

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie

Réf :

Mémoire

Présenté par

BRAHAMI Yousra
Pour l'obtention du diplôme de

Master Académique/Professionnel
Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie et santé

Thème

Élaboration et modification de biomatériaux destinés à la réparation osseuse.

Soutenue le : 07/07/2025

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mme KOUACHI KAHINA	Professeur	Président
Mme MESKI SAMIRA	MCA	Encadrant
Mme ZIDANE NADJET	MAA	Examineur
Mr SLIMANI NADIR	Doctorant	Co-Encadrant

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciement

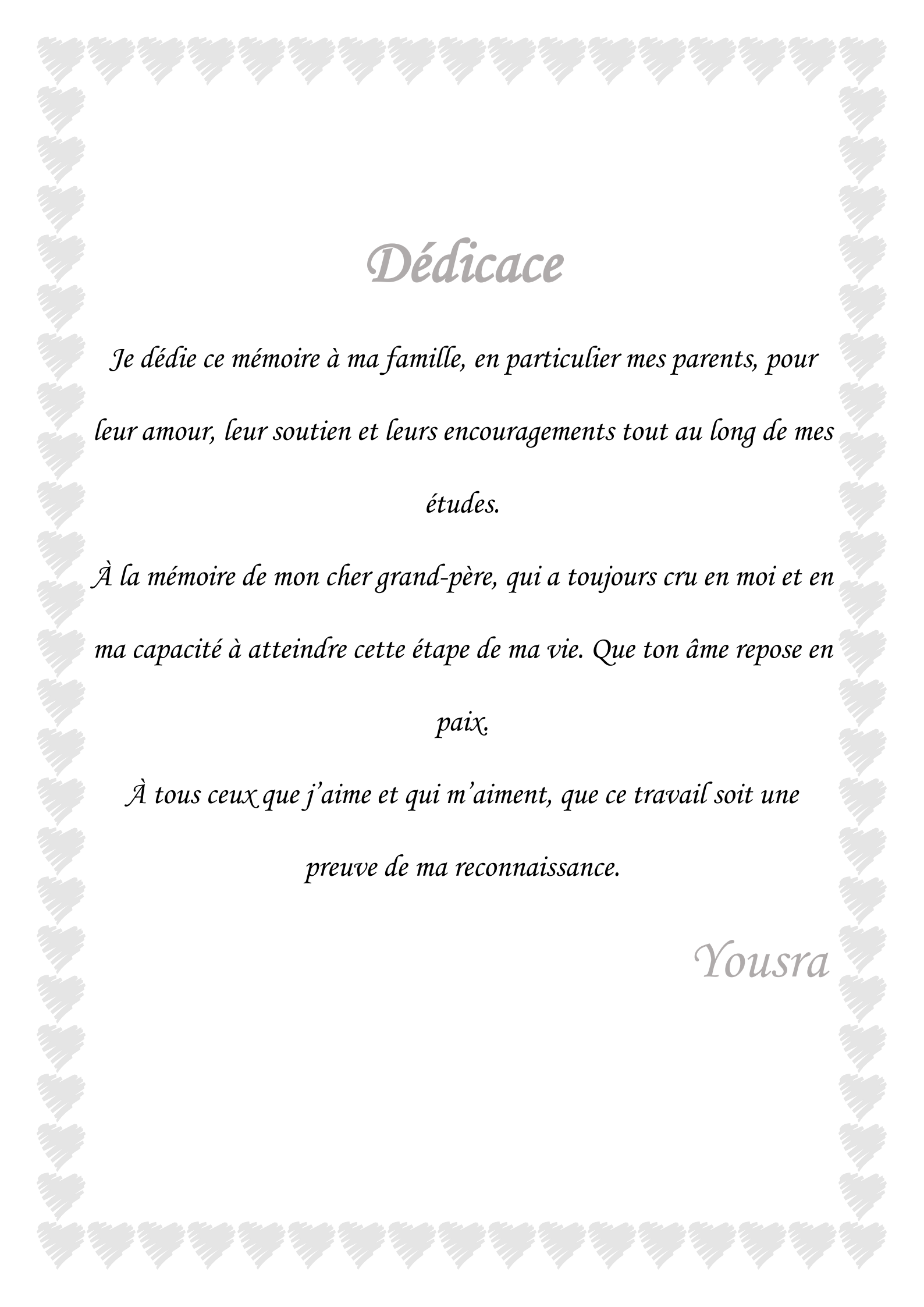
*Je remercie tout d'abord **Dieu**, le Tout-Puissant, de m'avoir accordé la santé, le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce modeste travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadrante, Mme **MESKI Samira**, ainsi qu'à mon co-encadrant, Mr **SLIMANI Nadir**, pour leur encadrement, leur disponibilité, leurs conseils et leur accompagnement constant tout au long de ce mémoire.*

*Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury, Mme **KOUACHI**, présidente du jury, et Mme **ZIDANE**, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Mme **BOUREBABA Yasmina** et Mr **BOUDJOUAN Fares** ainsi que tous mes Enseignants du Département Biotechnologie.*

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien des ingénieurs, techniciens, chercheurs et étudiants des laboratoires de Génie de l'Environnement, de Génie des Procédés et de Biotechnologie, ainsi que de toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à sa réalisation.



Dédicace

Je dédie ce mémoire à ma famille, en particulier mes parents, pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études.

À la mémoire de mon cher grand-père, qui a toujours cru en moi et en ma capacité à atteindre cette étape de ma vie. Que ton âme repose en paix,

À tous ceux que j'aime et qui m'aiment, que ce travail soit une preuve de ma reconnaissance.

Yousra

Table des matières

Liste des Figure	
Liste des Tableaux	
Liste des Abréviations	
Introduction.....	- 1 -
Partie bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur l'os et l'anatomie de l'organe dentaire	
I. 1. Généralités sur l'os.....	- 3 -
I.1.1. Classification des os.....	- 3 -
I.1.2. Structure de l'os.....	- 4 -
I.1.3. Composition de l'os.....	- 5 -
I.1.4. Le remodelage osseux.....	- 5 -
I.2. La dent.....	- 6 -
I.3. La parodontite.....	- 7 -
I.3.1. Étiologie et facteurs de risque.....	- 8 -
I.3.2. Traitement de la parodontite.....	- 8 -
I.3.3. Les greffes osseuses.....	- 10 -
Chapitre II : Généralités sur les biomatériaux et l'hydroxyapatite	
II.1 Généralités sur les biomatériaux.....	- 11 -
II.1.1. Définition d'un biomatériau.....	- 11 -
II.1.2. Types de biomatériaux.....	- 11 -
II.1.3. Caractéristiques idéales d'un substitut osseux.....	- 12 -
II.2. Les biocéramiques.....	- 13 -
II.3. L'hydroxyapatite.....	- 13 -
II.4. Structure cristalline de l'hydroxyapatite.....	- 14 -
II.5. Méthodes de synthèse de l'hydroxyapatite.....	- 15 -
II.5.1. Méthode de précipitation.....	- 15 -
II.5.2. Méthode de sol-gel.....	- 15 -
II.6. Mécanismes d'interaction de l'hydroxyapatite avec l'os.....	- 16 -
Chapitre III : Généralités sur les plantes et leurs effets antimicrobiens	
III.1. Généralités sur les plantes médicinales.....	- 18 -
III.2. Le Romarin.....	- 19 -
III.2.1. Description botanique.....	- 19 -
III.2.2. Principaux composés bioactifs et leurs activité biologique.....	- 19 -
III.2.3. Utilisation du romarin.....	- 20 -
III.3. L'Ortie.....	- 21 -
III.3.1. Description botanique.....	- 21 -
III.3.2. Principaux composés bioactifs et leurs activité biologique.....	- 21 -
III.3.3. Utilisation de l'ortie.....	- 21 -
III.4. Le clou de girofle	- 22 -
III.4.1. Description botanique.....	- 22 -
III.4.2. Principaux composés bioactifs et leurs activité biologique.....	- 22 -
III.4.3. Utilisation du clou de girofle.....	- 22 -
III.5. Méthodes d'extraction végétale.....	- 23 -

Partie expérimentale

Chapitre IV : Préparation et caractérisation des extraits de plantes

IV.1. Préparation des extraits végétaux.....	24 -
IV.1.1. Récolte et préparation des plantes.....	24 -
IV.1.2. Extraction.....	25 -
IV.2. Caractérisation des extraits.....	26 -
IV.2.1. Détermination du rendement d'extraction	26 -
IV.2.2. Dosage des polyphénols totaux.....	28 -
IV.2.3. Dosage des flavonoïdes.....	29 -

Chapitre V : Préparation et caractérisation des matrices apatitiques et des composites avec extraits végétaux

V.1. Synthèse de l'hydroxyapatite par voie sol-gel.....	32 -
V.2. Synthèse des poudres d'hydroxyapatite par la méthode de précipitation.....	32 -
V.3. Techniques de caractérisation utilisées	34 -
V.3.1. Analyse de diffraction des rayons X (DRX).....	34 -
V.3.2. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	38 -
V.4. Préparation des composites HA-extrait.....	41 -
V.4.1. Caractérisation des composites préparés	42 -
V.4.1.2. Analyse infrarouge.....	42 -

Chapitre VI : Évaluation des effets antimicrobiens des extraits et des composites préparés

VI.1. Les souches utilisées	43 -
VI.1.1. <i>Escherichia coli</i>	43 -
VI.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	44 -
VI.1.3. <i>Candida albicans</i>	45 -
VI.2. Les milieux de cultures utilisés.....	45 -
VI.2.1. La gélose nutritive (GN).....	46 -
VI.2.2. La gélose Mueller-Hinton.....	46 -
VI.3. Préparation des précultures.....	47 -
VI.4. Préparation des suspensions bactériennes et réalisation des tests antibactériens	47 -
VI.4.1. Préparation des suspensions bactériennes.....	47 -
VI.4.2. Ensemencement et dépôt de disques (pastilles).....	47 -
VI.4.3. Préparation des extraits	48 -
VI.4.4. Lecture des résultats.....	48 -
VI.5. Résultats et interprétations	48 -
VI.5.1. Détermination de la sensibilité des extraits étudiés vis-vis des trois souches.....	48 -
VI.5.2. Étude de l'effet synergique entre la tétracycline et l'extrait végétal sur l'activité antibactérienne contre <i>Staphylococcus aureus</i>	50 -
VI.5.3. Effet de la concentration des composites HA-Extrait sur l'activité antibactérienne contre <i>Staphylococcus aureus</i>	51 -
Conclusion et perspectives.....	53 -
Références bibliographiques.....	55 -

Liste des Figures

Figure I.1 : Classification des os selon leur forme.....	4 -
Figure I.2 : Structure de l'os naturel.....	5 -
Figure I.3 : Remodelage osseux cellulaire.....	6 -
Figure I.4 : L'anatomie d'une dent.....	6 -
Figure I.5 : Étapes de développement de la maladie parodontale.....	7 -
Figure I.6 : Avant et après un traitement non-chirurgical -surfaçage radiculaire-.....	9 -
Figure I.7 : Cas d'une parodontite sévère.....	9 -
Figure II.1 : Exemples de biocéramiques (phosphates de calcium commercialisés).....	13 -
Figure II.2 : Différentes formes commercialisées d'HA.....	14 -
Figure II.3 : La structure cristalline d'hydroxyapatite.....	14 -
Figure II.4 : Processus de régénération osseuse déclenché par l'action d'un biomatériau (HA)..-	17 -
Figure III.1 : <i>Rosmarinus officinalis-L</i>	19 -
Figure III.2 : <i>Urtica dioica L</i>	21 -
Figure III.3 : <i>Syzygium aromaticum</i>	22 -
Figure III.4 : Différentes méthodes d'extraction végétale.....	23 -
Figure IV.1 : Carte géographique représentative de la région d'étude.....	24 -
Figure IV.2 : Les trois plantes utilisées dans cette étude.....	25 -
Figure IV.3 : Préparation des extraits végétaux.....	26 -
Figure IV.4 : Rendement d'extraction des trois plantes.....	27 -
Figure IV.5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux..-	28 -
Figure IV.6 : Teneur en polyphénols totaux des trois extraits.....	29 -
Figure IV.7 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	30 -
Figure IV.8 : Teneur en flavonoïdes des trois extraits.....	30 -
Figure V.1: Diffractogramme DRX de l'hydroxyapatite synthétisée par voie sol-gel.....	35 -
Figure V.2 : Diffractogramme DRX de l'hydroxyapatite synthétisée par voie précipitation.....	36 -
Figure V.3 : Spectres IR des biomatériaux élaborés.....	39 -
Figure V.4 : Presse hydraulique.....	41 -
Figure V.5 : Pastilles des composites HA-Extrait.....	41 -
Figure V.6 : Spectres IR des extraits bruts et composites.....	42 -
Figure VI.1 : Morphologie de la souche <i>Escherichia coli</i>	43 -
Figure VI.2 : Morphologie de la souche <i>Staphylococcus aureus</i>	44 -
Figure VI.3 : Morphologie de la souche <i>Candida albicans</i>	45 -
Figure VI.4 : Préparation et coulage du milieu en boîtes de Pétri.....	46 -
Figure VI.5 : Résultats d'aromatogramme des extraits romarin et ortie.....	49 -
Figure VI.6 : Résultats obtenus des composites CG-HA.....	52 -

Liste des Tableaux

Tableau II.1 : les principales catégories de biomatériaux et leurs exemples courants.....	12 -
Tableau V.1 : Récapitulatif des matériaux préparés.....	33 -
Tableau V.2 : La cristallinité et la taille des cristallites des différents biomatériaux.....	38 -
Tableau V.3 : paramètres et volume de maille.....	38 -
Tableau VI.1 : Diamètre des zones d'inhibition des différentes souches et extraits testés.....	48 -
Tableau VI.2 : Diamètre d'inhibition des différentes associations tétracyclines-extrait et CG-RMN contre la souche <i>S.aureus</i>	50 -
Tableau VI.3 : Diamètre d'inhibition des composites RMN-HA contre la souche <i>S.aureus</i>	51 -
Tableau VI.4 : Diamètre d'inhibition des composites CG-HA contre les trois souche.....	51 -

Liste des Abréviations

B-TCP : Bêta-tricalcium phosphate

CG : Clou de girofle

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DRX : Diffraction des Rayons X

EAG : Équivalent d'acide gallique

EQ : Équivalents de quercétine

GN : Gélose Nutritive

HA : Hydroxyapatite

HA-P-1000 : Hydroxyapatite synthétisée par voie précipitation calcinée à 1000 °C

HA-P-650 : Hydroxyapatite synthétisée par voie précipitation calcinée à 650 °C

HA-SG-1000 : Hydroxyapatite synthétisée par voie sol-gel calcinée à 1000 °C

HA-SG-650 : Hydroxyapatite synthétisée par voie sol-gel calcinée à 650 °C

HAc-1000 : Hydroxyapatite synthétisée par précipitation à partir d'un précurseur naturel préalablement calciné, puis calcinée à 1000 °C

HAc-650 : Hydroxyapatite synthétisée par précipitation à partir d'un précurseur naturel préalablement calciné, puis calcinée à 650 °C

HAn-Crue-1000 : Hydroxyapatite synthétisée par précipitation à partir d'un précurseur naturel non calciné (cru), puis calcinée à 650 °C

HAn-Crue-650 : Hydroxyapatite synthétisée par précipitation à partir d'un précurseur naturel non calciné (cru), puis calcinée à 650 °C

IR : Infrarouge

MH : Mueller Hinton

P : Précipitation

pH : Potentiel hydrogène

PLA : Acide polylactique

PLG : Poly(lactide-co-glycolide)

RMN : Romarin

SG : Sol-gel

UV : Ultra -violet

Introduction

Introduction

Ces dernières décennies, d'importants progrès ont été réalisés dans le développement des biomatériaux, notamment les biocéramiques utilisées pour la réparation et la reconstruction du squelette humain. Depuis les anciennes civilisations jusqu'à nos jours, l'être humain n'a cessé de rechercher et de concevoir des matériaux de plus en plus sophistiqués destinés à la substitution osseuse.

Le squelette adulte subit un renouvellement constant, estimé à environ 10 % par an. Ce processus de remodelage osseux est essentiel pour préserver les propriétés mécaniques de l'os et permettre la réparation des fractures [1]. Cependant, dans certaines conditions pathologiques ou à la suite de traumatismes sévères, cette capacité de régénération peut être altérée, nécessitant une intervention médicale pour restaurer la structure osseuse endommagée [2].

Parmi les affections ayant un impact négatif sur la santé osseuse, la parodontite se distingue comme une maladie inflammatoire chronique affectant les tissus de soutien des dents, notamment la gencive, le ligament parodontal et l'os alvéolaire [3]. Cette pathologie résulte d'une réponse immunitaire excessive à une infection microbienne, conduisant à une destruction progressive du parodonte [4]. Sans une prise en charge précoce et adaptée, elle peut entraîner une perte osseuse importante, une mobilité dentaire accrue et, à terme, la perte des dents, altérant significativement la qualité de vie des patients [3].

Dans ce contexte, la perte osseuse représente un enjeu majeur pour la préservation de la dentition et la restauration des fonctions masticatoires. Diverses stratégies de régénération osseuse guidée sont explorées afin de stimuler la formation d'un nouvel os et de limiter la progression de la pathologie. Parmi ces approches, les greffes osseuses constituent une solution largement employée pour restaurer le volume osseux perdu. Toutefois, elles présentent plusieurs limitations, notamment l'infection, la résorption partielle du greffon, les réactions allergiques ou encore un rejet [5]. De plus, leur coût élevé et leur disponibilité limitée rendent ces procédures parfois difficiles à mettre en œuvre à grande échelle.

Face à ces défis, l'utilisation de biomatériaux de substitution, et en particulier de l'hydroxyapatite synthétique, représente une alternative prometteuse pour la régénération osseuse. L'hydroxyapatite

est un phosphate de calcium cristallin constituant la principale phase minérale de l'os et des dents [6]. En raison de sa similarité chimique avec l'os naturel, elle présente d'excellentes propriétés de biocompatibilité et de bioactivité [7, 8]. Elle favorise l'adhésion et la prolifération des cellules osseuses, stimulant ainsi la croissance osseuse tout en minimisant les réactions inflammatoires indésirables. Contrairement aux greffes osseuses classiques, l'hydroxyapatite ne nécessite pas de prélèvement supplémentaire, réduisant ainsi le risque de complications chirurgicales et offrant une solution plus accessible. Sa synthèse peut être réalisée par diverses méthodes chimiques, physiques ou biologiques afin d'optimiser ses propriétés structurales et fonctionnelles [7].

Cependant, malgré ses nombreux avantages, plusieurs défis persistent dans l'élaboration de biomatériaux à base d'hydroxyapatite. L'un des principaux obstacles est sa faible résistance mécanique [9]. Par ailleurs, le contrôle de sa porosité et de sa structure est essentiel pour permettre une bonne vascularisation et une intégration optimale avec les tissus environnants [9]. Sa stabilité à long terme en milieu biologique et son taux de résorption doivent également être ajustés afin d'assurer une régénération osseuse efficace sans interférer avec le remodelage naturel du tissu osseux.

Dans cette optique, le biomatériau à base d'hydroxyapatite développé dans ce travail est conçu non seulement pour favoriser la régénération osseuse, mais également pour exercer un effet antimicrobien, réduisant ainsi le risque d'infections post-opératoires souvent associées aux implants et greffes. Ce projet vise ainsi à contribuer à l'amélioration des stratégies actuelles de régénération osseuse en explorant de nouvelles approches pour l'optimisation des biomatériaux à base d'hydroxyapatite. Ce mémoire est structuré en deux parties principales:

- ✓ La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique relative aux différents aspects de cette étude, à savoir : des généralités sur les extraits végétaux, les plantes utilisées, l'os, les biocéramiques, et plus particulièrement l'hydroxyapatite.
- ✓ La deuxième partie de ce mémoire porte sur la méthodologie expérimentale adoptée, les techniques de caractérisation utilisées, ainsi que l'interprétation des résultats obtenus, notamment ceux des tests antimicrobiens effectués.

Partie I

Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur l'os et l'anatomie de l'organe dentaire

La structure de l'os et des dents joue un rôle clé dans les pathologies affectant les tissus de soutien, notamment dans le contexte des maladies parodontales comme la parodontite, une affection inflammatoire chronique qui entraîne la destruction progressive des tissus de soutien de la dent, y compris l'os alvéolaire. Cette situation nécessite souvent des solutions de régénération osseuse faisant appel à des biomatériaux.

Ce chapitre présente les notions de base sur la structure osseuse et dentaire, nécessaires pour aborder les approches de réparation et de régénération osseuse.

I. 1. Généralités sur l'os

L'os est un organe constitué d'un tissu conjonctif dynamique, soumis à un renouvellement régulier appelé remodelage osseux. Il est formé d'une matrice extracellulaire minéralisée, composée principalement de phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite, ainsi que d'une phase organique constituée majoritairement du collagène de type I. Cette structure garantit, tout au long de la vie de l'organisme, deux fonctions principales : un rôle de support et de protection mécanique des organes, ainsi qu'un rôle biologique, en contribuant à la régulation du calcium et à la production des cellules sanguines (hématopoïèse) [10].

I.1.1. Classification des os

Les os du corps humain sont classés selon leur forme en plusieurs catégories (**Figure I.1**) [10] :

- ✓ Les os longs, comme le fémur, sont allongés et participent au mouvement ;
- ✓ Les os courts, tels que ceux du poignet, sont compacts et offrent stabilité ;
- ✓ Les os plats, comme ceux du crâne, protègent les organes ;
- ✓ Les os irréguliers, comme les vertèbres, ont des formes complexes ;
- ✓ Les os sésamoïdes, comme la rotule, sont intégrés dans les tendons pour améliorer la force et réduire les frottements.

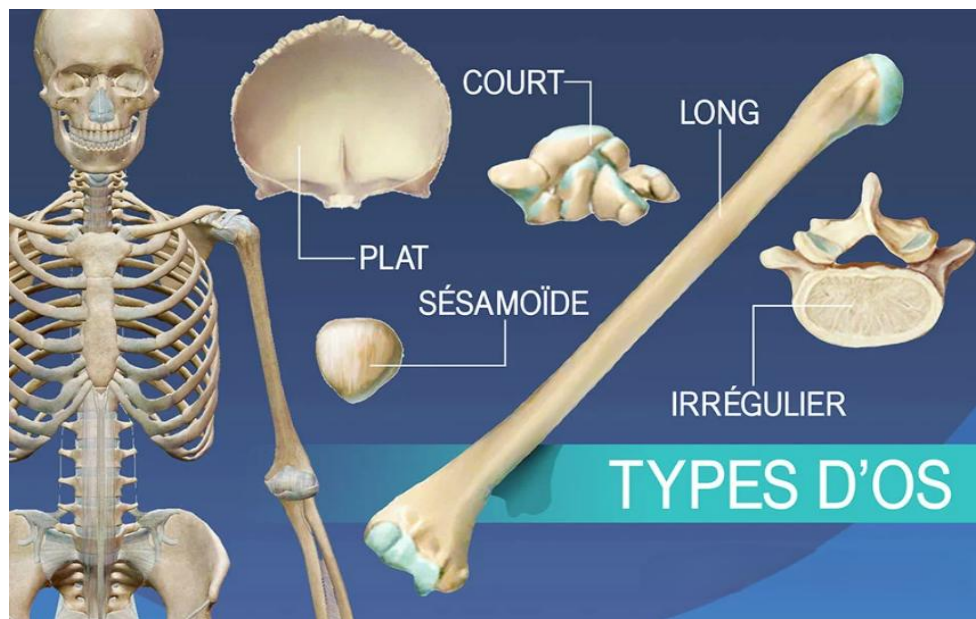


Figure I.1 : Classification des os selon leur forme [11].

I.1.2. Structure de l'os

L'os est organisé en deux structures principales :

- **L'os compact (cortical)** : Il constitue environ 80 % de la masse osseuse totale et forme la couche externe dense des os. Sa structure est particulièrement adaptée pour résister à de fortes contraintes mécaniques. L'os compact est organisé en lamelles disposées de manière régulière (**Figure.I.2**), formant des unités cylindriques concentriques appelées ostéons. Ces ostéons renferment en leur centre des canaux où circulent les vaisseaux sanguins, assurant ainsi la vascularisation et la nutrition du tissu osseux [12].
- **L'os spongieux (trabéculaire)** : Il se compose de fines structures en forme de mailles, au sein duquel se loge la moelle osseuse. Peu dense, il présente une résistance mécanique réduite. Il est systématiquement recouvert par une couche d'os compact plus rigide (**Figure I.2**). Grâce à sa richesse en cellules conjonctives adipeuses et en éléments hématopoïétiques, il participe activement aux échanges métaboliques et à la production des cellules sanguines [12].

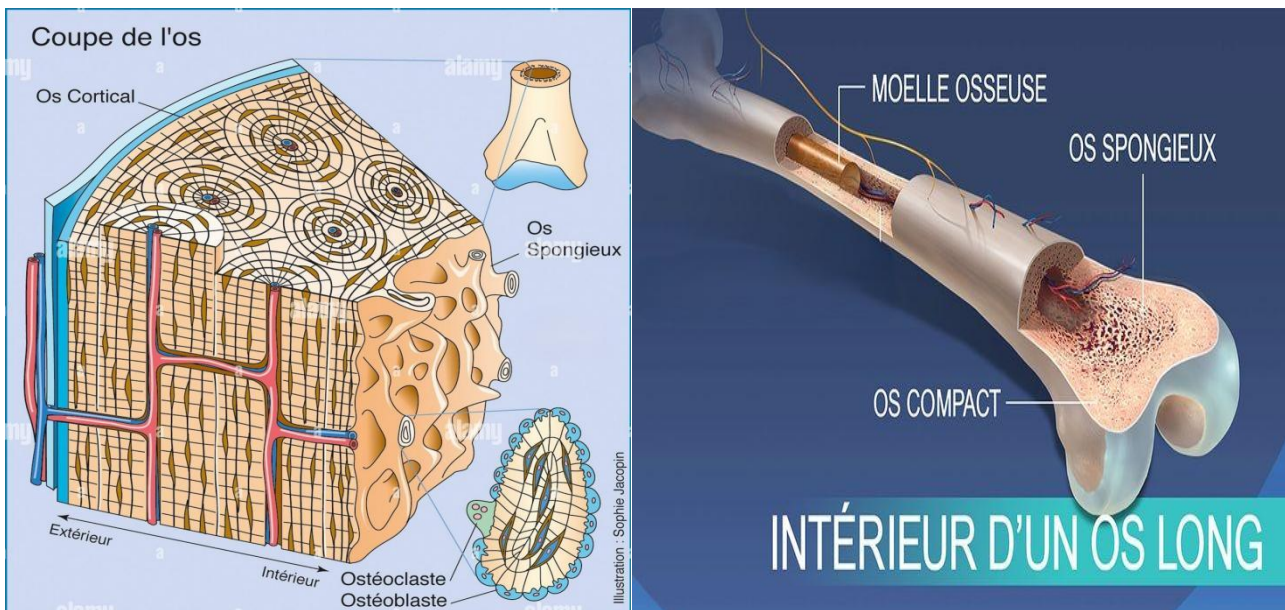


Figure I.2 : Structure de l'os naturel [13, 14].

I.1.3. Composition de l'os

Le tissu osseux est un matériau composite naturel, formé de deux phases différentes mais étroitement liées :

- **Phase minérale** (environ 70 % du poids sec) : Elle est majoritairement composée de cristaux d'hydroxyapatite biologique qui assurent la rigidité et la résistance mécanique de l'os [12].
- **Phase organique** (environ 30 % du poids sec) : Elle est principalement constituée du collagène de type I, qui confère à l'os sa flexibilité et sa résistance à la traction. On y trouve également des protéoglycanes et des protéines non collagéniques qui interviennent dans la minéralisation osseuse [12].

I.1.4. Le remodelage osseux

L'os naturel est un tissu hautement vascularisé, en perpétuel renouvellement tout au long de la vie. Ce processus concerne l'ensemble du squelette, y compris l'os alvéolaire, qui constitue le support osseux des dents. Le remodelage osseux est un mécanisme biochimique particulièrement complexe, faisant intervenir deux phases complémentaires : la résorption osseuse, assurée par les ostéoclastes, et la formation osseuse, réalisée par les ostéoblastes (**Figure I.3**). L'équilibre entre ces deux phénomènes est essentiel au maintien de l'intégrité du tissu osseux [15]. Un déséquilibre peut conduire à des affections telles que l'ostéoporose, l'ostéomalacie ou la dystrophie osseuse, avec des

répercussions importantes sur la santé générale. Dans le cas particulier de l'os alvéolaire, une telle altération peut entraîner une résorption progressive, comme c'est le cas dans les maladies parodontales, notamment la parodontite[16].



Figure I.3 : Remodelage osseux cellulaire [17].

I.2. La dent

Une dent est un organe anatomique dur et minéralisé, situé dans les alvéoles des mâchoires, qui assure principalement la mastication des aliments, participe à la phonation, et contribue à l'esthétique faciale. Elle est constituée de plusieurs tissus : l'émail, qui recouvre la couronne et représente la substance la plus dure du corps humain ; la dentine, qui forme la majeure partie de la dent et entoure la pulpe ; le cément, qui recouvre la racine ; et la pulpe dentaire, un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et des nerfs [18].

La dent est solidement ancrée dans l'os alvéolaire grâce au ligament parodontal, qui fait partie du parodonte, ensemble des tissus de soutien de la dent [18] (**Figure I.4**).

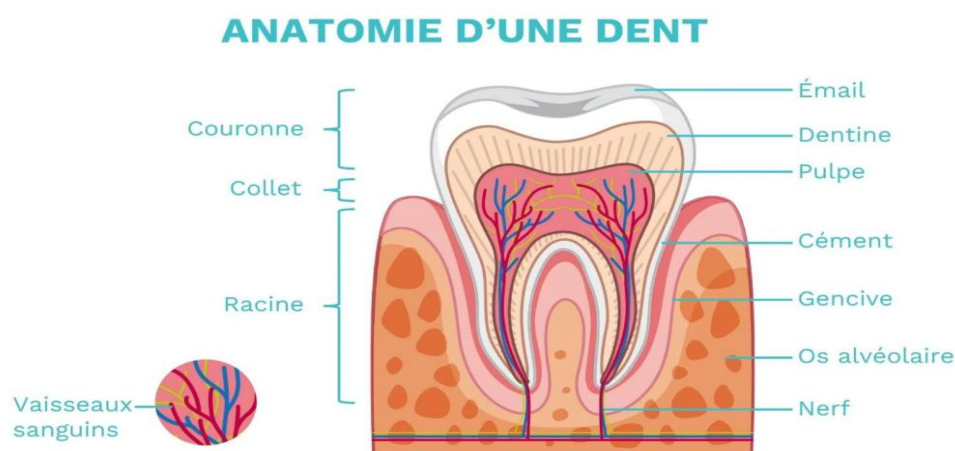


Figure I.4 : L'anatomie d'une dent [19].

I.3. La parodontite

La parodontite est une maladie inflammatoire chronique touchant les tissus de soutien des dents, marquée par la dégradation progressive du ligament parodontal et de l'os alvéolaire dans lequel les dents sont ancrées. Elle est causée principalement par une infection bactérienne notamment *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* [20], et débute souvent par une gingivite, une inflammation superficielle des gencives, qui peut s'étendre aux structures profondes [4].

Sur le plan clinique, les lésions parodontales peuvent se manifester par une rougeur et un gonflement variables des gencives. Dans les formes chroniques, la gencive peut sembler normale à l'examen, avec peu d'inflammation visible, une consistance ferme et un aspect tacheté. Néanmoins, Cette maladie peut progresser silencieusement, atteignant les tissus plus profonds et entraînant la résorption de l'os alvéolaire ainsi que la destruction du ligament parodontal. Cette détérioration des structures de soutien aboutit à terme à la mobilité, puis à la perte des dents (**Figure I.5**) [4]. Cette pathologie a également des implications systémiques, étant associée à des maladies cardiovasculaires, le diabète et d'autres troubles inflammatoires [21].



Figure I.5 : Étapes de développement de la maladie parodontale [22].

I.3.1 Étiologie et facteurs de risque

Parmi les principaux facteurs de risque figurent le tabagisme, le diabète non contrôlé, le stress, ainsi qu'une mauvaise hygiène bucco-dentaire, qui favorisent tous la progression des maladies parodontales [23].

En effet, les bactéries jouent un rôle central dans l'initiation et la progression de ces pathologies. Ces infections résultent principalement d'un déséquilibre du microbiote oral (dysbiose), caractérisé par la prolifération de bactéries anaérobies gram-négatives telles que *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*, regroupées dans ce qu'on appelle le complexe rouge [20]. Ces agents pathogènes sécrètent des enzymes, des toxines et divers facteurs de virulence qui provoquent la dégradation des tissus parodontaux, notamment l'os alvéolaire, en induisant une réponse inflammatoire exacerbée de l'hôte [24].

I.3.2 Traitement de la parodontite

Différentes approches thérapeutiques sont employées, qu'elles soient chirurgicales ou non, en fonction des besoins spécifiques du patient [25].

➤ *Traitements non-chirurgicaux*

Ce traitement comprend notamment un détartrage et un surfaçage radiculaire (**Figure I.6**), qui permettent d'éliminer le tartre et la plaque dentaire sous la gencive, afin de stopper la prolifération bactérienne [25]. Des antibiotiques peuvent être prescrits pour renforcer l'action désinfectante et limiter la progression de l'infection. L'amélioration de l'hygiène bucco-dentaire est également essentielle pour éviter la récurrence. En l'absence d'un entretien quotidien rigoureux, le traitement non chirurgical présente peu de bénéfices [25].



Figure I.6 : Avant et après un traitement non-chirurgical -surfaçage radiculaire- [26].

➤ *Traitements chirurgicaux*

Dans les cas les plus avancés des maladies parodontales (**Figure I.7**), un traitement chirurgical devient nécessaire. La chirurgie parodontale permet de nettoyer en profondeur les poches parodontales et d'éliminer les tissus infectés [27]. Des greffes osseuses ou gingivales peuvent être envisagées pour restaurer les tissus de soutien [28]. Dans certaines situations, des techniques plus avancées de régénération tissulaire guidée sont employées [29, 30], incluant l'utilisation de biomatériaux comme l'hydroxyapatite pour stimuler la reconstruction de l'os perdu [30, 31].



Figure I.7 : Cas d'une parodontite sévère [32].

I.3.3. Les greffes osseuses

Les greffes osseuses dentaires sont des interventions chirurgicales utilisées pour restaurer ou renforcer l'os de la mâchoire, notamment en vue de la pose d'un implant ou pour traiter une perte osseuse causée par une maladie parodontale [33]. Différents types de greffons peuvent être utilisés [33] :

- **Autogreffes** : Os prélevé sur le patient (crête iliaque, tibia, mandibule, menton, hanche).
- **Allogreffes** : Os provenant d'un donneur humain.
- **Xénogreffes** : Os d'origine animale (généralement bovin).
- **Substituts synthétiques** : Biomatériaux généralement à base d'hydroxyapatite ou de phosphates de calcium.

L'intervention consiste à insérer le greffon dans la zone déficiente, parfois avec une membrane de protection pour favoriser la régénération osseuse [34]. La cicatrisation prend généralement entre 4 et 9 mois avant une éventuelle pose d'implant [35]. Bien que cette procédure soit reconnue pour son efficacité, elle n'est pas dénuée de risques, notamment le besoin d'une seconde intervention chirurgicale dans le cas des greffes autogènes, ainsi que des risques de rejet immunologique, de résorption incontrôlée ou d'infections dans le cas des greffes allogéniques ou xénogéniques [5].

Face à ces complications potentielles et aux limites des greffons d'origine biologique, les recherches se tournent de plus en plus vers les substituts synthétiques, notamment les biomatériaux céramiques utilisés dans la réparation osseuse [36].

Chapitre II : Généralités sur les biomatériaux et l'hydroxyapatite

Les biomatériaux occupent une place essentielle dans le domaine de la médecine régénérative et des dispositifs médicaux, notamment dans la réparation osseuse. Parmi eux, l'hydroxyapatite, un phosphate de calcium naturellement présent dans les tissus durs comme l'os et les dents, suscite un intérêt croissant en raison de sa biocompatibilité et de sa similarité avec la phase minérale de l'os humain.

Ce chapitre présente ainsi des généralités liées aux biomatériaux, en mettant l'accent sur leurs classifications, propriétés et applications, avant de se concentrer plus spécifiquement sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques de l'hydroxyapatite.

II.1 Généralités sur les biomatériaux

II.1.1. Définition d'un biomatériau

Un biomatériau est une substance, naturelle ou synthétique, conçue pour interagir avec les systèmes biologiques dans un but médical, tel que le diagnostic, le traitement, la réparation, le remplacement ou l'amélioration d'un tissu, d'un organe ou d'une fonction corporelle [37]. Ils peuvent être conçus pour un usage temporaire (comme un implant résorbable) ou permanent (comme certaines prothèses articulaires) [38].

II.1.2. Types de biomatériaux

Les biomatériaux peuvent être classés selon plusieurs critères, tels que leur origine, leur usage ou leur composition chimique. Parmi ces classifications, celle basée sur la composition permet de distinguer les grandes familles de matériaux utilisés en ingénierie tissulaire et en médecine régénérative. Le tableau ci-dessous présente les principaux types de biomatériaux en fonction de leur composition [39].

Tableau II.1 : les principales catégories de biomatériaux et leurs exemples courants.

Catégorie	Exemples
Métalliques	Titane, alliages de cobalt-chrome
céramiques	Hydroxyapatite, alumine, bioverre.
Polymères	PLA, PEG, silicone médical.
Biomatériaux naturels	Collagène, chitosane, alginate, fibrine.
Composites	HA-PLA, HA-Collagène...

II.1.3. Caractéristiques idéales d'un substitut osseux :

Bioactivité: La bioactivité désigne la capacité d'un biomatériau à interagir avec le milieu biologique environnant, en induisant une réponse spécifique, telle que la formation d'une liaison avec l'os par l'intermédiaire d'une couche d'apatite [37].

Biocompatibilité: La biocompatibilité est la capacité d'un biomatériau à fonctionner dans un environnement biologique sans induire de réponse immunitaire négative ni de toxicité cellulaire [37].

Biodégradation: processus par lequel un biomatériau est décomposé ou résorbé par l'organisme, aboutissant à sa disparition totale ou partielle, sans effet toxique sur les tissus environnants [37].

Ostéoinduction: L'ostéoinduction est le processus par lequel le biomatériau stimule la différenciation des cellules progénitrices en ostéoblastes, favorisant ainsi la formation osseuse [40].

Ostéoconduction: L'ostéoconduction correspond à la capacité de biomatériau à servir de support physique pour la croissance des cellules osseuses et la formation d'un nouveau tissu osseux [40].

D'autres propriétés mécaniques, telles que la résistance et la rigidité, sont essentielles pour garantir la stabilité du biomatériau. Son coût de revient varie selon les matériaux et les procédés utilisés [37].

II.2. Les biocéramiques

Les biocéramiques sont des matériaux céramiques spécialement conçus pour interagir avec les tissus biologiques. Utilisés principalement en chirurgie orthopédique et dentaire, ils servent à remplacer, réparer ou soutenir les tissus osseux et dentaires grâce à leur biocompatibilité, leur stabilité chimique et leurs propriétés mécaniques adaptées [36]. Parmi les biocéramiques les plus couramment utilisées figurent l'hydroxyapatite, et le bioglass, qui ont démontré leur efficacité dans la régénération osseuse (**Figure II.1**) [41].



Figure II.1 : Exemples de biocéramiques (phosphates de calcium commercialisés) [42].

II.3. L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite (HA) est un phosphate de calcium cristallin de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, constituant principal de la phase minérale des os et des dents chez les vertébrés. Elle est largement utilisée en biomédecine pour ses propriétés bioactives, biocompatibles et ostéoconductrices, favorisant l'adhésion et la croissance des cellules osseuses [36, 43]. Grâce à sa similitude avec la structure minérale de l'os, elle est employée dans la réparation osseuse, le revêtement d'implants dentaires et orthopédiques, ainsi que dans la régénération tissulaire [44]. L'HA peut être synthétique ou d'origine naturelle et peut être utilisée sous différentes formes (poudre, granules, blocs) (**Figure II.2**) selon l'application clinique [36, 44].



Figure II.2 : Différentes formes commercialisées d'HA [45].

II.4. Structure cristalline de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite (HA), de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, possède une structure cristalline bien organisée de type hexagonal. Comme illustré sur la (**Figure II.3**), sa maille élémentaire est constituée de groupements phosphate (PO_4^{3-}), représentés par un atome de phosphore (gris) entouré de quatre atomes d'oxygène (rouge), d'ions calcium (Ca^{2+}) en vert, et d'ions hydroxyle (OH^-) en noir et rouge. Les ions calcium occupent plusieurs sites dans le réseau cristallin, stabilisant la structure, tandis que les groupements hydroxyle sont alignés le long de l'axe c du cristal. Cette organisation tridimensionnelle confère à l'hydroxyapatite ses propriétés biologiques remarquables, notamment sa biocompatibilité et sa bioactivité, qui en font un matériau de choix pour la réparation osseuse et dentaire [46].

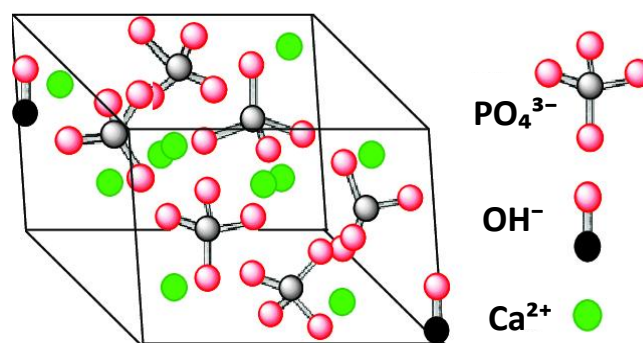


Figure II.3 : La structure cristalline d'hydroxyapatite [46].

II.5. Méthodes de synthèse de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite peut être synthétisée à l'aide de différentes techniques, telles que la précipitation, le sol-gel, la synthèse hydrothermale ou extraite de ressources naturelles riches en calcium, comme par exemple les arêtes de poisson, des coquillages, des coquilles d'œufs, des os de bovins ou les carapaces de crevettes [43, 47].

Nous allons nous limiter à présenter deux méthodes de synthèse de l'hydroxyapatite (HA): la synthèse par voie de précipitation et la synthèse par voie sol-gel.

II.5.1. Méthode de précipitation

En raison de sa simplicité, son faible coût et sa capacité à produire des nanoparticules aux propriétés contrôlables, la synthèse d'hydroxyapatite par voie de précipitation chimique en solution aqueuse est l'une des méthodes les plus répandues. Elle peut être réalisée à l'aide de divers réactifs contenant du calcium et du phosphate, par exemple l'hydroxyde de calcium ou le nitrate de calcium comme source de Ca^{2+} et l'acide phosphorique ou phosphate de sodium comme source de PO_4 [48]. Une procédure typique consiste à ajouter goutte à goutte un réactif à un autre sous agitation continue et douce, tout en maintenant le rapport atomique ($\text{Ca/P}=1.67$) [47]. Enfin, la suspension obtenue est lavée, séchée et calcinée si nécessaire [47].

II.5.2. Méthode de sol-gel

Contrairement à la voie de précipitation, la voie sol-gel permet un contrôle plus précis des propriétés structurales et morphologiques de l'hydroxyapatite à l'échelle nanométrique en produisant un gel plus pur évitant ainsi la formation d'une seconde phase qu'on retrouve souvent dans la méthode de précipitation [49]. Cette approche est basée sur des réactions d'hydrolyse et de polycondensation. Plusieurs précurseurs peuvent être utilisés, notamment le nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) comme source de calcium et le pentoxyde de phosphore (P_2O_5) comme une source de phosphate, produisant ainsi des gels amorphes qui se transforment en HA cristalline après calcination à 700°C [50].

Les développements récents dans ce domaine ont montré que l'optimisation des paramètres de synthèse (pH, température, nature des précurseurs) permet d'obtenir des matériaux aux caractéristiques sur mesure pour des applications spécifiques en ingénierie tissulaire et en libération contrôlée de principes actifs [48].

II.6. Mécanismes d'interaction de l'hydroxyapatite avec l'os

L'hydroxyapatite interagit avec l'os à travers des mécanismes complexes impliquant l'adhésion cellulaire, libération d'ions, biointégration, et remodelage osseux.

L'hydroxyapatite agit comme un support favorable à la migration, à l'adhésion, à la prolifération et à la différenciation des cellules osseuses (ostéoblastes), formant ainsi un véritable échafaudage (scaffold) pour la régénération osseuse à partir du tissu environnant [51]. Bien que l'HA ne soit pas intrinsèquement ostéoinductive, certaines formes nanostructurées ou enrichies par dopage peuvent induire la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes [52]. Dans le milieu biologique, l'hydroxyapatite subit une dissolution partielle, libérant des ions calcium (Ca^{2+}) et phosphate (PO_4^{3-}), qui stimulent la formation d'une couche de phosphate de calcium carbonaté à la surface de l'implant [53]. Cette couche favorise la biointégration, c'est-à-dire la liaison directe entre le matériau et l'os vivant (**Figure II. 4**) [53]. Une fois intégrée, l'HA est progressivement résorbée par les ostéoclastes et remplacée par de l'os néoformé, conformément au processus naturel de remodelage osseux [51, 53].

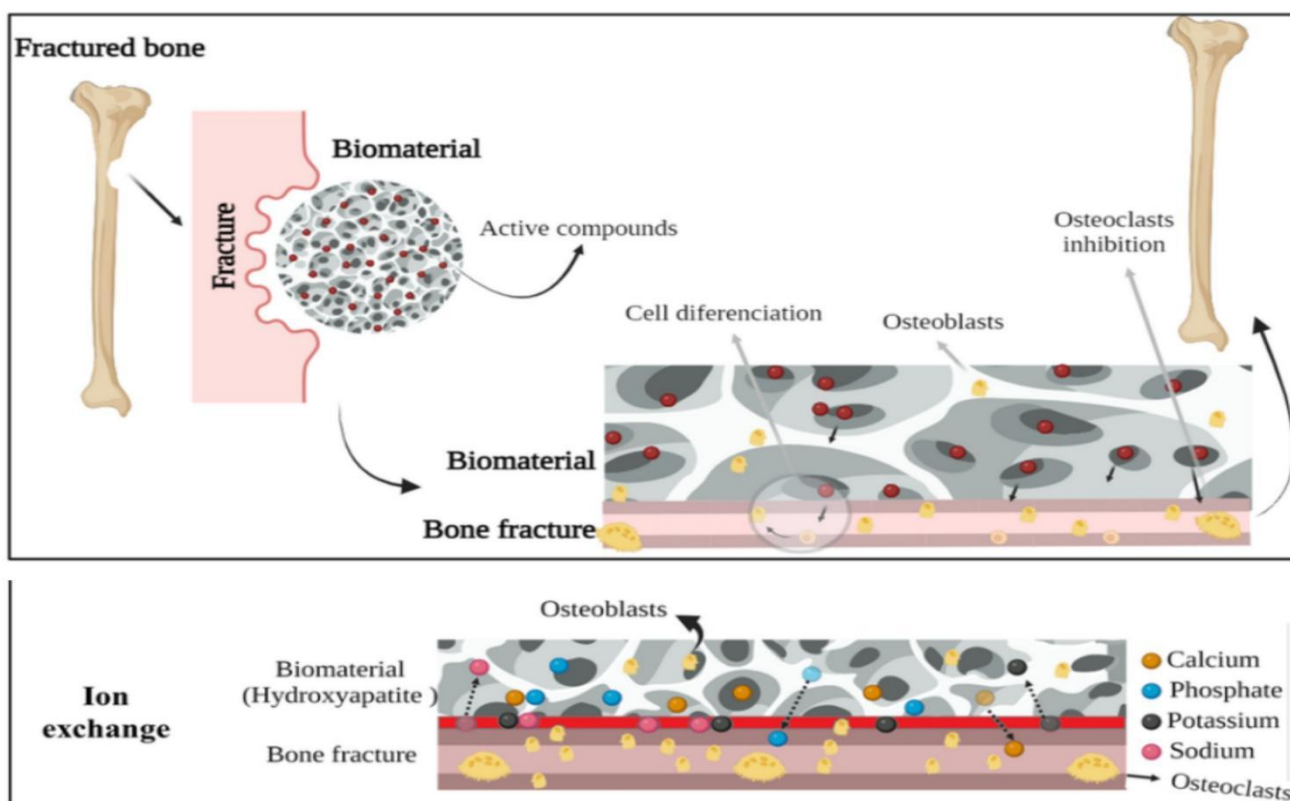


Figure II.4 : Processus de régénération osseuse déclenché par l'action d'un biomatériau (HA) [54].

Les propriétés d'interaction de l'HA avec l'os dépendent de [51]:

- ✓ La porosité (micropores pour l'échange ionique, macropores pour la colonisation cellulaire).
- ✓ La taille des particules (les nanoparticules sont plus bioactives).
- ✓ La cristallinité (une meilleure résorption à faible cristallinité).

Afin d'optimiser encore davantage les performances biologiques de l'hydroxyapatite, de nombreuses recherches explorent aujourd'hui son association avec des substances bioactives, notamment d'origine végétale. L'incorporation de principes actifs extraits de plantes médicinales dans la matrice d'hydroxyapatite permet non seulement de favoriser la formation et la régénération du tissu osseux, mais aussi de conférer au biomatériau des propriétés biologiques supplémentaires telles que des effets anti-inflammatoires, antibactériens ou antioxydants [55, 56].

C'est dans cette perspective que le chapitre suivant présentera les plantes médicinales utilisées dans ce travail, en mettant en évidence leurs principales propriétés biologiques.

Chapitre III : Généralités sur les plantes et leurs effets antimicrobiens

Dans le contexte actuel de résistance croissante aux antibiotiques, les plantes médicinales suscitent un intérêt renouvelé en tant que sources potentielles de composés antimicrobiens naturels. Parmi elles: le romarin , le clou de girofle et l'ortie sont reconnus pour leurs propriétés biologiques variées, notamment leur activité antimicrobienne. Riches en polyphénols, flavonoïdes, huiles essentielles et autres métabolites secondaires, ces plantes offrent une alternative prometteuse aux agents antimicrobiens synthétiques.

Ce chapitre a pour objectif de présenter les principales caractéristiques de ces trois plantes, leurs constituants bioactifs majeurs, ainsi que les mécanismes connus ou supposés par lesquels elles exercent leurs effets antimicrobiens contre divers agents pathogènes.

III.1. Généralités sur les plantes médicinales

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales occupent une place centrale dans les pratiques de soin à travers le monde. Riches en composés bioactifs, elles sont utilisées pour traiter, soulager ou prévenir de nombreuses affections humaines. Selon l'Organisation mondiale de la santé, près de 80 % de la population mondiale fait encore appel à la médecine traditionnelle, principalement à base de plantes, pour ses soins de santé primaires [57]. Plusieurs médicaments modernes tirent d'ailleurs leur origine de substances végétales, à l'image de la morphine extraite du pavot (*Papaver somniferum*) ou de l'acide acétylsalicylique (aspirine) dérivé du saule blanc (*Salix alba*) [58].

Au-delà de leur importance historique, les plantes médicinales suscitent aujourd'hui un regain d'intérêt, en particulier pour leur potentiel antimicrobien, face à l'émergence croissante de résistances aux antibiotiques classiques. De nombreuses études ont mis en évidence l'efficacité de certains extraits végétaux contre divers agents pathogènes bactériens, fongiques ou viraux [59]. Par ailleurs, leur valorisation constitue un enjeu économique important dans les régions rurales et une opportunité de préserver la biodiversité végétale à travers une exploitation raisonnée [60].

Dans cette perspective, certaines plantes se démarquent par la synergie de leurs propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes, particulièrement intéressantes dans le

domaine de la santé bucco-dentaire [61]. Ces propriétés thérapeutiques ouvrent des pistes pour l'utilisation de leurs extraits, notamment en association avec des biomatériaux tels que l'hydroxyapatite, afin de prévenir les infections post-opératoires dans le cadre du traitement de la parodontite [62]. Dans ce mémoire, nous nous sommes particulièrement intéressés à trois plantes : le romarin, l'ortie et le clou de girofle.

III.2. Le Romarin

III.2.1. Description botanique

Le romarin, connu scientifiquement sous le nom de *Salvia rosmarinus* (anciennement *Rosmarinus officinalis* L.), est une plante aromatique appartenant à la famille des Lamiacées, originaire du bassin méditerranéen [63].

Cet arbuste, qui peut atteindre jusqu'à 2 mètres de hauteur, se caractérise par des feuilles persistantes, étroites et coriaces, semblables à des aiguilles, vert foncé sur le dessus et blanchâtres au revers (**Figure III.1**). Il produit des fleurs généralement bleu pâle à violettes, regroupées en épis, qui apparaissent principalement au printemps et en été [63].



Figure III.1 : *Rosmarinus officinalis*-L [76].

III.2.2. Principaux composés bioactifs et leurs activité biologique

Le romarin renferme plusieurs composés bioactifs aux propriétés médicinales remarquables. Parmi eux, on cite :

- ***l'acide rosmarinique*** : un acide phénolique, possède une puissante activité antioxydante et antibactérienne, notamment contre les bactéries Gram-positives comme *Staphylococcus aureus*, en perturbant la perméabilité membranaire [64].

- **L'acide carnosique** : un diterpène phénolique, agit également comme un antioxydant majeur et exerce une activité antibactérienne notable contre *Escherichia coli* et *Salmonella*, en altérant les membranes cellulaires et en inhibant la synthèse des protéines [64, 65].
- **Les huiles essentielles du romarin** : telles que le cinéole, le camphre et le bornéol, contribuent également à ses effets antimicrobiens. Le cinéole, en plus de ses propriétés expectorantes, perturbe la membrane bactérienne et interfère avec la respiration cellulaire [66], tandis que le camphre provoque des dommages membranaires et inhibe des enzymes essentielles, notamment chez *Pseudomonas aeruginosa* [66]. Le bornéol, quant à lui, inhibe la croissance et l'adhésion de certaines bactéries et levures, telles que *Candida albicans* [66].
- **Les flavonoïdes** : connus pour leur activité antioxydante et anti-inflammatoire, exercent aussi une action antibactérienne en interférant avec la synthèse des protéines et des acides nucléiques bactériens [64].
- **Les tanins** : en raison de leurs propriétés astringentes, ont un effet antimicrobien en précipitant les protéines des membranes bactériennes et en inhibant l'activité enzymatique [67].

Ainsi, l'ensemble de ces composés confère au romarin un large spectre d'activités : antibactérienne, antioxydante, anti-inflammatoire et antifongique.

III.2.3. Utilisation du romarin

Traditionnellement, le romarin est utilisé pour traiter divers troubles : il est reconnu pour faciliter la digestion, stimuler la fonction hépatique, soulager les douleurs musculaires, les coliques néphrétiques et les troubles menstruels [68]. De plus, grâce à ses propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires, le romarin contribue à la santé bucco-dentaire en aidant à prévenir les infections gingivales et la formation de plaque dentaire [69]. Apprécié en aromathérapie pour ses effets tonifiants sur le système nerveux, il trouve aussi sa place comme agent aromatisant dans l'industrie agroalimentaire et comme ingrédient aux propriétés conservatrices et apaisantes dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques [70].

III.3. L'Ortie

III.3.1. Description botanique

Urtica dioica L. (Figure III.2), de la famille des Urticacées, est une plante herbacée vivace atteignant 50 à 150 cm de hauteur, communément appelée ortie. Elle est largement répandue en Europe, en Asie et en Amérique du Nord. Souvent négligée en raison de son caractère urticant, est en réalité une plante médicinale d'un grand intérêt, utilisée depuis l'Antiquité pour traiter une variété de troubles inflammatoires, métaboliques et dermatologiques [71, 72].



Figure III.2 : *Urtica dioica* L [77].

III.3.2. Principaux composés bioactifs et leurs activité biologique

Sur le plan phytochimique, l'ortie est une source précieuse de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins, ainsi que des minéraux essentiels comme le fer, le calcium et le magnésium [73]. Ces composants lui confèrent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et diurétiques bien documentées [72].

III.3.3. Utilisation de l'ortie

Par voie orale ou en application locale, *Urtica dioica* est utilisée pour soulager les douleurs articulaires, favoriser la diurèse, améliorer l'état de la peau et renforcer l'équilibre métabolique, notamment dans le cadre de l'hyperplasie bénigne de la prostate et du diabète de type 2 [74, 75].

Bien que les études spécifiques sur l'utilisation de l'ortie pour la santé bucco-dentaire soient limitées, les recherches existantes sur ses propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antioxydantes suggèrent un potentiel thérapeutique pour le traitement et la prévention des affections buccales telles que la gingivite et les infections des gencives [76].

III.4. Le clou de girofle

III.4.1. Description botanique

Le clou de girofle, issu des boutons floraux séchés de *Syzygium aromaticum* (**Figure III.3**), se présente sous forme de petits clous brun foncé, mesurant environ un centimètre de long, est une épice médicinale bien connue, appartenant à la famille des Myrtaceae. Originaire des îles Moluques en Indonésie, il est aujourd'hui cultivé dans plusieurs régions tropicales, notamment à Madagascar, au Sri Lanka et en Tanzanie [77]. Utilisé depuis l'Antiquité pour ses propriétés aromatiques et thérapeutiques, le clou de girofle occupe une place centrale en phytothérapie, en particulier pour le traitement des douleurs dentaires et des affections bucco-dentaires [78, 79].



Figure III.3 : *Syzygium aromaticum* [78].

III.4.2. Principaux composés bioactifs et leurs activité biologique

Sur le plan phytochimique, le principal constituant du clou de girofle est l'eugénol, représentant jusqu'à 90 % de son huile essentielle. Ce composé phénolique est largement reconnu pour ses propriétés antiseptiques, analgésiques, anti-inflammatoires et antioxydantes [80]. Grâce à son activité antimicrobienne, l'eugénol est efficace contre plusieurs agents pathogènes oraux [79].

III.4.3. Utilisation du clou de girofle

En médecine dentaire, le clou de girofle est traditionnellement utilisé pour soulager les douleurs dentaires, prévenir les infections et favoriser la cicatrisation gingivale. Il est intégré dans la formulation de nombreux produits comme les gels, les bains de bouche ou encore certains ciments dentaires, en raison de son effet anesthésiant local et de sa bonne tolérance [77, 78].

III.5. Méthodes d'extraction végétale

Les méthodes d'extraction végétale désignent l'ensemble des techniques permettant d'isoler les composés bioactifs présents dans les plantes. Elles reposent sur l'utilisation de solvants (tels que l'eau ou l'éthanol), de la chaleur ou de la pression, afin d'extraire les principes actifs à partir des différentes parties végétales (feuilles, racines, fleurs, etc.). Ces méthodes se répartissent en deux grandes catégories : les méthodes classiques et les méthodes modernes, (comme illustré dans la **Figure III.4**). Elles reposent principalement sur des procédés solide-liquide ou liquide-liquide, selon la nature de la technique employée [81].

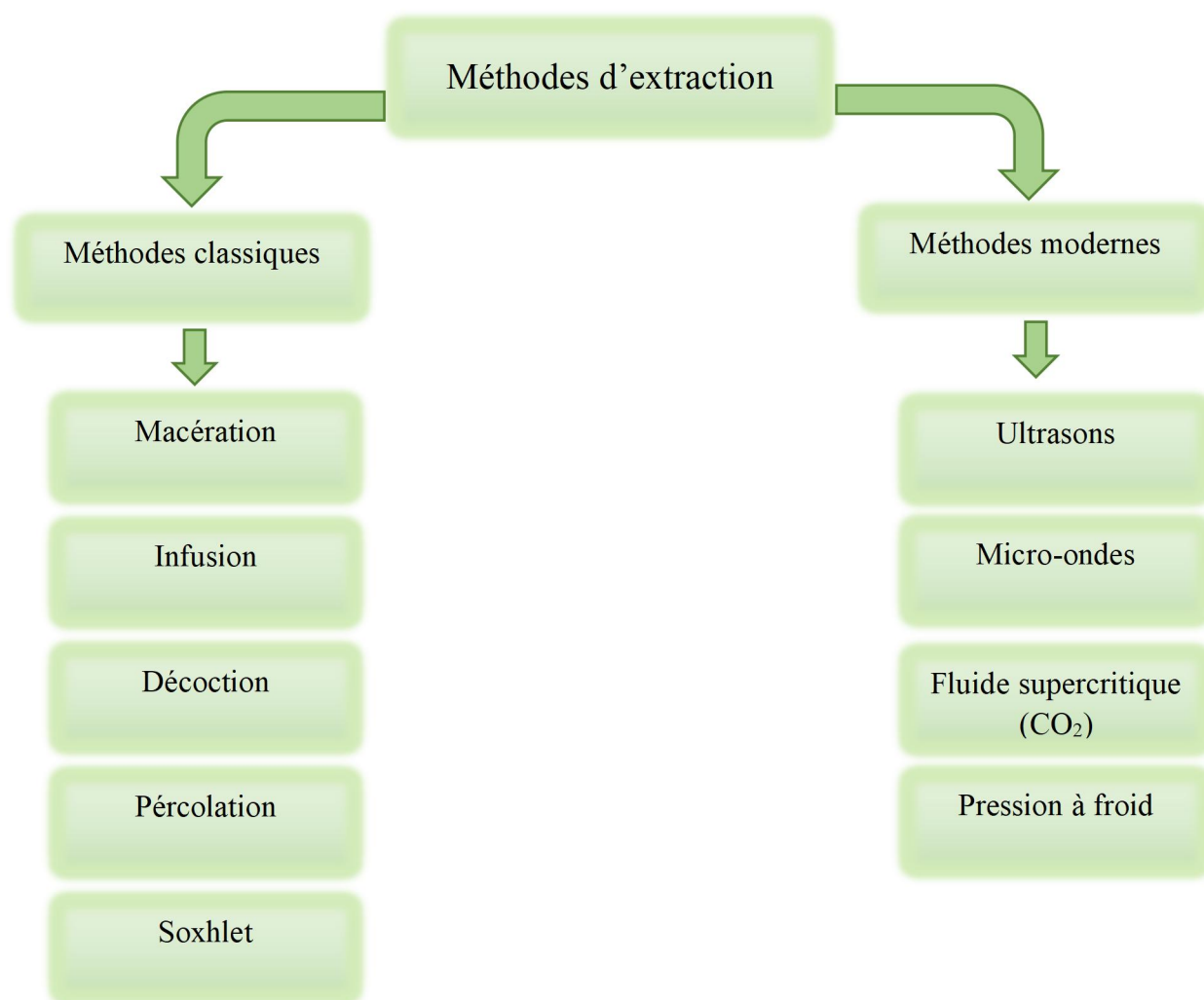


Figure III.4 : Différentes méthodes d'extraction végétale

Partie II

Expérimentale

Chapitre IV : Préparation et caractérisation des extraits de plantes

Dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne et de caractériser les composés phytochimiques des extraits de trois plantes : le romarin, l'ortie et le clou de girofle, une extraction par macération a été réalisée à partir d'une quantité définie de poudre de chaque plante, en utilisant l'éthanol absolu comme solvant. Ce chapitre décrit ainsi le protocole expérimental mis en œuvre pour obtenir les extraits de chaque plante. Ces derniers ont ensuite été soumis à une analyse par spectrophotométrie UV-Visible afin de déterminer leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes, principaux responsables de leurs propriétés biologiques.

IV.1. Préparation des extraits végétaux

IV.1.1. Récolte et préparation des plantes

Le clou de girofle a été acquis sous forme commercialisée, tandis que le romarin et l'ortie ont été récoltés au cours du mois de février, respectivement dans les régions de Sidi Ahmed et de Oued Ghir, situées dans la wilaya de Béjaïa (**Figure IV.1**).

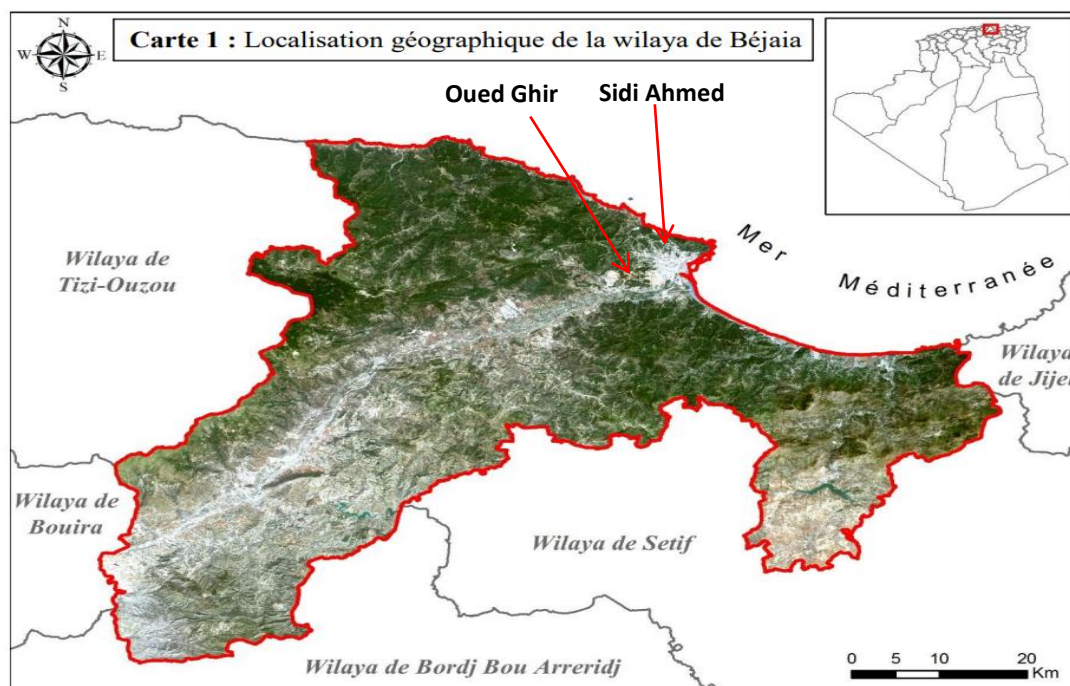


Figure IV.1: Carte géographique représentative de la région d'étude [82].

Dans le cadre de ce travail, seules les feuilles de romarin et d'ortie ont été utilisées, ainsi que les boutons floraux du clou de girofle.

Les feuilles des plantes et les boutons floraux du clou de girofle ont d'abord été soigneusement lavés à plusieurs reprises afin d'éliminer les impuretés (**Figure IV.2**). Ils ont ensuite été séchés dans une étuve à 40 °C pendant 48 heures. Cette étape visait à réduire la teneur en eau des feuilles et des boutons floraux, afin de prévenir les réactions d'altération, d'inhiber la croissance microbienne et de faciliter l'étape de broyage. Une fois séchés, les échantillons ont été finement broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène.



L'Ortie



Le Clou de girofle



Le Romarin

Figure IV.2: Les trois plantes utilisées dans cette étude.

IV.1.2. Extraction

Un gramme de chaque poudre préparée est introduit dans 20 mL d'éthanol absolu, d'une pureté de 99,89 % et d'une densité de 0,79 kg/L. Le mélange a été soumis à une agitation pendant 3 heures, avant d'être laissé en macération durant 48 heures (**Figure IV.2**).

Après cette période d'extraction, les mélanges ont été filtrés à l'aide de papier filtre afin de récupérer les extraits. Ces derniers ont ensuite été transférés dans des boîtes de Pétri, puis séchés à nouveau dans l'étuve à 40 °C. L'extrait sec obtenu a été repris dans un volume de 10 mL d'éthanol absolu. Chaque extrait a été conservé dans une fiole recouverte de papier aluminium pour le protéger de la lumière, puis stocké à 4 °C jusqu'à utilisation.

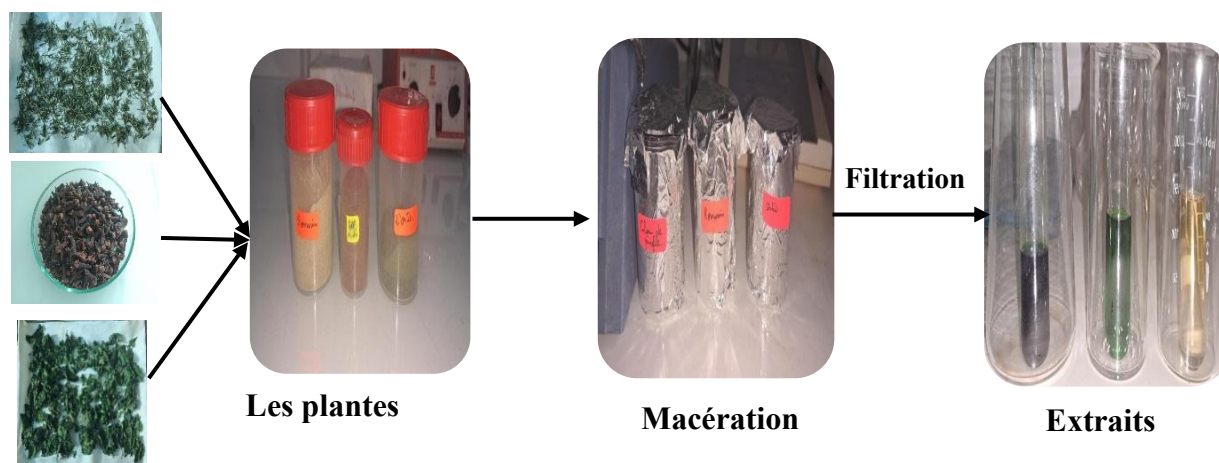


Figure IV.3: Préparation des extraits végétaux.

IV.2. Caractérisation des extraits

IV.2.1. Détermination du rendement d'extraction

La détermination du rendement d'extraction consiste à évaluer la quantité de matière extraite à partir d'une plante donnée. Elle se base sur le calcul du rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu et la masse initiale de matière végétale utilisée, généralement exprimé en pourcentage (**Équation IV.1**). Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre la masse de la boîte de pétri contenant l'extrait après évaporation du solvant, et celle de la boîte vide avant évaporation [83]. Ce paramètre permet ainsi d'estimer l'efficacité de l'extraction et de comparer les performances de différentes méthodes ou solvants utilisés.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait sec}}{\text{masse de la matière végétale}} \times 100 \quad (\text{IV.1})$$

Résultats et interprétations

La **Figure IV.4** présente les rendements d'extraction obtenus par macération éthanolique, en fonction de la nature chimique des composés présents dans chaque plante.

Dans cette étude, le romarin a présenté le rendement le plus élevé, atteignant 17,42 %, ce qui suggère une forte proportion de composés solubles dans l'éthanol absolu. Ce résultat dépasse les valeurs généralement consultée, où des rendements de l'ordre de 6 à 10 % ont été obtenus avec de l'éthanol à 70 %, comme l'ont révélé **Swari et al.** et **Fadel et al.** [84, 85]. Le clou de girofle a affiché un rendement de 14,81 %, en accord avec les données antérieures qui apportent des rendements compris entre 15 et 20 %, en fonction de la méthode d'extraction et de la polarité du solvant utilisé, comme indiqué par **Berkani et al.** et **Rezoug et Bourihane** [86, 87]. En revanche, l'ortie a présenté le rendement le plus faible (5,71 %), probablement en raison de la nature majoritairement hydrophile de ses composés bioactifs. Des études antérieures, telles que celles de **Derbal et al.** et **Soufia et Dib**, ont rapporté des rendements variant entre 8 et 15 % pour cette plante lorsqu'un solvant hydro-alcoolique est utilisé [88, 89]. L'emploi d'éthanol absolu dans notre étude pourrait donc avoir limité l'extraction des composés les plus polaires, ce qui expliquerait les différences observées.

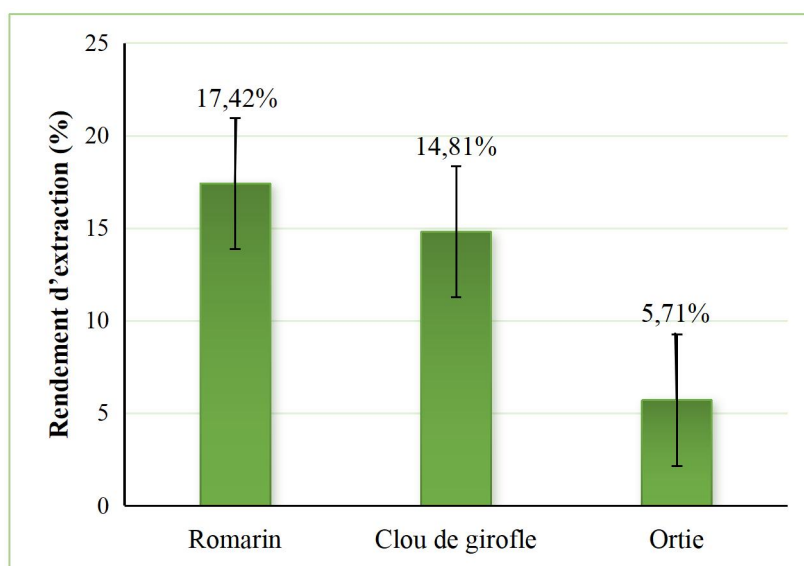


Figure IV.4: Rendement d'extraction des trois plantes.

IV.2.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par la méthode décrite par **Raju et al.** [90], avec quelques modifications. Ainsi, 0,5 mL de chaque extrait de plante a été introduit dans une fiole jaugée de 25 mL, suivi de l'ajout de 2,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 %. Après homogénéisation, 2 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a ensuite été incubé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SPECORD 210 PLUS) [90], et les concentrations en polyphénols totaux ont été exprimées en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

Résultats et interprétations

La quantification de la teneur en composés phénoliques dans les trois extraits a été réalisée à l'aide de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique présentée ci-dessous (**Figure IV.5**).

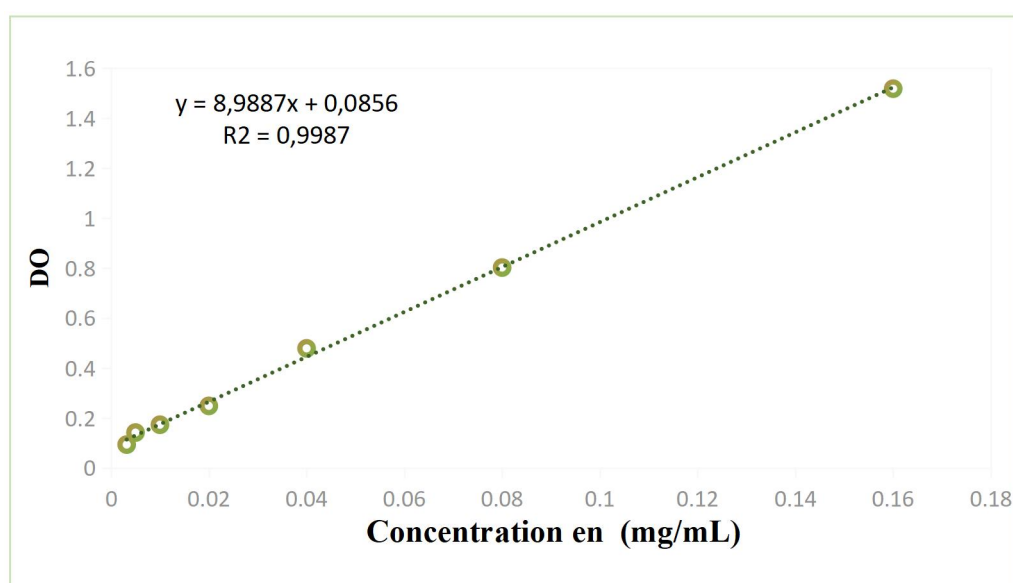


Figure IV.5: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Les résultats obtenus montrent que le clou de girofle présente la teneur en polyphénols la plus élevée (62 mg EAG/g MS), suivi du romarin (10,62 mg EAG/g MS) et de l'ortie (4,41 mg EAG/g MS) (**Figure IV.6**).

La valeur mesurée pour le clou de girofle est nettement supérieure avec celles rapportées dans la littérature, notamment par **Indiarto et al.** avec 38,20 mg EAG/g MS, et **Aidaoui et al.** avec 15,174 mg EAG/g MS [91, 92]. En revanche, la teneur en polyphénols du romarin reste inférieure à

celles indiquées dans d'autres travaux, qui varient de 12,87 mg EAG/g MS (**Beddek et al.**) à $58,1 \pm 0,9$ mg EAG/g MS (**Tsai et al.**) [93, 94]. Quant à l'ortie, la teneur obtenue dans ce travail est comparable à celles rapportées par **Meryem et al.** et **Tahar et al.**, avec des valeurs respectives de $4,57 \pm 0,14$ et $4,72 \pm 0,91$ mg EAG/g MS [95, 96].

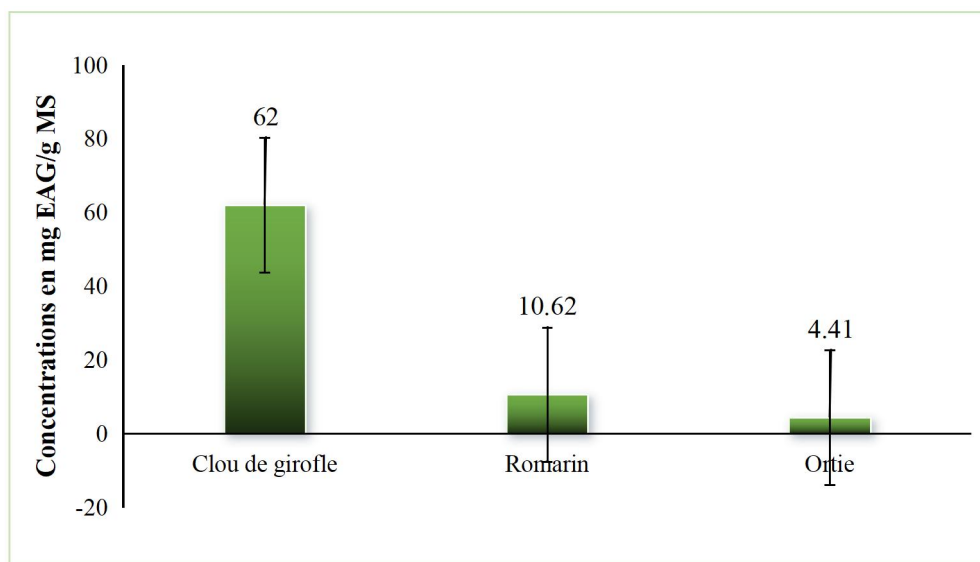


Figure IV.6 : Teneur en polyphénols totaux des trois extraits.

IV.2.3. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé à l'aide du chlorure d'aluminium (AlCl_3) comme réactif complexant, selon la méthode décrite par **Khettaf et al.** [97] avec quelques ajustements. Pour cela, un volume de 1 mL de solution d' AlCl_3 à 2% a été ajouté à 1 mL d'extrait de chaque plante. Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière, puis l'absorbance a été mesurée à 430 nm. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

Résultats et interprétations

L'analyse quantitative des flavonoïdes a été réalisée à l'aide de la courbe d'étalonnage présentée ci-dessous établie par la quercétine comme standard (**Figure IV.7**).

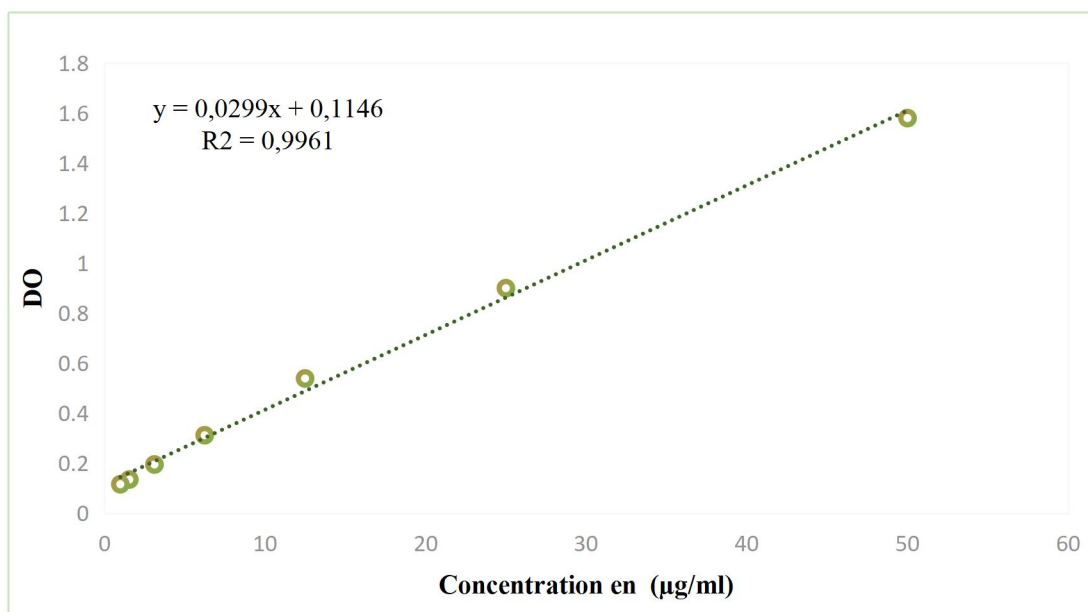


Figure IV.7 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Les résultats montrent que, l'ortie présente la teneur la plus élevée (89,43 mg EQ/g MS), devant le romarin (28,56 mg EQ/g MS) et le clou de girofle (8,49 mg EQ/g MS) (**Figure IV.8**).

La teneur obtenue pour l'ortie dépasse largement celles rapportées dans la littérature, notamment celles obtenues par **Soufia et al.** [89] (56 mg EQ/g MS) et **Mekhibi et al.** [98] (4,31 mg EQ/g MS). Le romarin, quant à lui, affiche une teneur comparable à celle rapportée par **Soltanabad et al.** [99] (24,64 mg EQ/g MS), mais bien inférieure à d'autres valeurs telles que celle obtenue par **Tsai et al.** [93] ($60,7 \pm 1,1$ mg EQ/g MS). À l'inverse, la teneur en flavonoïdes du clou de girofle est supérieure à certaines données bibliographiques, allant de 0,503 mg EQ/g MS (**Aidaoui et al.**) à $7,25 \pm 1,18$ mg EQ/g MS (**Berkani et al.**) [86, 92].

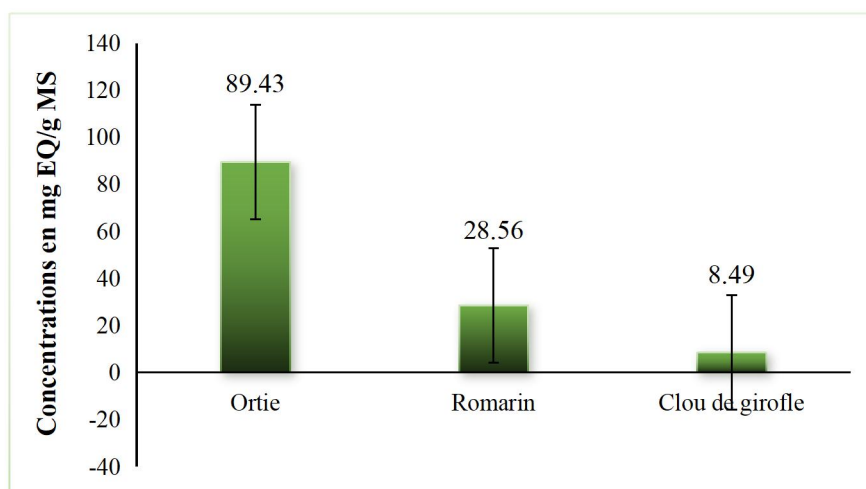


Figure IV.8 : Teneur en flavonoïdes des trois extraits.

Ces variations observées entre les résultats expérimentaux obtenus dans cette étude et ceux de la littérature peuvent s'expliquer par divers facteurs, tels que la nature des solvants utilisés, les méthodes d'extraction, la partie végétale analysée ou encore les conditions de culture.

Ainsi, cette étude confirme la richesse du clou de girofle en polyphénols, tout en mettant en évidence une teneur notablement élevée en flavonoïdes pour l'ortie.

Chapitre V : Préparation et caractérisation des matrices apatitiques et des composites avec extraits végétaux

Ce chapitre a pour but de présenter les modes opératoires utilisés pour préparer les différentes poudres d'hydroxyapatite utilisées dans cette étude.

Les biomatériaux ainsi obtenus ont été caractérisés par différentes techniques de caractérisation à savoir : la diffraction de rayons X (DRX) et la spectroscopie infrarouge IR.

Dans un second temps, des composites ont été élaborés en combinant l'hydroxyapatite avec les extraits végétaux obtenus précédemment. Ces systèmes hybrides ont également été caractérisés afin d'évaluer les effets de l'incorporation des extraits préparés sur les propriétés des matrices apatitiques.

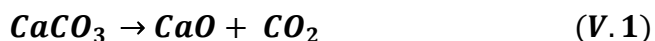
V.1. Synthèse de l'hydroxyapatite par voie sol-gel

Des quantités précises de nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) et pentoxyde de phosphore (P_2O_5 , Sigma-Aldrich), en respectant le rapport atomique Ca/P=1.67, sont dissoutes séparément dans 100 mL d'éthanol absolu. Les deux solutions ont ensuite été mélangées, goutte à goutte, puis laissé au repos (vieillissement) pendant 24 heures à température ambiante. Enfin, le gel obtenu, préalablement séché à 100°C, est calciné à deux températures différentes (650 et 1000°C) [100].

V.2. Synthèse des poudres d'hydroxyapatite par la méthode de précipitation

L'utilisation de la coquille d'œuf comme source de calcium constitue une alternative écologique et économique intéressante pour la synthèse de l'hydroxyapatite. Elle permet de valoriser un déchet alimentaire tout en offrant un précurseur naturel.

Dans cette synthèse, trois sources de calcium ont été utilisées : le carbonate de calcium commercial (CaCO_3 , Sigma-Aldrich), la coquille d'œuf crue et la coquille d'œuf calcinée à 700 °C. Étant donné que la coquille d'œuf est majoritairement composée de carbonate de calcium. Lorsque cette dernière est calcinée à 700 °C, elle subit une décomposition thermique selon cette réaction (**Équation V.1**) :



Dans ce protocole, 0.25 mol de carbonate de calcium (CaCO_3), ont été introduites dans un réacteur contenant 40 mL d'eau distillée, sous agitation constante. Une fois la suspension homogénéisée et le pH maintenu constant (pH=9), 4 mL d'acide phosphorique (H_3PO_4 , Sigma-Aldrich) ont été ajoutés goutte à goutte. Le mélange a ensuite été maintenu sous agitation pendant 24 heures à température ambiante, puis soumis à une étape de vieillissement de 24 heures supplémentaires.

La suspension obtenue a été séchée à 40 °C puis calcinées dans un four à moufle à deux températures différentes, 650 °C et 1000 °C, pendant 2 heures chacune [101].

Le tableau V.1, ci-dessous présente un récapitulatif des matériaux obtenus.

Tableau V.1 : Récapitulatif des matériaux préparés

Nom du matériau	Méthode de synthèse	Source de calcium	Température de calcination (°C)
HA-SG-650	Sol-gel	Nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	650
HA-SG-1000	Sol-gel	Nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1000
HA-P-650	Précipitation	Carbonate de calcium (CaCO_3)	650
HA-P-1000	Précipitation	Carbonate de calcium (CaCO_3)	1000
HAn-Crue-650	Précipitation	Coquille d'œuf crue	650
HAn-Crue-1000	Précipitation	Coquille d'œuf crue	1000
HAc-650	Précipitation	Coquille d'œuf calcinée à 700 °C	650
HAc-1000	Précipitation	Coquille d'œuf calcinée à 700 °C	1000

V.3. Techniques de caractérisation utilisées :

V.3.1. Analyse de diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) est une méthode d'analyse physico-chimique permettant d'étudier la structure cristalline des matériaux. Elle repose sur la diffraction d'un faisceau de rayons X par les plans atomiques d'un cristal [102].

a) Conditions d'analyse

Cette analyse est effectuée en utilisant un diffractomètre de type PHILIPS X pert prof, analytical, system MPD, dans une zone de balayage 2θ située entre 10 et 80° avec un pas de 0.02° et une longueur d'onde $\lambda=1,54 \text{ \AA}$.

b) Résultats et interprétations

Les résultats d'analyse DRX des trois poudres synthétisées par sol-gel et précipitation sont présentées respectivement dans les figures V.1 et V.2. Les diffractogrammes des poudres **HA-SG-650** et **HA-SG-1000** (Figure V.1) présentent des pics de diffraction situés principalement à 25,98, 31,86, 32,31, 33,04, 34,20 et 39,94°, correspondant respectivement aux plans de Miller (002), (211), (112), (300) et (202) de la structure hexagonale de l'hydroxyapatite appartenant au groupe spatial P63/M (Fiche ICDD/JCPDS n° 09- 0432). Nous notons également l'apparition d'un pic à $2\theta=29.51^\circ$, assigné au plan (008) de la structure tétragonale du pyrophosphate de calcium (fiche ICOD 00-009-0346). Enfin, deux pics de faible intensité, détectés à 31,15° et 37,4° sont attribués respectivement à des phases secondaires, la β -TCP et l'oxyde de calcium. Ces dernières, proviennent probablement de la décomposition thermique de l'hydroxyapatite en β -TCP et de la décomposition des résidus de nitrate de calcium n'ayant pas réagi [100].

D'autres part, en augmentant la température de calcination à 1000°C, on constate que les pics de diffraction deviennent plus fins et plus intenses, traduisant une augmentation de la taille des cristallites et de cristallinité. L'intensité du pic lié à la β -TCP est plus importante expliquée par une décomposition plus importante de l'hydroxyapatite.

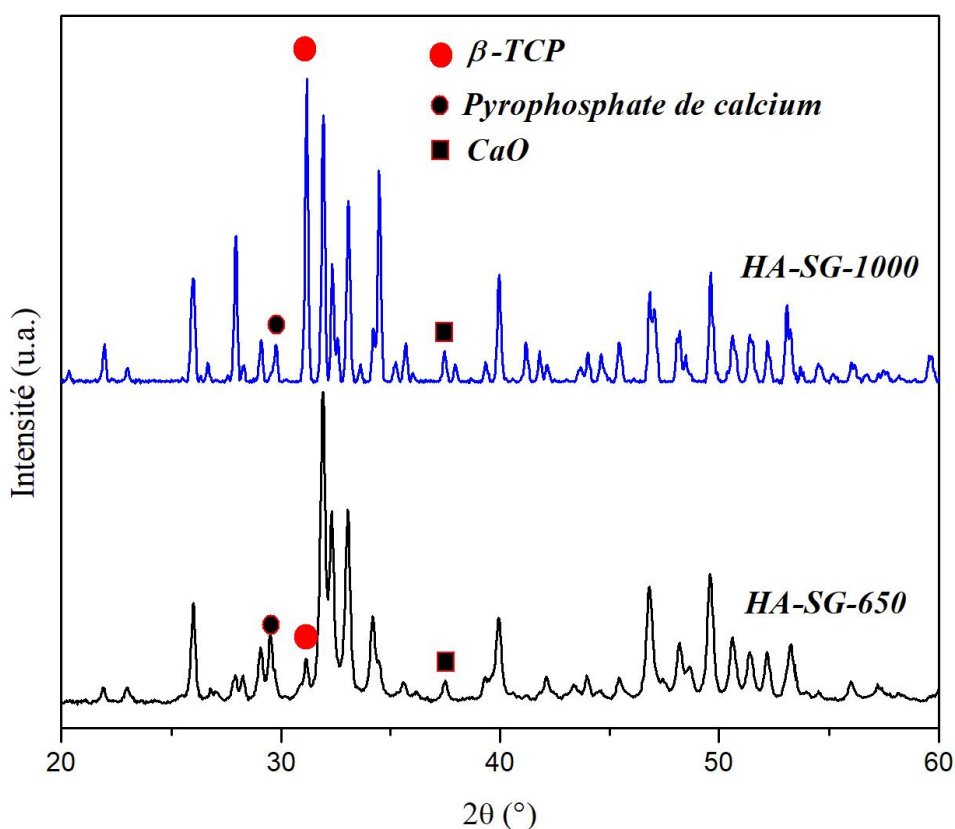


Figure V.1 : Diffractogramme DRX de l'hydroxyapatite synthétisée par voie sol-gel HA-SG.

Pour la poudre **HA-P-650** (**Figure V.2**), en plus des pics caractéristiques à la phase apatitique, nous observons, des pics additionnels à la position 29,44 et 35,97° liés au carbonate de calcium sous forme de calcite (ICDD, PDF n° 00-081-2027).

Les diffractogrammes des poudres **HAn-Crue-650** et **HAn-Crue-1000** ne présentent pas des pics caractéristiques à une phase apatitique majoritaire. Le diffractogramme de la poudre **HAc-650** présente un pic intense à la position de 29,59° caractéristique des carbonates de calcium et aucune phase apatitique n'est détectée.

Enfin, le diffractogramme de la poudre **HAc-1000** révèle principalement des pics de diffraction situés à 26,26, 32,09, 32,57, 33,36, 34,48 et 40,11°, attribués à la phase apatitique. On note également un décalage des positions 2θ vers des valeurs plus élevées (vers la droite) par rapport à celles observées précédemment pour les poudres **HA-SG-650** et **HA-SG-1000**. Ce changement de position est fort probablement dû à un changement structural de la maille. On détecte également un pic vers 31,35°, attribué à la β -TCP.

En effet, selon la littérature, pour les méthodes de précipitation, l'HA se décompose en β -TCP à des températures élevées, généralement au-dessus de 1400 °C [103]. En revanche, dans les méthodes sol-gel, l'HA commence à se dégrader à des températures plus basses, comme le rapporte Fathi **et al.** dès 700°C [100].

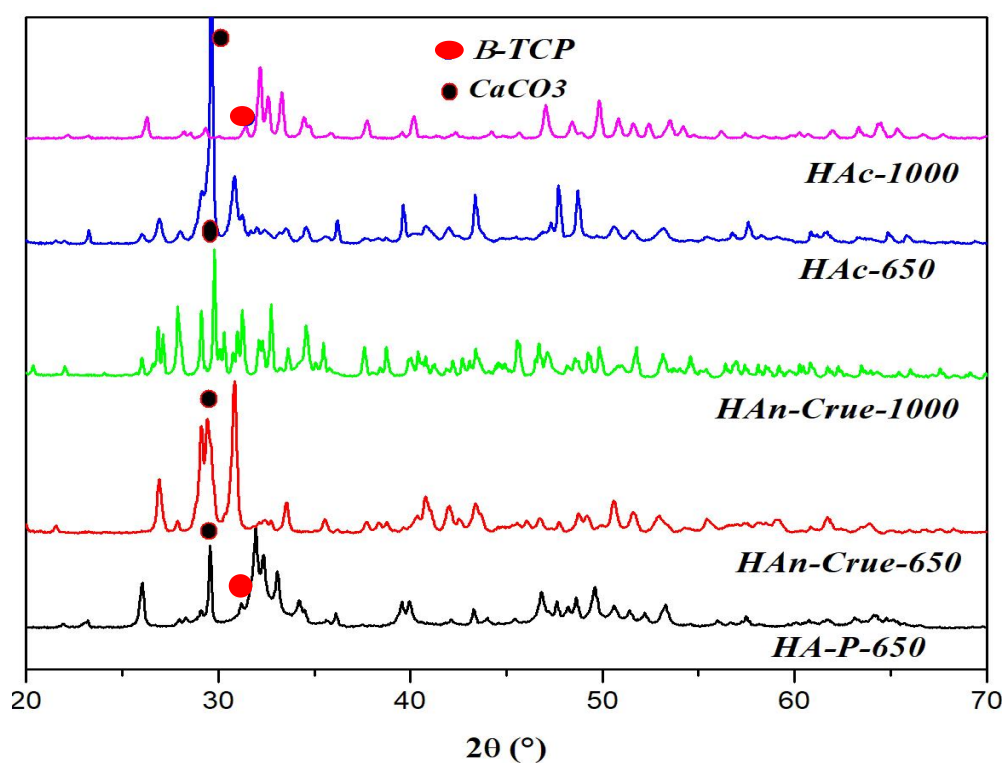


Figure V.2 : Diffractogramme DRX de l'hydroxyapatite synthétisée par voie précipitation.

Pour étudier certaines caractéristiques structurales des différentes poudres élaborées, nous avons utilisé les relations suivantes :

La taille des cristallites est évaluée en se basant sur la relation de **Scherrer (Équation V.2)** [100]:

$$X_s = \frac{0.9\lambda}{FWHM \cos\theta} \quad (\text{V. 2})$$

Où

X_s : la taille des cristallites (nm),

λ : la longueur d'onde du faisceau de rayons X ($\lambda = 0,15406$ nm pour le rayonnement Cu $K\alpha$),

FWHM : la largeur à mi-hauteur pour le pic de diffraction considéré (rad),

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

Le pic de diffraction à $2\theta = 26,04^\circ$ a été choisi pour le calcul de la taille des cristallites

➤ **Taux de cristallinité**

Le taux de cristallinité est calculé selon la relation suivante (**Équation V.3**) [100]:

$$X_c = 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \quad (\text{V. 3})$$

Où I_{300} est l'intensité du pic de diffraction (3 0 0) et $V_{112/300}$ est l'intensité du creux entre (1 1 2) et (3 0 0) pics de diffraction de l'hydroxyapatite.

➤ **Paramètres (a et c) et volume de la maille**

Les paramètres de maille hexagonale de l'hydroxyapatite (a et c) et son volume sont calculés à partir des relations suivantes (**Équation V.4**) et (**Équation V.5**) [104] :

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (\text{V. 4})$$

$$V = 0.866 a^2 c \quad (\text{V. 5})$$

Où :

h,k,l : indices de Miller

a : paramètre de maille (Å)

d : distance interréticulaire entre les plans (hkl)

Les **tableaux V.2** et **V.3** présentent les résultats de la caractérisation structurale des compositions ayant des phases apatitiques majoritaires. Nous constatons que les différentes compositions présentent une taille nanométrique et une bonne cristallinité. Les paramètres de maille sont proches l'un des autres avec des petites variations, ce qui est également observé pour le volume de maille. Selon nos résultats, le taux de cristallinité et la taille des cristallites est proportionnelle à la température de calcination qui est en accord avec la littérature [100].

Tableau V.2 : La cristallinité et la taille des cristallites des différents biomatériaux.

Biomatériau	Taux de Cristallinité (%)	Taille des cristallites D (nm)
HA-SG-650	80.81	77.61
HA-SG-1000	83.10	78.73
HA-P-650	49.10	67.63
HAc-1000	73.6	74.46

Tableau V.3 : paramètres et volume de maille

Composition	Paramètre a (Å)	Paramètre c (Å)	volume (nm)
HA-SG-650	9.387	6.052	461.888
HA-SG-1000	9.385	6.862	523.402
HA-P-650	9.387	6.859	523.455
Hac-1000	9.329	6.790	511.754

V.3.2. Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une technique d'analyse couramment utilisée, elle permet d'identifier les liaisons chimiques d'un matériau en mesurant l'absorption du rayonnement infrarouge par ses groupes fonctionnels. La transformée de Fourier permet d'obtenir un spectre rapide et précis, largement exploité en chimie, en science des matériaux et en pharmacologie [105, 106].

a) Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés sous forme de pastilles, une méthode couramment utilisée pour les solides. Une masse de 0,02 g de poudre d'hydroxyapatite a été mélangée avec 0,08 g de bromure de potassium (KBr) de qualité spectroscopique, un sel transparent dans l'infrarouge, afin d'assurer une bonne transmission du signal. Le mélange a été homogénéisé dans un mortier en agate, puis compressé à l'aide d'une presse hydraulique pour former une pastille fine et homogène. Les spectres infrarouges ont ensuite été enregistrés dans la gamme 4000–400 cm^{-1} à l'aide d'un spectrophotomètre (IRAffinity-1 SHIMADZU).

b) Résultats et interprétations

Les spectres IR de l'hydroxyapatite synthétisée selon diverses méthodes, avec ou sans calcination à deux température (650 et 1000°C) sont représentés dans la **figure V.3**. La superposition de ces spectres met en évidence l'évolution de l'hydroxyapatite en fonction de la température.

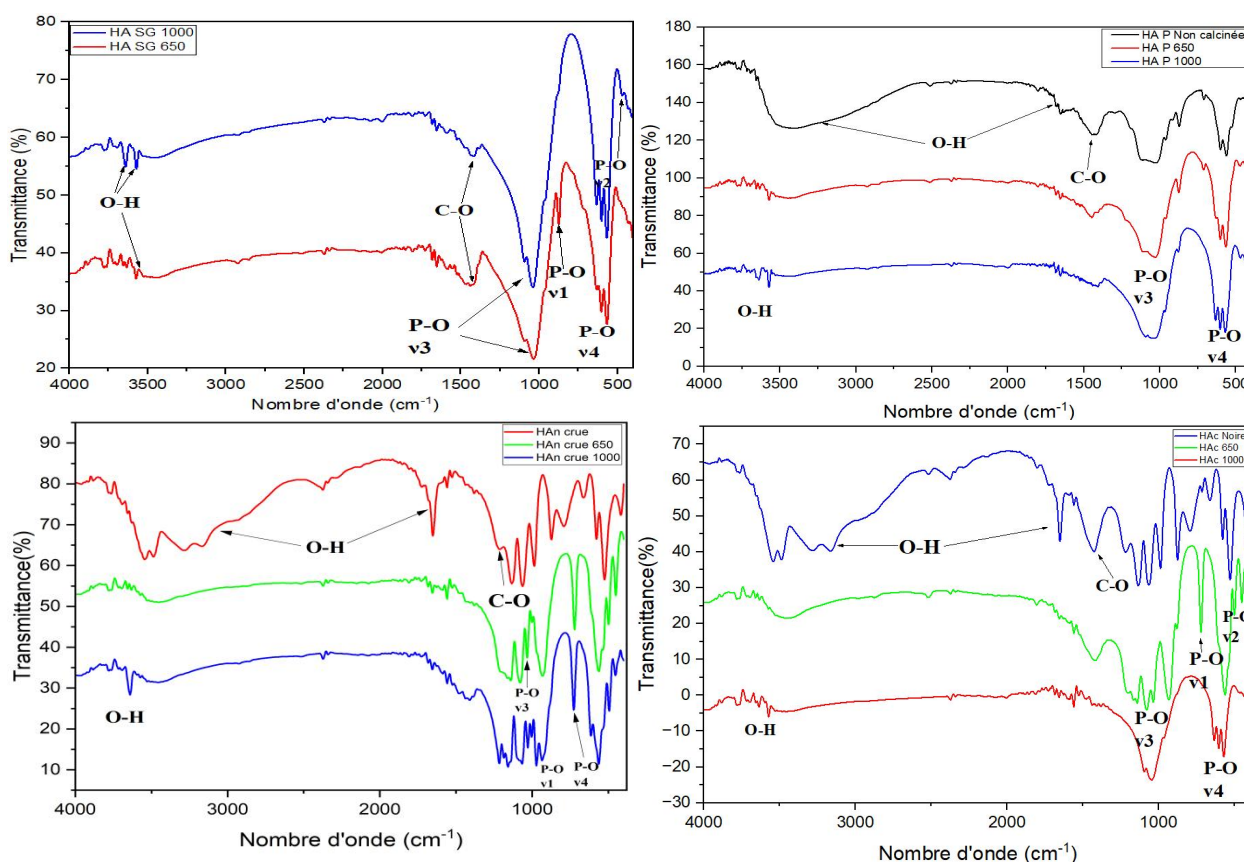


Figure V.3 : Spectres IR des biomatériaux élaborés.

L'analyse infrarouge des échantillons d'hydroxyapatite (HA), obtenus par différentes méthodes de synthèse et à partir de divers précurseurs, montre que toutes les poudres non calcinées présentent des bandes similaires à savoir :

- Des bandes larges entre 3280 et 3650 cm^{-1} , ainsi qu'une bande vers 1650 cm^{-1} correspondant aux vibrations des molécules d'eau adsorbées.
- Une bande entre 1380 et 1400 cm^{-1} , traduisant la présence d'ions carbonates (CO_3^{2-}), témoignant ainsi que les poudres d'hydroxyapatite obtenues sont partiellement carbonatées [50, 107, 108].
- Des bandes caractéristiques des modes de déformation ν_4 ($560\text{--}600\text{ cm}^{-1}$), d'étirement symétrique ν_1 ($930\text{--}960\text{ cm}^{-1}$) et d'étirement asymétrique ν_3 ($1030\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$) des groupements phosphate (PO_4^{3-}).

Les spectres des poudres calcinées à 650°C , révèlent quelques modifications notamment :

- Une diminution des bandes caractéristiques des liaisons OH liées, à la perte des molécules d'eau adsorbée
- Une réduction des bandes attribuées aux groupements carbonates, indiquant une décarbonatation partielle lors de la calcination

Les spectres obtenus après calcination à 1000°C montrent, pour tous les échantillons une intensification et un affinement des modes vibratoires du groupement PO_4^{3-} (ν_4 , ν_1 , ν_3), la disparition quasi complète des bandes associées à d'eau adsorbée et aux ions CO_3^{2-} [50, 109].

La comparaison des résultats infrarouges obtenues pour poudres préparées par les deux méthodes de synthèse montre que la méthode sol-gel donne des spectres aux bandes plus nettes et plus fines que ceux obtenus par la méthode de précipitation.

V.4. Préparation des composites HA-extrait

Pour la préparation des composites HA-extrait, nous avons adopté la technique d'évaporation de solvant, un procédé largement utilisé pour la fabrication de microparticules ou nanoparticules, notamment dans les domaines pharmaceutique, biomédical et des matériaux. Cette méthode repose sur l'évaporation d'un solvant organique, permettant la formation des particules solides contenant un principe actif ou d'autres composants tels que les extraits végétaux dans notre cas [110]. Dans cette étape, la poudre d'hydroxyapatite utilisée correspond à celle obtenue par la méthode sol-gel.

Les extraits végétaux (Romarin, Clou de girofle, Ortie) ont été incorporés à l'hydroxyapatite (HA) à différentes concentrations : 3, 5, 10 et 20 %. Les mélanges ont été homogénéisés à l'aide d'un mortier afin d'obtenir une granulométrie uniforme. Les différents mélanges HA-Extrait ainsi obtenus ont ensuite été répartis dans des boîtes recouvertes de papier aluminium perforé, puis laissés à sécher à température ambiante.

À partir de la poudre obtenue, une masse de 50 mg a été pesée pour la préparation de chaque pastille, puis comprimée à l'aide d'une presse hydraulique (**Figure V.4**) en appliquant une charge de 4 tonnes pendant quelques secondes, afin d'obtenir des pastilles de 8 mm de diamètre (**Figure V.5**).



Figure V.4 : Presse hydraulique.



Figure V.5 : Pastilles des composites HA-Extrait.

V.4.1. Caractérisation des composites préparés

V.4.1.2. Analyse infrarouge

Résultats et interprétations

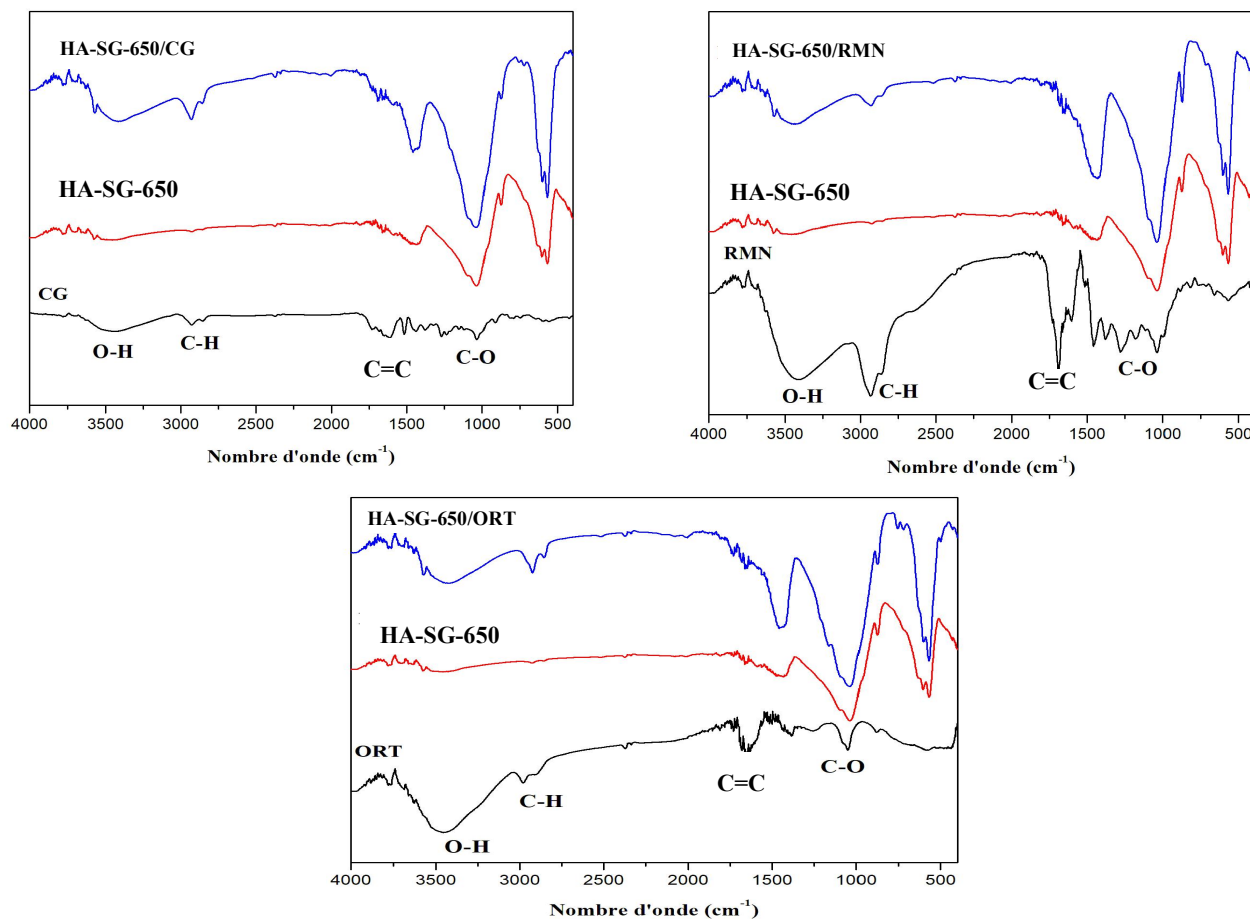


Figure V.6 : Spectres IR des extraits bruts et composites.

Les spectres infrarouges des extraits bruts, de l'HA-SG-650 avant et après modification sont montrés dans la figure V.6. Pour les extraits bruts, Nous observons principalement deux bandes situées à 3446 cm^{-1} et entre $1538\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$ attribuées respectivement aux vibrations de la liaison OH et C=C. Deux pics situés à 2925 et 2840 cm^{-1} liés à la vibration d'élongation de la liaison C-H. Après incorporation de l'extrait dans la matrice apatitique, nous pouvons détecter des pics liés aux vibrations C-H et OH situés à 2930 et 2853 et 3412 cm^{-1} respectivement. Ceci, nous permet de confirmer l'incorporation des extraits végétaux dans les matrices apatitiques [111].

Chapitre VI : Évaluation des effets antimicrobiens des extraits et des composites préparés

Dans le but de déterminer le potentiel antimicrobien des extraits végétaux et des composites élaborés, une série de tests a été réalisée en laboratoire.

L'activité antimicrobienne représente un critère essentiel pour juger l'efficacité des substances bioactives face aux agents pathogènes. Ainsi, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé, qui permet de mesurer la sensibilité de différentes souches bactériennes aux extraits et aux composites testés.

Ce chapitre présente donc le protocole expérimental mis en œuvre ainsi que les résultats obtenus sur les souches microbiennes sélectionnées.

VI.1. Les souches utilisées

Dans cette étude, trois souches microbiologiques ont été sélectionnées afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de romarin, d'ortie et de clou de girofle. Il s'agit de *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC10031) et *Candida albicans* (ATCC10131). Ces micro-organismes ont été choisis pour leur pertinence en tant que modèles représentatifs de bactéries Gram négatif, Gram positif, et de levures pathogènes.

VI.1.1. Escherichia coli: est une bactérie Gram négatif, de forme bacillaire droite (**Figure VI.1**), mobile et aérobie facultative. Naturellement présente dans la flore intestinale humaine, elle est généralement inoffensive et joue un rôle dans la digestion et la défense contre les agents pathogènes. Certaines souches peuvent toutefois provoquer des infections digestives ou systémiques. En microbiologie, elle est fréquemment utilisée comme souche modèle dans les tests de sensibilité, en raison de sa prévalence et de sa résistance naturelle à certains agents antimicrobiens [112].



Figure VI.1 : Morphologie de la souche *Escherichia coli* [113].

VI.1.2. *Staphylococcus aureus*: est une bactérie Gram positif, de forme coccique, généralement disposée en amas caractéristiques (**Figure VI.2**), immobile et aérobie facultative. Naturellement présente sur la peau et les muqueuses de l'être humain, elle peut coexister sans provoquer de symptômes. Néanmoins, elle devient pathogène lorsqu'elle pénètre dans l'organisme. Elle est largement reconnue pour sa capacité à produire diverses toxines et enzymes de virulence, facilitant ainsi l'invasion des tissus. Elle est impliquée dans de nombreuses infections humaines, notamment cutanées, respiratoires et nosocomiales [112].

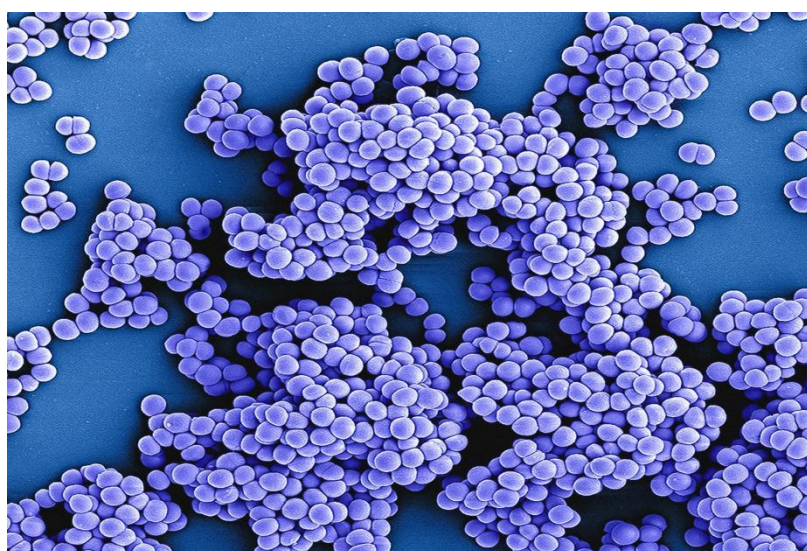


Figure VI.2 : Morphologie de la souche *Staphylococcus aureus* [114].

VI.1.3. *Candida albicans*: est une levure unicellulaire opportuniste appartenant au règne fongique. Elle présente un dimorphisme lui permettant d'adopter une forme ronde ou filamenteuse (hyphes ou pseudohyphes) en fonction des conditions de son environnement (**Figure VI.3**). Naturellement présente dans la flore humaine, notamment au niveau de la bouche et de l'intestin, elle demeure généralement inoffensive. Toutefois, en cas de déséquilibre immunitaire ou microbien, elle peut proliférer de manière excessive et provoquer des candidoses. Sa capacité à former des biofilms, à adhérer aux surfaces, à envahir les tissus et à produire des facteurs de virulence contribue à son pouvoir pathogène et à sa résistance face aux défenses de l'hôte [115].



Figure VI.3 : Morphologie de la souche *Candida albicans* [116].

VI.2. Les milieux de cultures utilisés

Nous avons utilisé les milieux suivants :

La gélose nutritive, utilisée pour l'isolement des souches, en raison de sa composition qui favorise la croissance d'un large nombre de bactéries.

La gélose Mueller-Hinton, utilisée pour le maintien des souches microbiennes, surtout pour les tests de sensibilité, car elle permet une croissance uniforme des bactéries

VI.2.1. La gélose nutritive (GN)

La préparation de ce milieu GN (Gélose Nutritive) consiste à dissoudre 28 g de poudre commerciale de gélose nutritive déshydratée dans un litre d'eau distillée. Le mélange a été chauffé sous agitation afin d'obtenir une solution homogène, puis stérilisé par autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement, le milieu stérile a été coulé dans des boîtes de Pétri et conservé à température adéquate en attendant son utilisation pour l'ensemencement des micro-organismes.

VI.2.2. La gélose Mueller-Hinton

Pour la préparation du milieu Mueller-Hinton (MH), 76 g de poudre ont été dissous dans 2 litres d'eau distillée. Après refroidissement, le pH de la solution est fixé à 7,4. La solution a été stérilisée pendant 15 minutes. Le milieu a été coulé dans des boîtes de Pétri stériles puis laissé se refroidir pour permettre la solidification (**Figure VI.4**).

La gélose Mueller-Hinton est utilisée pour l'étude de la sensibilité des souches microbiennes aux extraits de romarin, d'ortie et de clou de girofle.

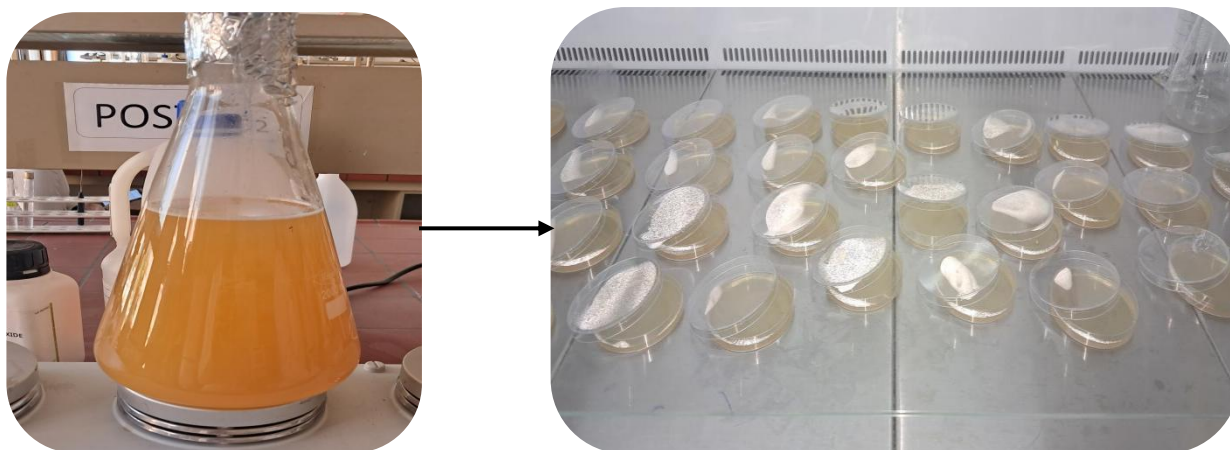


Figure VI.4 : Préparation et coulage du milieu en boîtes de Pétri.

VI.3. Préparation des précultures

La préparation des précultures a été effectuée en ensemençant chaque souche sur une boîte de gélose nutritive stérile. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une croissance microbienne suffisante. Ces cultures fraîches ont ensuite servi à l'inoculation des milieux de test. Cette étape permet d'utiliser des bactéries en phase de croissance active, garantissant des résultats fiables lors des tests.

VI.4. Préparation des suspensions bactériennes et réalisation des tests antibactériens

VI.4.1. Préparation des suspensions bactériennes

Quelques colonies bien isolées ont été prélevées à partir de cultures fraîches (18 à 24 heures) et repiquées dans 9 mL d'eau physiologique stérile afin de préparer une suspension bactérienne homogène. Celle-ci a été agitée au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 620 nm, afin d'obtenir une densité optique comprise entre 0,08 et 0,1.

VI.4.2. Ensemencement et dépôt de disques (pastilles)

À l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne standardisée, l'ensemencement a été réalisé par étalement en quadrants croisés sur toute la surface de la gélose Mueller-Hinton, de manière à obtenir une répartition homogène des bactéries sur le milieu. Après un temps de séchage d'environ 10 à 15 minutes à température ambiante, des disques en papier filtre stérile de type Wathman et des pastilles des composites HA-Extrait préparés, ont été délicatement déposés à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la géloseensemencée. Les disques ont été légèrement pressés afin d'assurer un bon contact avec le milieu, et placés à distance suffisante les uns des autres pour éviter le chevauchement des halos d'inhibition.

VI.4.3. Préparation des extraits

les extraits secs sont dissous en utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solvant. Les concentrations des extraits testés sont de l'ordre de 100 et 60 mg/ml.

VI.4.4. Lecture des résultats

La lecture des résultats a été réalisée après 24 heures d'incubation à 37 °C. L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques à l'aide d'une règle millimétrée ou d'un pied à coulisse. Selon **Ponce et al**, la sensibilité a été classée selon le diamètre des halos d'inhibition [117] :

- ◆ Non sensible (-) pour les diamètres inférieurs à 8 mm.
- ◆ Sensible (+) pour les diamètres compris entre 9 et 14 mm.
- ◆ Très sensible (++) pour les diamètres compris entre 15 et 19 mm.
- ◆ Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres supérieurs à 20 mm.

VI.5. Résultats et interprétations

VI.5.1. Détermination de la sensibilité des extraits étudiés vis-vis des trois

souches

Les résultats des tests antibactériens obtenus pour les trois extraits, le DMSO et la tétracycline sont présentés dans le tableau **VI.1** et la figure **VI.5**.

Tableau VI.1 : Diamètre des zones d'inhibition des différentes souches et extraits testés.

Souches	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
Témoin positif (Tétracycline)	30	30	-
Témoin négatif (DMSO)	-	-	-
Clou de girofle	13.3	20	20.5
Romarin	-	13.4	-
Ortie	-	-	-

(-) : test négatif

Les tests d'activité antimicrobienne ont révélé que :

Le clou de girofle, présente une action inhibitrice significative sur les trois souches testées, avec des diamètres d'inhibition de 13,3 mm contre *E. coli*, 20 mm contre *S. aureus* et 20,5 mm contre *C. albicans*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Abdallah et al.** [118], qui ont mis en évidence l'efficacité antimicrobienne de cet extrait. Cependant, certains auteurs comme **Abid** [119] ont rapporté l'absence d'effet inhibiteur, notamment vis-à-vis d'*E. coli*.

Le romarin, quant à lui, n'a montré une activité que contre *S. aureus* avec un diamètre de 13,4 mm. Cette observation est cohérente avec les résultats rapportés par **Ayadi et al.** et **MOUAS et al.** [120, 121], qui ont également mis en évidence l'effet inhibiteur de l'extrait éthanolique de romarin sur cette souche. Contrairement à d'autres études, telles que celles de **Al-marir** et **Fernanda et al.** qui ont trouvé que l'extrait de romarin n'a aucun effet sur les souches testées [122, 123]

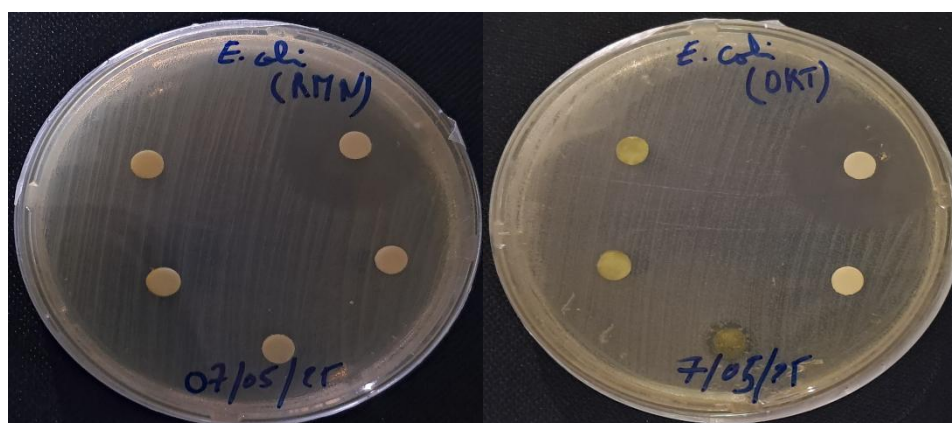


Figure VI.5 : Résultats d'aromatogramme des extraits romarin et ortie.

En revanche, l'ortie n'a présenté aucune activité antimicrobienne significative dans les conditions de ce travail. Ces observations confirment les résultats obtenus par **Modarresi-Chahardehi et al.** [124] qui ont relevé une faible efficacité limitée à certaines souches. De même **Daoudi et al.** n'ont pas trouvé d'activité antimicrobienne pour l'extrait de l'ortie [125].

Les variations constatées dans les résultats d'une étude à une autre peuvent être attribuées à divers paramètres, tels que la méthode d'extraction, le solvant utilisé, la concentration de l'extrait, ainsi la nature des microorganismes testés [126].

VI.5.2. Étude de l'effet synergique entre la tétracycline et l'extrait végétal sur l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*

Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau VI.2.

Tableau VI.2 : Diamètre des zones d'inhibition des différentes associations tétracyclines-extrait et CG-RMN contre la souche *Staphylococcus aureus*.

Association	Diamètre des halos d'inhibition
CG-RMN	16
Tétracycline- CG	19.3
Tétracycline- RMN	13.3
Tétracycline- CG- RMN	28

Ces résultats montrent que le composite combiné CG-RMN (clou de girofle et romarin) exerce une activité modérée contre *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 16 mm. Alors que, l'association tétracycline et clou de girofle a permis d'inhiber la croissance de *S.aureus* (zone d'inhibition de 19,3 mm), tandis que la combinaison tétracycline avec le romarin a montré une inhibition de 13,3 mm.

L'association triple tétracycline, clou de girofle et romarin a montré le plus fort effet contre *S.aureus* avec un diamètre de 28 mm, mettant en évidence une bonne synergie antimicrobienne.

Par ailleurs, l'effet inhibiteur du système tétracycline-clou girofle a été également testé contre *E. coli*. Le résultat obtenu, indique une zone d'inhibition de 13.3 mm.

De ce fait, la combinaison d'extraits végétaux bioactifs avec des antibiotiques représente une stratégie prometteuse pour surmonter la résistance microbienne. Des études, telles que celles de **Vaou et al.**, mettant en évidence l'effet synergique de l'extrait de propolis, et de **Donkor et al.**, portant sur l'extrait de dattier [127, 128], ont démontré une amélioration significative de l'efficacité antimicrobienne grâce à ces associations.

VI.5.3. Effet de la concentration des composites HA-Extrait sur l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*

Nous avons également évalué l'activité antibactérienne des composites RMN-HA, préparés à différentes concentrations, contre la souche *S.aureus* ainsi que celle des composites CG-HA contre les trois souches sélectionnées dans cette étude. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux VI.3 et VI.4 et illustrés par la figure VI.6.

Tableau VI.3 : Diamètre d'inhibition des composites RMN-HA contre la souche *S.aureus*.

Composite	Diamètre des halos d'inhibition
RMN-HA 20%	19.5
RMN-HA 10%	16.8
RMN-HA 5%	-
RMN-HA 3%	-

Tableau VI.4 : Diamètre d'inhibition des composites CG-HA contre les trois souches.

Souches	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
CG-HA 20%	20	10.3	20.5
CG-HA 10%	19.6	8.7	18.4
CG-HA 5%	-	-	-
CG-HA 3%	-	-	-

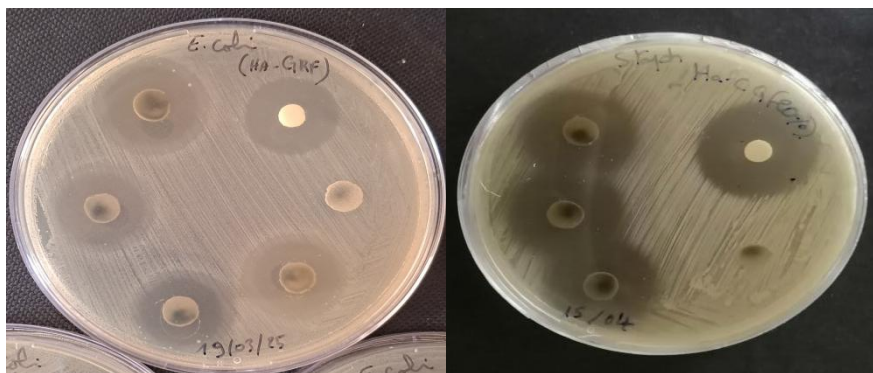


Figure VI.6 : Résultats obtenus des composites CG-HA.

Les résultats obtenus montrent que le composite CG-HA préparé avec 20% d'extrait inhibe efficacement les trois souches bactériennes étudiées, avec des diamètres d'inhibition respectifs de : 20.5 mm, pour *C. albicans*, 20 mm pour *E. coli* et 10, 3 mm pour *S. aureus*. De même, le composite CG-HA préparé avec 10% d'extrait, présente des diamètres d'inhibition proches de ceux obtenus pour le composite CG-HA 20% avec des diamètres de 16,6 mm, 18,4 mm et 8,7mm pour *E. coli*, *C. albicans* et *S. aureus* respectivement

En revanche, les composites CG-HA préparés à 5 et 3% d'extrait n'ont montré aucune activité détectable. Les composites à base de romarin (RMN-HA), préparés à différentes concentrations en extrait et testés uniquement contre *S. aureus*, ont montré une efficacité croissante avec l'augmentation de la concentration. Un diamètre d'inhibition de 19,5 mm est obtenu à 20% et 16,8 mm à 10%, alors que les concentrations les plus faibles (3 et 5%) n'ont montré aucune activité visible.

L'association d'extraits végétaux bioactifs avec des biomatériaux à base d'hydroxyapatite constitue une approche innovante, combinant à la fois des propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite et des fonctions biologiques des plantes naturelles. Plusieurs travaux ont démontré que cette combinaison permet d'améliorer la prolifération cellulaire, la différenciation et d'apporter une activité antimicrobienne bénéfique [56, 129].

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives :

Ce travail a permis de mettre en évidence l'intérêt de l'hydroxyapatite comme biomatériau de choix dans le domaine de la réparation osseuse, notamment dans le traitement des lésions parodontales. Grâce à ses propriétés physico-chimiques proches de celles de l'os humain.

Par ailleurs, l'analyse des extraits végétaux a révélé des profils phytochimiques distincts, mettant en évidence leur potentiel fonctionnel. En termes de rendement, le romarin présente le meilleur rendement d'extraction atteignant un taux de 17,42%. Le clou de girofle est le plus riche en polyphénols avec une valeur de 62 mg EAG/g MS suivi du romarin et de l'ortie. Quant aux concentrations en flavonoïdes, l'ortie présente la concentration la plus élevée avec une valeur de 89,43 mg EQ/g MS et où le clou de girofle présente la concentration la plus faible.

Les deux méthodes de synthèse suivies dans notre travail, sol-gel et précipitation, nous ont permis de générer des phases apatitiques à base d'hydroxyapatite de taille nanométrique. Des phases secondaires sont détectées, essentiellement, la β -TCP, le pyrophosphate et l'oxyde de calcium.

Les analyses DRX et IR ont confirmé que la synthèse par voie sol-gel permet d'obtenir une hydroxyapatite hautement cristalline à plus basse température de calcination (650°) alors que dans le cas de la méthode par précipitation elle nécessite une température de calcination beaucoup plus élevée (1000°C). L'utilisation de la coquille d'œuf comme source de calcium constitue donc une alternative écologique et économique intéressante pour la synthèse de l'hydroxyapatite. Elle permet de valoriser un déchet alimentaire tout en offrant un précurseur naturel.

L'approche innovante adoptée dans ce mémoire consistait à modifier ce biomatériau en y incorporant les extraits végétaux à propriétés antimicrobiennes.

Cette combinaison a montré des résultats prometteurs, en particulier en termes de réduction de la prolifération bactérienne. L'intégration de ces composés bioactifs naturels renforce ainsi le caractère multifonctionnel du biomatériau, en lui conférant non seulement une fonction de support mécanique, mais également une action thérapeutique ciblée.

Bien que les résultats obtenus soient encourageants, plusieurs pistes peuvent être envisagées pour approfondir ce travail :

- ✓ **Études in vitro** : Il serait pertinent de réaliser des tests biologiques supplémentaires sur des lignées cellulaires osseuses pour évaluer l'effet des biomatériaux enrichis sur la prolifération, la différenciation et la minéralisation cellulaire.
- ✓ **Évaluation in vivo** : Des essais sur modèles animaux sont indispensables pour confirmer la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'efficacité régénérative du biomatériau dans un environnement biologique complexe.
- ✓ **Optimisation des formulations** : La concentration optimale en extrait végétal doit être déterminée pour garantir un équilibre entre activité antimicrobienne et cytocompatibilité.
- ✓ **Exploration d'autres extraits bioactifs** : L'élargissement à d'autres plantes médicinales connues pour leurs effets cicatrisants ou anti-inflammatoires pourrait enrichir les performances du biomatériau.

Bibliographie

Références bibliographiques :

- [1]. Palard, M., *Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées*. 2007, Thèse de doctorat, Université de Limoges.
- [2]. Florencio-Silva, R., et al., *Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 421746.
- [3]. Flemmig, T.F., *Periodontitis*. Annals of periodontology, 1999. **4**(1): p. 32-37.
- [4]. Listgarten, M.A., *Pathogenesis of periodontitis*. Journal of clinical periodontology, 1986. **13**(5): p. 418-425.
- [5]. Khan, S.N., et al., *The biology of bone grafting*. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2005. **13**(1): p. 77–86.
- [6]. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2008. **3**(Suppl 3): p. S131–S139.
- [7]. Raggatt, L.J. and N.C. Partridge, *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(33): p. 25103–25108.
- [8]. Rezwan, K., et al., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(18): p. 3413–3431.
- [9]. Sopyan, I., et al., *Porous hydroxyapatite for artificial bone applications*. Science and Technology of Advanced Materials, 2007. **8**(1–2): p. 116–123.
- [10]. Gourrier, A. and I. Reiche, *Chapitre 3 L'os: morphologie, structure et composition chimique*. «Message d'os, Archéométrie du squelette animal et humain», Ed. des Archives Contemporaines (EAC), coll.«Sciences Archéologiques», 2015: p. pp 23-37.
- [11]. <https://www.visiblebody.com/fr/learn/skeleton/types-of-bones>.
- [12]. Aubry, C., *Procédé innovant utilisant le CO2 haute pression pour la modification et la fonctionnalisation de phosphates de calcium*. 2019, Thèse de doctorat, Université de Toulouse.
- [13]. <https://www.visiblebody.com/fr/learn/skeleton/overview-of-skeleton>.
- [14]. <https://www.alamyimages.fr/coupe-osseuse-representation-en-vue-3-4-de-la-structure-de-l-os-avec-zoom-montrant-les-differentes-cellules-qui-composent-le-tissu-osseux-image600762246.html>.
- [15]. Wang, Y., et al., *Bone remodeling-inspired dual delivery electrospun nanofibers for promoting bone regeneration*. Nanoscale, 2019. **11**(1): p. 60-71.
- [16]. Bartold, P.M. and A.S. Narayanan, *Biology of the periodontal connective tissues*, in *Biology of the periodontal connective tissues*. 1998. p. 278-278.
- [17]. <https://www.fondation-arc.org/cancer/sarcomes-osseux/que-sont-sarcomes-osseux>.
- [18]. Morris, A.L. and P. Tadi, *Anatomy, head and neck, teeth*, in *StatPearls [Internet]*. 2023, StatPearls Publishing.
- [19]. <https://www.centredentairemont-royal.ca/blogue/anatomie-des-dents>.
- [20]. Darveau, R.P., *Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis*. Nature reviews microbiology, 2010. **8**(7): p. 481-490.
- [21]. Brun, A., et al., *La parodontite: un risque sous-estimé des maladies cardiovasculaires*. médecine/sciences, 2024. **40**(1): p. 35-41.
- [22]. <https://www.pierrefabre-oralcare.com/fr-fr/conseils-routines/sante-des-gencives/la-gingivite>.
- [23]. Van Dyke, T.E. and S. Dave, *Risk factors for periodontitis*. Journal of the International Academy of Periodontology, 2005. **7**(1): p. 3.

- [24]. Hajishengallis, G., *Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response*. Trends in immunology, 2014. **35**(1): p. 3-11.
- [25]. Pihlstrom, B.L., B.S. Michalowicz, and N.W. Johnson, *Periodontal diseases*. The lancet, 2005. **366**(9499): p. 1809-1820.
- [26]. <https://parodyseum.fr/le-traitement-de-la-parodontite>.
- [27]. Periodontology, A.A.o., *Comprehensive Periodontal Therapy: A Statement by the American Academy of Periodontology*. Journal of Periodontology, 2011. **82**(7): p. 943-949.
- [28]. Bosshardt, D.D. and A. Sculean, *Does periodontal tissue regeneration really work?* Periodontology 2000, 2019. **79**(1): p. 208-218.
- [29]. Cortellini, P. and M.S. Tonetti, *Clinical outcomes of guided tissue regeneration with bioresorbable membranes in the treatment of intrabony defects*. Journal of Clinical Periodontology, 2001. **28**(9): p. 864-870.
- [30]. Giannobile, W.V. and M.J. Somerman, *Growth and amelogenin-like factors in periodontal regeneration*. Journal of Dental Research, 2003. **82**(6): p. 408-419.
- [31]. Trombelli, L. and R. Farina, *Clinical outcomes of guided tissue regeneration in the treatment of periodontal intrabony defects: a systematic review and meta-analysis*. Journal of Clinical Periodontology, 2008. **35**(Suppl 8): p. 117-135.
- [32]. <https://www.dentista.studio/curare-la-parodontite>.
- [33]. Aghaloo, T.L. and P.K. Moy, *Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement?* International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 2007. **22**(7):p. 49-70.
- [34]. Wikesjö, U.M., et al., *Periodontal repair in dogs: Space-providing ePTFE devices increase rhBMP-2/ACS-induced bone formation*. Journal of Clinical Periodontology, 2003. **30**(8): p. 715-725.
- [35]. Misch, C.E., *Dental implant prosthetics-E-book*. 2004: Elsevier Health Sciences.
- [36]. Dorozhkin, S.V., *Bioceramics of calcium orthophosphates*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1465-1485.
- [37]. Ratner, B.D., et al., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2013: Academic Press.
- [38]. Park, J.B. and J.D. Bronzino, *Biomaterials: Principles and Applications*. 2002: CRC Press.
- [39]. Ratner, B.D., et al., *An introduction to materials in medicine*. Biomaterials science, 1996. **484**.
- [40]. Petite, H., *La bio-ingénierie de la régénération osseuse*. médecine/sciences, 2002. **18**(10): p. 995-1002.
- [41]. Böhner, M., *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. Injury, 2000. **31**: p. D37-D47.
- [42]. <https://www.researchgate.net/figure/Several-examples-of-the-commercial-calcium-orthophosphate-based-bioceramics>.
- [43]. Sadat-Shojai, M., et al., *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. Acta biomaterialia, 2013. **9**(8): p. 7591-7621.
- [44]. Hing, K.A., *Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry*. International journal of applied ceramic technology, 2005. **2**(3): p. 184-199.
- [45]. <https://www.researchgate.net/figure/Hydroxyapatite>.
- [46]. Rujitanapanich, S., P. Kumpapan, and P. Wanjanoi, *Synthesis of hydroxyapatite from oyster shell via precipitation*. Energy Procedia, 2014. **56**: p. 112-117.

- [47]. Kareem, Z. and E. Eyiler, *Synthesis of hydroxyapatite from eggshells via wet chemical precipitation: a review*. RSC advances, 2024. **14**(30): p. 21439-21452.
- [48]. Liu, Y., D. Hou, and G. Wang, *A simple wet chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods*. Materials chemistry and physics, 2004. **86**(1): p. 69-73.
- [49]. Bezzi, G., et al., *A novel sol–gel technique for hydroxyapatite preparation*. Materials Chemistry and Physics, 2003. **78**(3): p. 816-824.
- [50]. Fathi, M. and A. Hanifi, *Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol–gel method*. Materials letters, 2007. **61**(18): p. 3978-3983.
- [51]. LeGeros, R.Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates*. Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007), 2002. **395**: p. 81-98.
- [52]. Habibovic, P. and K. de Groot, *Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2007. **1**(1): p. 25-32.
- [53]. Barrère, F., C.A. van Blitterswijk, and K. de Groot, *Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics*. International journal of nanomedicine, 2006. **1**(3): p. 317-332.
- [54]. <https://www.researchgate.net/figure/of-the-bone-regeneration-process-triggered-by-the-action-of-an-implanted-biomaterial>.
- [55]. de Oliveira, B.E.G., et al., *Use of Plant Extracts in Polymeric Scaffolds in the Regeneration of Mandibular Injuries*. Pharmaceutics, 2024. **16**(4): p. 491.
- [56]. Garcia, C.F., et al., *Development of collagen/nanohydroxyapatite scaffolds containing plant extract intended for bone regeneration*. Materials Science and Engineering: C, 2021. **123**: p. 111955.
- [57]. santé, O.m.d.l., *Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle 2014–2023*. 2013, Genève.
- [58]. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014*. Journal of Natural Products, 2016. **79**(3): p. 629-661.
- [59]. Cowan, M.M., *Plant products as antimicrobial agents*. Clinical Microbiology Reviews, 1999. **12**(4): p. 564-582.
- [60]. Schippmann, U., D.J. Leaman, and A.B. Cunningham, *Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: Global trends and issues, in FAO Biodiversity and the Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries*. 2002.
- [61]. López-Valverde, N., et al., *Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity of natural products in periodontal disease: A comprehensive review*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023. **11**: p. 1226907.
- [62]. Wang, L., C. Hu, and L. Shao, *The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future*. International journal of nanomedicine, 2017: p. 1227-1249.
- [63]. Santana-Méridas, O., et al., *Polyphenol composition, antioxidant and bioplaguicide activities of the solid residue from hydrodistillation of Rosmarinus officinalis L*. Industrial Crops and Products, 2014. **59**: p. 125-134.
- [64]. Moreno, S., et al., *Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition*. Free radical research, 2006. **40**(2): p. 223-231.
- [65]. Del Campo, J., M.-J. Amiot, and C. Nguyen-The, *Antimicrobial effect of rosemary extracts*. Journal of food protection, 2000. **63**(10): p. 1359-1368.
- [66]. Yap, P.S.X., et al., *Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance*. The open microbiology journal, 2014. **8**: p. 6.

- [67]. Daglia, M., *Polyphenols as antimicrobial agents*. Current opinion in biotechnology, 2012. **23**(2): p. 174-181.
- [68]. Rafie, H., H. Soheila, and E. Grant, *Rosmarinus officinalis (rosemary): a novel therapeutic agent for antioxidant, antimicrobial, anticancer, antidiabetic, antidepressant, neuroprotective, anti-inflammatory and anti-obesity treatment*. J. Herb Med, 2017. **3**(2): p. 8-14.
- [69]. Günther, M., et al., *The antimicrobial effect of Rosmarinus officinalis extracts on oral initial adhesion ex vivo*. Clinical oral investigations, 2022. **26**(6): p. 4369-4380.
- [70]. Nieto, G., *Biological activities of three essential oils of the Lamiaceae family*. Medicines, 2017. **4**(3): p. 63.
- [71]. Olsen, C., *The ecology of Urtica dioica*. Journal of Ecology, 1921. **9**(1): p. 1-18.
- [72]. Joshi, B.C., M. Mukhija, and A.N. Kalia, *Pharmacognostical review of Urtica dioica L*. International Journal of Green Pharmacy (IJGP), 2014. **8**(4).
- [73]. Flórez, M., P. Cazón, and M. Vázquez, *Antioxidant extracts of nettle (Urtica dioica) leaves: evaluation of extraction techniques and solvents*. Molecules, 2022. **27**(18): p. 6015.
- [74]. Safarinejad, M.R., *Urtica dioica for treatment of benign prostatic hyperplasia: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study*. Journal of herbal pharmacotherapy, 2005. **5**(4): p. 1-11.
- [75]. Afifi, F.U. and V. Kasabri, *Pharmacological and phytochemical appraisal of selected medicinal plants from Jordan with claimed antidiabetic activities*. Scientia pharmaceutica, 2013. **81**(4): p. 889-932.
- [76]. Osinska, Z. and N. Khokhlenkova, *Microbiological studies of dental gel with plant extracts*. 2023.
- [77]. Kamatou, G.P., I. Vermaak, and A.M. Viljoen, *Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule*. Molecules, 2012. **17**(6): p. 6953-6981.
- [78]. Pulikottil, S. and S. Nath, *Potential of clove of Syzygium aromaticum in development of a therapeutic agent for periodontal disease.: a review*. South African Dental Journal, 2015. **70**(3): p. 108-115.
- [79]. Askari, V.R., Z. Najafi, and V.B. Rahimi, *Syzygium aromaticum—Role in Oral Health and Dental Care*. Pharmacological Studies in Natural Oral Care, 2023: p. 499-518.
- [80]. Chaieb, K., et al., *The chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae): a short review*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 2007. **21**(6): p. 501-506.
- [81]. Wang, L. and C.L. Weller, *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. Trends in Food Science & Technology, 2006. **17**(6): p. 300-312.
- [82]. Rachedi, T., *Estimation et cartographie des surfaces forestières incendiées par télédétection durant l'été 2021 : cas de la wilaya de Béjaïa*. 2022, Mémoire de Master, Université Frères Mentouri Constantine 1.
- [83]. Mohammedi, Z., *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen*. 2006, Mémoire de Magister, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen.
- [84]. Swari, D., I.W.M. Santika, and I.G.M. Aman, *Antifungal activities of ethanol extract of*. Journal of rosemary leaf, 2020. **2**(1): p. 28-35.

- [85]. Fadel, M.S.A.S.M. and A. Khalil, *Etude de l'activité antioxydante et antidiabétique des extraits de Rosmarinus officinalis*. 2018. Mémoire de Master, Université de Miliana.
- [86]. BERKANI, I., O. HERKANE, and N. HOUALI, *Étude des activités antioxydante, antibactérienne et antibiofilm de l'extrait aqueux du clou de girofle en vue d'une formulation de dentifrice*. 2024. Mémoire de Master, Université de Mouloud Mammeri de Tizi ousou.
- [87]. Rezoug, S. and A. Bourihane, *Etude des propriétés physico-chimiques et antibactérienne du clou de girofle (Syzygium aromaticum)*. 2021. Mémoire de Master, Université de Mouloud Mammeri de Tizi ousou.
- [88]. DERBAL, L., K. TLAGHI, and H. ZEREB, *Développement d'une crème anti-acnéique à base d'extraits végétaux*. 2024. Mémoire de Master, Université de Mouloud Mammeri de Tizi ousou.
- [89]. Soufia, S. and B.N. DIB, *Activités antiagrégante et anticoagulante des polyphénols d'une plante médicinale de genre Urtica*. 2023, Mémoire de Master, university center of abdalhafid boussouf-MILA.
- [90]. Shahwar, D. and M.A. Raza, *Antioxidant potential of phenolic extracts of Mimosa elengi*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2012. **2**(7): p. 547-550.
- [91]. Indiarto, R., et al., *Total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and characteristics of a chocolate beverage incorporated with encapsulated clove bud extract*. CyTA-Journal of Food, 2024. **22**(1): p. 2329144.
- [92]. Ramzi, A. and M.I. Kamouche Abderrahim, *Evaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de quelques épices (Cuminum cyminum, Curcuma longa et Syzygium aromaticum)*. 2021, Mémoire de Master, Université de Guelma.
- [93]. Tsai, P.-J., T.-H. Tsai, and S.-C. Ho, *In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of Streptococcus sobrinus*. Food chemistry, 2007. **105**(1): p. 311-316.
- [94]. Beddek, M. and L. Hedjar, *Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale du bassin méditerranéen le romarin «Rosmarinus officinalis L»*. 2018, Mémoire de Master, Université Mouloud Mammeri.
- [95]. Meryem, M.B., *Composition chimique et propriétés biologiques des polyphénols de l'ortie (Urtica dioica L.)*. 2020, Thèse de doctorat, Université de Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.
- [96]. Tahar, M.A., Y. Kadri, and M. Ghezal, *Étude de l'activité antibactérienne des extraits de l'ortie (Urtica dioica) récoltée dans la région de Tissemsilt*. 2023, Mémoire de Master, Université de Tissemsilt.
- [97]. Khettaf, A., N. Belloula, and S. Dridi, *Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents of some wild medicinal plants in southeastern Algeria*. African Journal of Biotechnology, 2016. **15**(13): p. 524-530.
- [98]. Mekhibi, A.E. and H. Boudria, *Contribution A L'étude Des Extraits Bruts De La Plante Urtica Dioica*. 2013, Mémoire de Master, Université de Ouargla.
- [99]. Soltanabad, M.H., M.B. Bagherieh-Najjar, and M. Mianabadi, *Seasonal variations in Carnosic acid content of Rosemary correlates with anthocyanins and soluble sugars*. Journal of Medicinal Plants and By-products. 2018, **2**: p 163-171.

- [100]. Fathi, M., A. Hanifi, and V. Mortazavi, *Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder*. Journal of materials processing technology, 2008. **202**(1-3): p. 536-542.
- [101]. Pham Minh, D., et al., *Hydroxyapatite starting from calcium carbonate and orthophosphoric acid: synthesis, characterization, and applications*. Journal of Materials Science, 2014. **49**: p. 4261-4269.
- [102]. Pecharsky, V.K. and P.Y. Zavalij, *Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials*. 2009: Springer.
- [103]. Muralithran, G. and S. Ramesh, *The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite*. Ceramics International, 2000. **26**(2): p. 221-230.
- [104]. Djahida, S., *Influence d'oxydes de titane et de silice sur le comportement de revêtements protétiques en hydroxyapatite: Application au biomédical*. Thèse de doctorat, 2017. Université de Bejaia.
- [105]. Hummel, D.O., *Infrared Spectrometry*, in *Atlas of Plastics Additives: Analysis by Spectrometric Methods*. Polymer International, 2002, **53** (3):p. 355-356.
- [106]. Penrhyn-Lowe, O., *Expanding the scope of hyperbranched polymer synthesis by Transfer-dominated Branching Radical Telomerisation*. Thèse de doctorat, 2023, University of Liverpool.
- [107]. Cheng, Z.H., et al., *FTIR study on incorporation of CO₂ into calcium hydroxyapatite*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1998. **94**(10): p. 1501-1505.
- [108]. Kawata, M., et al., *Development of porous ceramics with well-controlled porosities and pore sizes from apatite fibers and their evaluations*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2004. **15**: p. 817-823.
- [109]. Costentin, G., et al., *Structure and Surface Study of Hydroxyapatite-Based Materials: Experimental and Computational Approaches*. Design and Applications of Hydroxyapatite-Based Catalysts, 2022: p. 73-140.
- [110]. Li, M., O. Rouaud, and D. Poncelet, *Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches*. International Journal of pharmaceutics, 2008. **363**(1-2): p. 26-39.
- [111]. Hameed, I.H., I.A. Ibraheam, and H.J. Kadhim, *Gas chromatography mass spectrum and fourier-transform infrared spectroscopy analysis of methanolic extract of Rosmarinus officinalis leaves*. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 2015. **7**(6): p. 90-106.
- [112]. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, *Brock biology of microorganisms*. International Microbiologie. 2005, **8** : p 149-152.
- [113]. <https://www.addmaster.co.uk/blog/what-is-e-coli-causes-symptoms-and-prevention>.
- [114]. <https://unsplash.com/fr/photos/un-gros-plan-dun-tas-de-pilules-violettes-BtrSvamnnw0>.
- [115]. Tsui, C., E.F. Kong, and M.A. Jabra-Rizk, *Pathogenesis of Candida albicans biofilm*. FEMS Pathogens and Disease, 2016. **74**(4): p. ftw018.
- [116]. <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-sante-du-quotidien/2514813-candida-albicans-definition-traitement-symptomes/>
- [117]. Ponce, A., et al., *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. LWT-Food Science and Technology, 2003. **36**(7): p. 679-684.
- [118]. Abdallah, E.M., *Antibacterial potential of methanolic extract of Syzygium aromaticum (clove) against different bacterial strains*. International Journal of Biosciences, 2020. **16**(2): p. 394-401.

- [119]. Abid, H.S., *Effect of ethanolic extract of Clove (Eugenia caryophyllus) on growth of some types of pathogenic bacteria*. Journal of Biotechnology Research Center (JOBRC), 2009. **3**(1): p. 72-78.
- [120]. Mouas, Y., F.Z. Benrebiha, and C. Chaouia, *Évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin Rosmarinus officinalis l.* Revue Agrobiologia, 2017. **7**(1): p. 363-370.
- [121]. Ayadi, S., C. Jerribi, and M. Abderrabba, *Extraction et étude des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie*. Journal de la Société Algérienne de Chimie, 2011. **21**(1): p. 25-33.
- [122]. Al-Mariri, A. and M. Safi, *In vitro antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria*. Iranian journal of medical sciences, 2014. **39**(1): p. 36.
- [123]. Petrolini, F.V.B., et al., *Evaluation of the antibacterial potential of Petroselinum crispum and Rosmarinus officinalis against bacteria that cause urinary tract infections*. Brazilian Journal of Microbiology, 2013. **44**: p. 829-834.
- [124]. Modarresi-Chahardehi, A., et al., *Screening antimicrobial activity of various extracts of Urtica dioica*. Revista de biologia tropical, 2012. **60**(4): p. 1567-1576.
- [125]. Daoudi, A., et al., *Valorisation des extraits de trois espèces du genre Urtica: Urtica urens L., Urtica membranacea Poiret et Urtica pilulifera L.* Journal of Applied Biosciences, 2015. **87**: p. 8094-8104.
- [126]. Victor, O.E. and N.M. Gaël, *Etude de l'activité antibactérienne (in vitro) des extraits aqueux et méthanoliques de l'ail (Allium sativum L.)*. Journal of Applied Biosciences, 2019. **141**: p. 14419-14425.
- [127]. Vaou, N., et al., *Interactions between medical plant-derived bioactive compounds: Focus on antimicrobial combination effects*. Antibiotics, 2022. **11**(8): p. 1014.
- [128]. Donkor, A.-M., et al., *Enhancing Antibiotic Efficacy: Exploring Synergistic Interactions between Plant Extracts and Conventional Antibiotics*. Fine Chemical Engineering, 2024. **5** (1): p. 73-87.
- [129]. Amna, T., et al., *Nigella sativa-coated hydroxyapatite scaffolds: synergetic cues to stimulate myoblasts differentiation and offset infections*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2021. **18**(5): p. 787-795.

Résumé :

Ce mémoire porte sur l'élaboration d'un biomatériau à base d'hydroxyapatite destinée à la réparation osseuse, notamment dans le traitement de la parodontite. L'os alvéolaire, qui soutient les dents, est vulnérable à la résorption lors des maladies parodontales. Face à cette problématique, les biomatériaux à base d'hydroxyapatite représentent une solution prometteuse grâce à leur similitude structurelle avec l'os biologique, leur biocompatibilité et leur bioactivité.

Ce travail explore l'ajout d'extraits végétaux bioactifs à l'hydroxyapatite afin de lui conférer des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Les résultats obtenus montrent que cette combinaison est prometteuse tout en luttant contre l'infection microbienne, contribuant ainsi à une approche innovante et multifonctionnelle en médecine dentaire et régénérative.

Mots clés : Hydroxyapatite, Parodontite, Extraits végétaux, caractère antimicrobien.

Abstract:

This thesis focuses on the development of a hydroxyapatite-based biomaterial for bone repair, especially in the treatment of periodontitis. Alveolar bone, which supports the teeth, is subjected to resorption during periodontal diseases. Hydroxyapatite-based biomaterials represent a promising solution to this problem due to their structural similarity to human bone, as well as their biocompatibility, and their bioactivity.

The study involves modifying hydroxyapatite with bioactive plant extracts to bring antimicrobial properties. The results show that this combination is promising for microbial infection, representing an innovative and multifunctional approach in dental and regenerative medicine.

Keywords: Hydroxyapatite, Periodontitis, Plant extracts, antimicrobial.

ملخص :

تركز هذه الأطروحة على تطوير مادة حيوية قائمة على هيدروكسي أباتيت لإصلاح العظام، وخاصةً في علاج التهاب دواعم السن. يتعرض العظم السنخي، الذي يدعم الأسنان، للامتصاص خلال أمراض دواعم السن. تمثل المواد الحيوية القائمة على هيدروكسي أباتيت حلاً واعدًا لهذه المشكلة نظرًا لتشابهها الهيكلي مع عظام الإنسان، بالإضافة إلى توافقها الحيوي ونشاطها الحيوي.

تتضمن الدراسة تعديل هيدروكسي أباتيت بمستخلصات نباتية نشطة بيولوجيًا لإضفاء خصائص مضادة للميكروبات. تُظهر النتائج أن هذا المزيج واعدٌ في علاج العدوى الميكروبية، ويمثل نهجًا مبتكرًا ومتعدد الوظائف في طب الأسنان والطب التجديدي.

الكلمات المفتاحية: هيدروكسي أباتيت، التهاب دواعم السن، مستخلصات نباتية، مضاد للميكروبات.