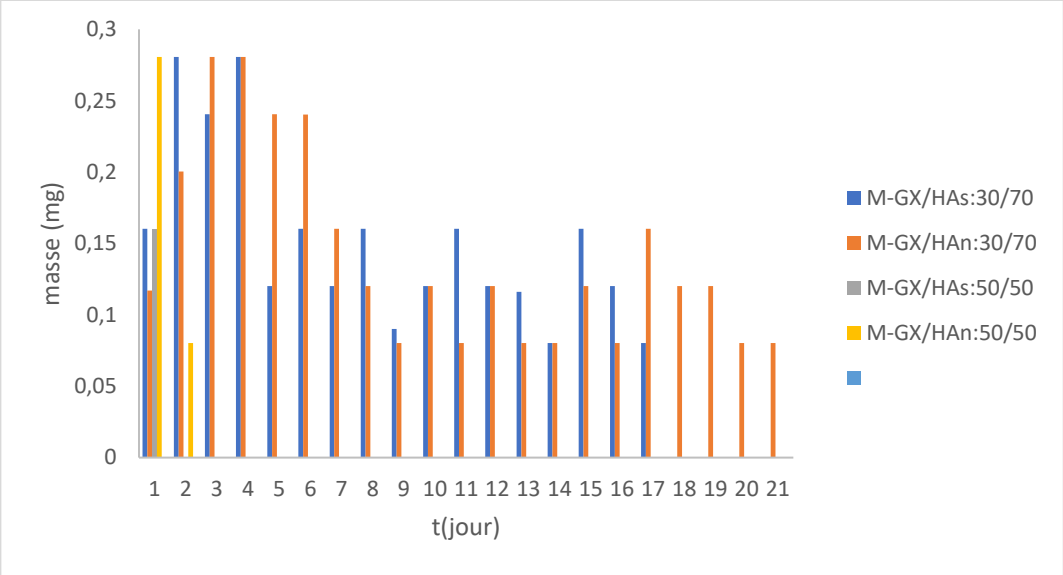


Figure II.24 : Quantité de calcium déposée sur les membranes quotidiennement.

L'analyse de ces résultats montre une fixation quotidienne du calcium par les membranes. Comme nous l'avons déjà mentionné, seulement les membranes ayant une teneur en HA de 70% ont résisté à la dégradation.

Afin de connaitre la quantité totale de calcium fixée par les membranes, nous avons calculé la quantité cumulée du calcium fixé et nous avons représenté les résultats dans la figure II.24. On remarque que la teneur en calcium des membranes augmente en fonction de la durée d'immersion dans la solution SBF. De plus, il n'y a pas une différence significative entre la présence de l'HAs et l'HAn comme charge dans les membranes.

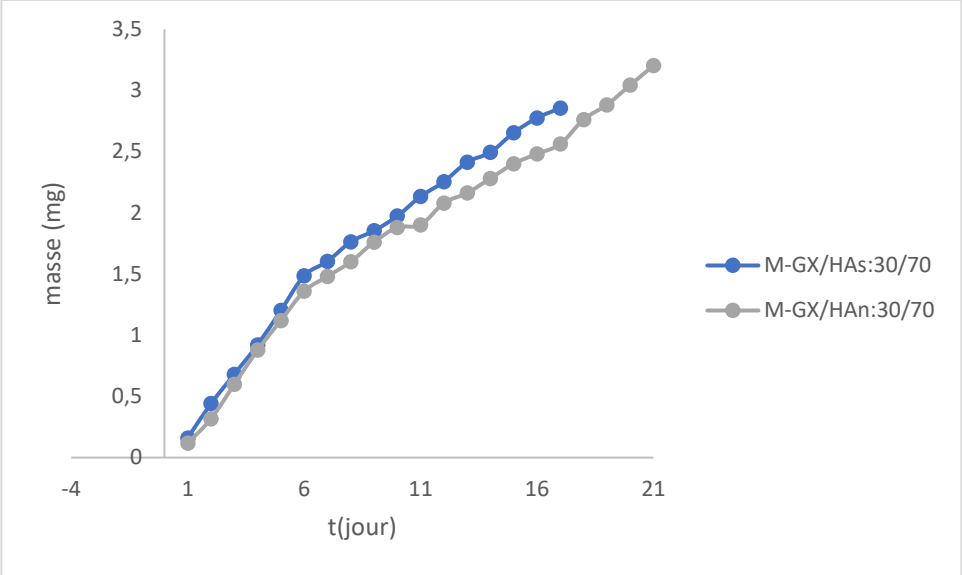


Figure II.25 : Quantité de calcium cumulative fixé sur les membranes pendant 21jours.

C. Dosage des ions Phosphate (PO_4^{3-}) par UV-Visible

➢ Principe de la spectroscopie UV-Visible

En spectroscopie UV-Visible lorsque la cuve contenant la solution est placée dans un spectroscope, elle reçoit un rayonnement d'intensité I_0. Une partie de cette lumière incidente est absorbée par le milieu et le reste, noté I, est transmis. L'intensité (I) du rayonnement issu de la cuve est donc inférieure à l'intensité du rayonnement initial (I_0). La fraction de la lumière incidente absorbée par une substance de concentration C contenue dans une cuve de longueur l est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$\mathbf{A} = \log (I_0/I) = \varepsilon\, l\, C$$

A : absorbance autrefois appelée densité optique (D.O.).

ε : coefficient d'extinction molaire (L.mol-1.cm-1) ou coefficient d'absorption spécifique si c'est exprimé en g/L (ε est en L. g^{-1}. cm^{-1}).

l : largeur de cuve en cm.

C : concentration de la solution (mol. L^{-1}).

- **Protocole expérimentale et résultats obtenus**

Pour suivre le dosage on commence par la préparation des réactifs suivants :

Solution A : molybdate d'ammonium de 2.5g/100 ml.

Solution B : acide sulfurique de 28 ml/100 ml.

Solution C : acide ascorbique 1g/100 ml.

Solution étalon : Hydrogénophosphate de potassium de 1.432 g/L.

Au moment du dosage, le réactif combiné a été préparé par le mélange de 150 ml de solution (A+B) et 50 ml de solution C.

Les échantillons sont préparés par l'addition de 5 ml de SBF d'immersion a un volume de 5 ml de réactif combiné, ils sont portés au bain marie à 80°C pendant 20 min.

L'usage de la spectroscopie UV-visible pour une analyse quantitative nécessite une courbe étalonnage donc on a préparé une solution étalon (1.432g de K_2HPO_4 dans 1L) et une solution fille (1ml de solution étalon sur 100 ml de l'eau distille). Les solutions de la courbe d'étalonnage sont indiquées dans le tableau II.12.

Tableaux II.12 : Préparation de la courbe d'étalonnage

Solution fille(ml)	0	1	2.5	5	7.5	10	20
Réactive combiné (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Concertation en (mg /L	0	0.2	0.5	1	1.5	2	4

L'absorbance des différentes solutions est mesurée à 825 nm. Les résultats de la courbe d'étalonnage sont présentés dans la figure II.25 et les résultats du dosage des solutions SBF sont présentés dans les figures II.26.

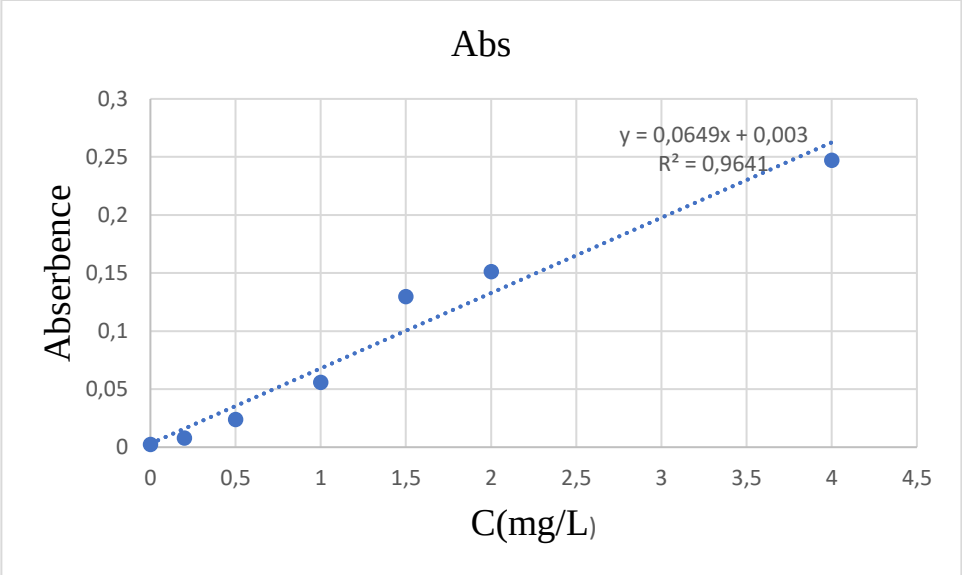


Figure II. 26 : Courbe étalonnage.

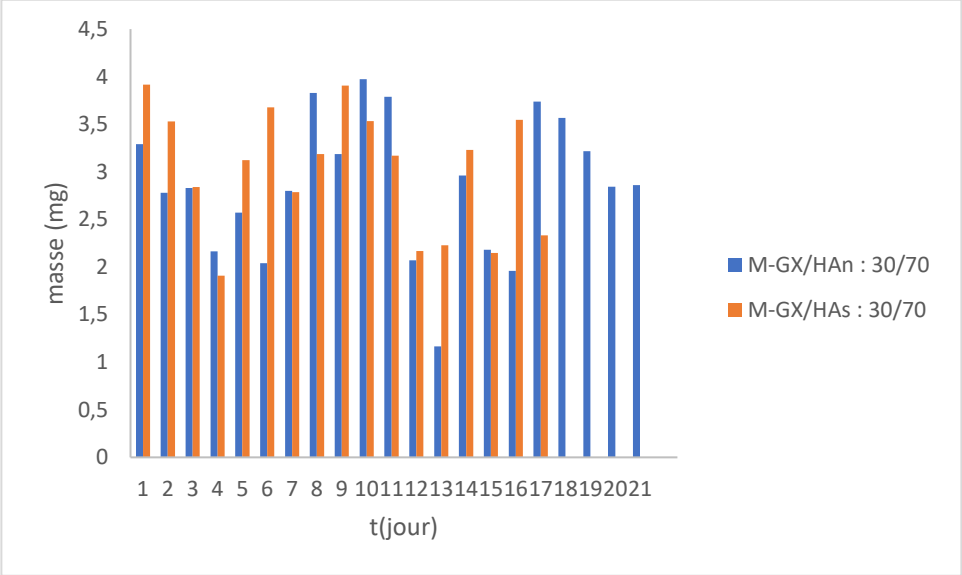


Figure II.27 : La quantité de phosphate fixée sur les membranes chaque jour

L'analyse de ces résultats montre une fixation quotidienne des phosphates par les membranes. Comme nous l'avons déjà mentionné, seulement les membranes ayant une teneur en HA de 70% ont résisté à la dégradation.

Afin de connaitre la quantité totale des phosphates fixée par les membranes, nous avons calculé la quantité cumulée des phosphates fixés et nous avons représenté les résultats dans la figure II.27. On remarque que la teneur en phosphates des membranes augmente en fonction de la

durée d'immersion dans la solution SBF. De plus, il n'y a pas une différence significative entre la présence de l'HAs et l'HAn comme charge dans les membranes.

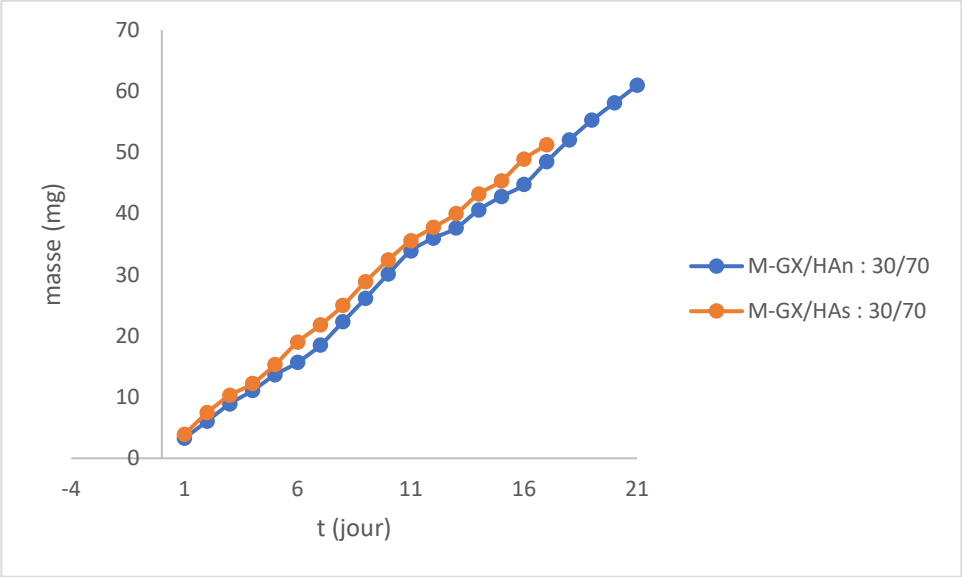


Figure II.28 : La quantité cumulative de phosphate fixée sur les membranes pendant 21 jours.

Aucune entrée de table d'illustration n'a été trouvée.Suite à ces résultats, nous pouvons conclure que la gomme xanthane peut être utilisée comme support de l'hydroxyapatite pour l'élaboration d'un biomatériau pour la régénération osseuse.

Conclusion Générale

L'objectif de notre étude était l'élaboration d'un biomatériau à base des ressources naturelles biopolymère/hydroxyapatite pour une application biomédicale. Pour atteindre cet objectif, notre travail a été organisé comme suit :

1. La première partie a été réservée à la caractérisation physicochimique des deux biopolymères : pectine et xanthane. L'analyse par FTIR a permis de confirmer les principaux groupements fonctionnels de chaque biopolymère (pectine : COOH et $COOCH_3$, Xanthane : COOH et $OCOCH_3$). Le degré d'estérification de la pectine obtenue est de 83% ce qui indique que la pectine utilisée est hautement méthylée.
2. La deuxième partie a été consacrée à la préparation de l'hydroxyapatite par voie de synthèse et par voie de récupération à partir des os de poulets. L'analyse par FTIR des produits obtenus a montré l'existence des pics caractéristiques de l'HA notamment -OH ; PO_4^{3-} sans oublier les pics des carbonates dans le cas de l'HA synthétique.
3. La troisième partie a été dédiée à l'élaboration des membranes composite à base de pectine ou de xanthane comme support et d'hydroxyapatite comme charge minérale. La méthode de gélification a été utilisée pour leurs préparation. L'observation macroscopique à l'œil nu des membranes de pectine chargées a montré que le rapport P/HAs : 70/30 a donné un film continu, épais et opaque. Par contre le rapport P/HAs: 50/50 a donné un film non continu présentant des déchirures et difficile à manipuler. Enfin, pour le rapport P/HAs : 30/70 nous sommes parvenus à obtenir le film. Concernant les membranes à base de xanthane, elles sont plus épaisses et opaques. L'épaissement et la cohésion augmente avec l'augmentation de la teneur en HA. D'après ces résultats, les membranes M-GX/HA sont retenue pour la suite de travail. L'analyse par FTIR des membranes composites a montré l'existence des pics caractéristiques de la pectine ou du xanthane et de l'HA. Enfin, le taux de gonflement des membranes est inversement proportionnel à leur teneur en HA.
4. La dernière partie concerne le test de bioactivité in vitro. Il s'agit de suivre le comportement des membranes en contact du liquide physiologique synthétique. Les résultats de l'analyse de la teneur en calcium et en phosphate de liquide d'immersion ont montré une fixation quotidienne du calcium et des phosphates par les membranes.

5. Cependant, seulement les membranes ayant une teneur en HA de 70% ont résisté à la dégradation.

Suite à ces résultats, nous pouvons conclure que la gomme xanthane peut être utilisée comme support de l'hydroxyapatite pour l'élaboration d'un biomatériau pour la régénération osseuse. Cependant, plusieurs perspectives sont à envisager parmi lesquels :

- Analyse par DRX de la phase déposée sur les membranes après le test de bioactivité et analyse par MEB des membranes composites.
- Inclusion d'un antibiotique pour prévenir les infections osseuses.

Référence bibliographique

[1] BELILITA KAMEL. CARACTERISATION OPTIQUE DES BIOMATERIAUX SOUMIS A LA FATIGUE. Université Ferhat Abbas. Sétif .2012

[2] K. D. Jandt, Evolutions, Revolutions and Trends in Biomaterials Science – A Perspective. Advanced Engineering Materials, 9-12 (2007).

[3] G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber. (1986). Atomic force microscope. Phys. Rev. Lett., 56:930-933.

[4] D. Muster, JL. Vouillot, JH. Dubruille : « Biomatériaux, biomatériels et bio-ingéniérie en chirurgie orale et maxillo-faciale » (I et II) Encycl Méd Chir Stomatologie/Odontologie, Elsevier, Paris 1999, 22-014-F-10 et 22-014-F-14.

[5] Ministère de la Recherche, "Biomatériaux et suppléance fonctionnelle". Les technologies pour la santé, (2005].

[6]. H.J. Breme, V. Biehl, J.A. Hielsen, Metals and Implants. Metals as Biomaterials, éd. Wiley and Sons, 36-71 (1998).

[7]. E. Chabault, Nanofriction of UHMWPE on Gold and Cobalt- Chromium Alloys. Rapport de PFE INSA Clemson University, (2000).

[8]. A. Michiardi, C. Aparicio, J.A. Planell, F.J. Gil, Surface coating and technology6484-6488 (2007).

[9]. C. Kuphasuk, Y. Oshida, C. J. Andres, S. T. Hovijitra, M. T. Barco, D. T. Brown. J. Prosthet Dent 85, 195-202 (2001).

[10] C. Piconi, G. Maccauro, J. Biomater 20, 1-25 (1999).

[11]. P. Ducheyne, Q. Qui, J. Biomater 20, 2287-2303 (1999).

[12]. J. Wang, P. Layrolle, M. Stigter, K. de Groot, J. Biomater 25, 583-592 (2004).

[14] T. Billiet, M. Vandenhaute, J. Schelfhout, S. VanVlierberghe, P. Dubruel. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. Biomaterials.33.6020–6041. (2012)

[15] G. M. Raghavendra, K. Varaprasad, T. Jayaramudu. Chapter 2 - biomaterials: design, development and biomedical applications, in: S. Thomas, Y. Grohens, N. Ninan. Nanotechnology Applications for Tissue Engineering. William Andrew Publishing, Oxford.21–44. (2015).

[16] G. Papavasiliou, P. Kamposiora, SC. Bayne, DA. Felton. Three-dimensional finite element analysis of stress distribution around single tooth implants as a function of bony support, prosthesis type, and loading during function. J Prosthet Dent 1996; 76(6):633–40

[17] AN. Natali, PG. Pavan. A comparative analysis based on different strength criteria for evaluation of risk factor for dental implants. Comput Methods Biomech Eng.5 :127–33,2002.

[18] BAQUEY Charles. Les biomatériaux : des matériaux doublement exigeants. URL : http://www. inserm.fr/ consulté le 11-05-2012.].

[19] N. Jarroux. Les biopolymères : différentes familles, propriétés et applications, Techniques de l'ingénieur. Traité AM 3580. 2012.

[20] El Hadji Boubacar Ly. Thèse de doctorat « Nouveaux matériaux composites thermoformables a base de fibre de cellulose ». INP Grenoble. 2008.

[21] Pauline Olivier et Claire Riefer élève ; l'utilisation des biopolymères dans l'industrie d'emballage papier complexe et laminée : info ou intox ? Mai 2003

[22] Aimesther Ojito Betancourt « Analyse, extraction et récupération de Poly-3-Hydroxybutyrate présent dans la biomasse », Université de Québec, Montréal. 2008.

[23] Club Bioplastique « Les bioplastiques d'origine végétale des produits renouvelables et biodégradables ». 2007.

[24] Nina Quelenis « Les bioplastiques, caractéristiques et réglementation » Fiche Technique. 2008. NINA Quelenis « les bioplastiques, caractéristiques et réglementation », fiche technique, Mars 2008.

[25] Holy Rabetalika, Michel Paquot ; Philippe Du Bois «Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique », Service des matériaux polymères et composites, Université De Mons Hainant Belgique. 2006.

[26] A. Boukerrou, D. Hammiche. Mémoire de Master «Effet D'un Renfort Biodégradable sur Les Propriétés Physico-Mécaniques D'un Biopolymère Phbv » : Université A. Mira– Bejaia. 2015.

[27] A. Babanalbandi, D.J.T. Hill, J.H. O'donnell, P.J. Pomery. «An electron Spin Resonance Analysis on [Gamma]-irradiated Poly (Glycolic acid) and its copolymers with Lactic Acid, Polym. Degrad. Stab. 52 (1996) 59-66.

[28] M.L. Cairns, A. Sykes, G.R. Dickson, J.F. Orr, D. Farrar, A. Dumba, F.J. Buchanan. «Through-Thickness control of polymer bioresorption via electron beam irradiation, Acta Biomater. 7, (2011), 548-557.

[29] I. Alkorta, C. Garbisu, M.J. Liama, J.L. Serra, 1998.Industrial applications of pectic enzymes: a review. Process. Biochem, 33(1), 21-28.

[30] P. Blanco, C. Sieiro, G.T. Villa. Production of pectic enzymes in yeasts. FEMS Microbiol. Lett, 175, 1-9.1999.

[31] K. Iwasaki, Inoue M. & Matsubara Y., 1998. Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endopolygalacturonase in a continuously stirred tank reactor. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62, 262-272.

[32] B.L. Ridley, M.A. O'Neil, D. Mohnen. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, Phytochemistry. 57, 929 - 967. (2001).

[33] SCHOLS H.A. & VORAGEN A.G.J. (2002). The chemical structure of pectins. In: Pectins and their Manipulation. Blackwell Publishing Ltd, 1-29.

[34] P.J.H. Daas et al. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endo-polygalacturonase. Carbohydr. Res. 318, 135-145. 1999.

[35] E. Bonnin et al., b. Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by Aspergillus niger I-1472. Enzyme Microb. Technol., 31, 1000-1005. 2002.

[36] L. Liu, M. L. Fishman, J. Kost, K. B. Hicks: Pectin-based systems for colon- specific drug delivery via oral route, Biomaterials, 24(19), pp. 3333-3343. (2003).

[37] M.L. Fishman. Chemistry and Function of Pectins. American Chemical Society. Washington. (1986).

[38] MC. RALET, JC. CABRERA, B. QUEMENER. E. BONNIN, JF. THIBAULT Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. Phytochemi.66, 1832-1843. (2006).

[39] J. Harholt, A. Suttangkakul, H.V. Scheller. Biosynthesis of Pectin. Plant Physiol. 153:384–395. (2010).

[40] S. Pranati, M. Rishabha «Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry– an overview». Indian Journal of Natural Products and Resources, 2(1), pp. 10-18. (2011).

[41] Elodie Zawlotzki Guivarch. thèse de docteura « Traitement des polluants organiques en milieux aqueux par procédé électrochimique d'oxydation avancée Electro- Fenton Application à la minéralisation des colorants synthétiques », l'université de Marn-lavallé.2004.

[42] J. Stolle-Smits, J.G. Beekhuzen, K. Recourt, A.G.J. Voragen, C.V. Dijk, J. Agric Changes in pectic and hemicellulosic polymers of green beans during industrial processing. Food Chemi., in press ,72-89. (1998).

[43] D. Ziad, S. Mihir, M. A. M. Roula, «Pectin shows antibacterial activity against Helicobacter pylori». Advances in Bioscience and Biotechnology, 4(2), pp. 273-277. (2013).

[44] J.F. THIBAULT, R. PETIT, Les substances pectiques : Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés. Ed. Bordas, Paris. (1979).

[45] Sriamonrnsak P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. pp 206 228.

[46] Oosterveld A., Beldman G. B., Schols H. A., VoragenA. J. «Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp». Carbohydrate Research, (1996), 288(19), pp. 143-153

[47] Ziad D., Mihir S., Roula M. A. M. ; «Pectin shows antibacterial activity against Helicobacter pylori». Advances in Bioscience and Biotechnology, (2013), 4(2), pp. 273-277.

[48] E. Shekarforoush, A. Faralli, S. Ndoni, A. C. Mendes, and I. S. Chronakis, "Electrospinning of xanthan polysaccharide," Macromol. Mater. Eng., vol. 302, no. 8,2017.

[49] P. Jansson, L. Kenne, and B. Lindberg, "Structure of the extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris," Carbohydr. Res., vol. 45, no. 1, pp. 275–282, 1975.

[50] L. D. Melton, L. Mindt, and D. A. Rees, "Covalent structure of the extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris: evidence from partial hydrolysis studies," Carbohydr. Res., vol. 46, no. 2, pp. 245–257, 1976.

[51] L. G. Torres, E. Brito, E. Galindo, and L. Choplin, "Viscous behaviour of xanthan aqueous solutions from a variant strain of Xanthomonas campestris," J. Ferment. Bioeng., vol. 75, no. 1, pp. 58–64, 1993.

[52] K. P. Shatwell, I. W. Sutherland, I. C. M. Dea, and S. B. Ross-Murphy, "The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behaviour of xanthan," Carbohydr. Res., vol. 206, no. 1, pp. 87–103, 1990.

[53] F. Garcıa-Ochoa, V. E. Santos, J. A. Casas, and E. Gómez, "Xanthan gum: production,recovery, and properties," Biotechnol. Adv., vol. 18, no. 7, pp. 549–579, 2000.

[54] J. A. Casas, V. E. Santos, and F. Garcıa-Ochoa, "Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties," Enzyme Microb. Technol., vol. 26, no. 2–4, pp. 282–291, 2000.

[55] G. C. Barrere, C. E. Barber, and M. J. Daniels, "Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by Xanthomonas campestris pv. campestris," Int. J. Biol. Macromol.vol. 8, no. 6, pp. 372–374, 1986.

[56] D. A. Angioloni, "La Gomme Xanthane dans l'Industrie Alimentaire."

[57] Hublik, G., Xanthan. Polymer Science A: Comprehensive Review 2012, 10, 221-229.

[58] Katzbauer, B., Properties and applications of xanthan gum. Polymer Degradation and Stability 1998, 59, 81-84.

[59] Born, K.; Langendorff, V.; Boulenguer, P., Xanthan. In Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes, Vandamme, E. J.; de Baets, S.; Steinbuchel, A., Eds. WILEY-VCH: 2002; Vol. 5, pp 259-269.

[60] Morris, V. J., Bacterial polysaccharides. In Food Polysaccharides and their applications, second edition, Stephen, A. M.; Phillips, G. O., Eds. Taylor & Francis Group, LLC: 2006; pp 413-443.

[61] K. De Groot, C.P.A.T. Klein, J.G.C. Wolke, J.M.A. De Blieck-Hoegervorst, 'Chemistry of calcium phosphate ceramics', CRC Hanbook of Bioactive Calcium Phosphates, T. Yamamuro, L. Hench, J. Wilson eds., CRC Press, Boca Raton (FL), 1990.

[62] O. Prokopiev, I. Sevostianov, 'Dependence of the mechanical properties of sintered hydroxyapatite on the sintering temperature', Mat. Sci. Eng. A31, 218-2227, 2006.

[63] D.K. Pattanayak, R. Dash, R.C. Prasad, B.T. Rao, T.R. Rama Mohan, 'Synthesis and sintered properties evaluation of calcium phosphate ceramics', Mat. Sci. Eng. C, sous presse, 2006.

[64] R.G.T. Geesink, 'Hydroxyapatite coatings : where do we stand, where do we go ?', Hydroxyapatite coated hip and knee arthroplasty, J.A. Epinette, R.G.T. Geesink eds., Cahier d'Enseignement de la SOFCOT, 345-376, 1995.

[65] C.H. Queck, K.A. Khor, P. Cheang, 'Influence of processing parameters in the plasma spraying of hydroxyapatite/Ti-6Al-4V composite coatings', J. Mat. Proc. Tech. 89-90, 550-55, 1999.

[66] R.B. Heimann, 'Thermal spraying of biomaterials', Surf. Coat. Tech. 201, 2012-2019, 2006.

[67] C.W. Yang, T.M. Lee, T.S. Lui, E. Chang, 'Effect of post vacuum heating on the microstructural feature and bond strength of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings', Mat. Sci. Eng. C26, 1395-1400, 2006.

[68] P. Ducheyne, J.M. Cuckler, Bioactive ceramic prosthetic coatings. Clin Orthop Relat Res ; (1992).

[69] P. Ducheyne, H.Lench., A. Kagan, M. Martens, A. Bursens, J.C. Mulier, Effect of hydroxyapatite impregnation on skeletal bonding of porous coated implants. J. Biomed Mater Res; 14, pp. 225, 237, (1980).

[70] L. Hench, Bioceramics: from concept to clinic. J. Am Ceram Soc ;74, pp. 1487–510, (1991).

[71] M., J. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop, 15, pp. 259–78,(1981).

[72] Raynau. S, Champion. E, D. Bernache-Assollant and P. Thomas, Biomaterials, Vol. 23, pp. 1065-1072 (2002).

[73] M. Ezzat,M.B.S. Soliman, A. Salwa Ahmed, Alumina modified by dimethyl sulfoxide as a new selective solid phase extractor for separation and preconcentrating of inorganic mercury (II), Talanta, 69, pp. 55-60, (2006).

[74] G. Montel, G.B. J.-C. Trombe, J-Claude Heughebaert, C. Rey, Pure & Appl. Chem., 52 , pp. 973-987, (1980).

[75] M. I. Kay, R.A.Y, and A. S. Posner, Nature,Crystal structure of hydroxyapatite,204, pp. 1050-1052, (1964).

[76] J. C. Elliot, P.E.M, and R. A. Young, Science,Monoclinic Hydroxyapatite, 180, pp. 1055-1057,(1973).

[77] R. G. V. Hancock., M.D.G.a.B.A. Chem.,An International Journal Dealing with All Aspects and Applications of Nuclear Chemistry., J. Radioanal. Nucl,110, pp. 283-291, (1987).

[78] L. Calderin, M.J.S. A. Rubio, Phys. Rev. B,Electronic and crystallographic structure of apatites,67, pp.134106-134112, (2003).

[79] G. Montel, Sur les structures de quelques apatites d'intérêt biologique et leurs imperfections, Bulletin de Minéralogie, 94 (1971) 300-313.

[80] J. C. Elliott, "Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates". Amsterdam-London-New York-Tokyo, Elsevier, 1994.

[81] S.V. Dorozhkin, "A review on the dissolution models of calcium apatites". Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials: 2002, 45-61.

[82] P. Gramain P. Schaad, Dissolution of Calcium Hydroxyapatite, Surfactant Science 2000, 88, 475-512.

[83] S. Shimabayashi and M. Nakagaki, Concurrent adsorption of calcium ion and hydroxyl ion on hydroxyapatite". Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1983, 31, 2976-2985.

[84] I. D. Smiciklas, S. K. Milonjic, P. Pfendt and S. Raicevic, The point of zero charge and sorption of cadmium (II) and strontium (II) ions on synthetic hydroxyapatite". Separation and Purification Technology 2000, 18, 185-194.

[85] Y. Avnimelech, E. C. Moreno and W. E. Brown, Solubility and surface properties of finely divided hydroxyapatite, Journal of Research of the National Bureau of Standards - A. Physics and Chemistry, 1972, 77A, 149-153.

[86] S.V. Dorozhkin, Surface reactions of apatite dissolution, Journal of Colloid and Interface Science, 1997, 191, 489-497.

[87] A. N. Smith, A. M. Posner, J. P. Quirk, Incongruent dissolution and surface complexes of hydroxyapatite, Journal of Colloid and Interface Science, 48, 1974, 442-449.

[88] J. C. Elliot structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphate, studies Inorganic chemistry 18, 1msterdam, London, New York, Tokyo, Elsevier 1994.

[89] L. Wu, W. Forsling, P. W. Schindler, Surface Complexation of Calcium Minerals in Aqueous Solution". Journal of Colloid and Interface Science, 1991, 147, 178-185.

[90] A. N. Smith, A. M. Posner and J. P. Quirk, Incongruent dissolution and surface complexes of hydroxyapatite, Journal of Colloid and Interface Science, 1974, 48, 442-449

[91] M. Kukura, L.C. Bell, A. M. Posner, J.P. Quirk, Radioisotope determination of the surface concentrations of calcium and phosphorous on hydroxyapatite in aqueous solution, Journal of Physical Chemistry 1972, 76, 900-904

[92] J.M. Cases, P. Jacquier, S. M. Smani, J. E. Poirier, J.Y. Bottero, Propriétés électrochimiques superficielles des apatites sédimentaires et flottabilité, Revue de l'Industrie Minérale, Janvier-Février: 1989, 122-133.

[93] L. Wu, W. Forsling, P. W. Schindler, Surface Complexation of Calcium Minerals in Aqueous Solution, Journal of Colloid and Interface Science, 1991, 147, 178-185.

[94] M-V. Ruby. A Davis and A. Nicholson. In Situ Formation of Lead phosphates in Soils as a Method to Immobilize, Environ. Sci. Technol. 1994, 28, 646-654.

[95] W. Suchanek, M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, Journal of Materials Research, 13 (1998) 94-117.

[96] B. O. Fowler, Inorganic chemistry, Vol. 13, pp. 194-207 (1974).

[97] W.F. Zambuzzi, C.V. Ferreira, J.M. Granjeiro and H. Aoyama, Biomedical Materials Research Part A, Vol. 97, pp. 193-200 (2011).

[98] M. Tagaya, T. Ikoma and N. Hanagata and T. Yoshioka and Junzo, Science and technology of advanced materials, Vol. 12, pp. 03441 (2011).

[99] H. Petite, Medecine/ sciences, Vol. 18, pp. 995- 1002 (2002).

[100] L. L. Hench, J. Wilson, " An introduction to bioceramics", pp. 1-24, Edition J. Wilson, Singapore: World Scientific (1993).

[101] M. Markovic and J. Res. Natl, Inst. Stand. Technol, Vol. 109, pp. 553 (2004).

[102] Y. Shikinami and M. Okuno, Biomaterials, Vol. 20, pp. 859-877 (1999).

[103] W. Dietmar Hutmacher, Biomaterials, Vol. 21, pp. 2529-2543 (2000).

[104] K. Balani Rebecca Anderson, T. Laha, M. Andara and J. Tercero, Biomaterials, Vol. 28, pp. 618–624 (2007).

[105] R. Joseph. Woodard, J. Amanda. Hilldore, K. Sheeny Lan, C.J. Park, Abby W. Morgan, Jo Ann C. Eurell, Sherrie G. Clark, Matthew B. Wheele, Russell D. Jamison and Amy J. Wagoner Johnson, Biomaterials, Vol. 28,pp. 45–54 (2007).

[106] H. Qiu, J. Yang, P. Kodali, J. Koh and A Guillermo Ameer, Biomaterials, Vol. 2 pp. 5845–5854 (2006).

[107] S. Devilleet, E. Saiz and P A. i. Tomsia, Biomaterials, Vol. 27,pp. 5480–5489 (2006).

[108] R. Legros, N. Balmain, G. Bonel, Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone, Calcified tissue international, 41 (1987) 137-144.

[109] G. Daculsi., O. Laboux., O Malard and P. Weiss, Mater Sci: Mat in Med, Vol. 14, pp. 195-200 (2003).

[110] G. S. Sailaja P. Ramesh, T. V. Kumary and H. K. Varma, ActaBiomaterialia, Vol. 2, pp. 651-657 (2006).

[111] R. Tahir, K. Banert, A. Solhy and S. Sebti, Molecular Catalysis A: Chemical, Vol. 246, pp. 39 -4 (2006).

[112] M. Zahouily, Y. Abrouki, B. Bahlaouan, A. Rayadh and S. Sebti, Catalysis Communications, Vol. 4, pp. 521– 524 (2003).

[113] A. Smahi, A. Solhy, H. El Badaoui, A. Amoukal, A. Tikad, M. Maizi and S. Sebti, Applied Catalysis A: General, Vol. 250, pp. 151–159 (2003).

[114] F. Monteil-Rivera, M. Fedoroff, J. Jeanjean, L. Minel, M. G. Barthes and J. Dumonceau, Colloid and Interface Science, Vol. 221, pp. 291–300 (2000).

[115] A. Benmoussa, C. Delaurent, J.L. Lacout, P.R. Loiseaud and M. Mikou, Chromatography A, Vol. 731, pp. 153-160 (1996).

[116] Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials27 (2006) 2907-2915

[117] H.Maachou.thèse de magistère. Etude des propriétés de retention et absorption d'un biomatériau fibreux : fibre de luffa cylindrica /poly-N-Acétylglucosamine comme un nouveau absorbant de couche hygiénique.université médéa. 2001/2002.

[118] D. M. Liu, T. Troczynski, W. J. Tseng, Aging effect on the phase evolution of sol gel hydroxyapatite. Biomaterials, 23 (2002) 1227-1236.

[119] P.L.M. Barreto, A.T. N. Pires, V. Soldi,, Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. Polymer Degradation and Stability 79 (2003) 147-152.