

Année 2021

N° : MS2102021

## Mémoire de fin d'études

Pour L'obtention du Diplôme National de  
Spécialité en : « **pharmacie industrielle** »

Intitulé

**Détermination de la composition chimique et évaluation des  
activités antioxydante et antimicrobienne des huiles  
essentielles obtenues à partir de l'espèce marocaine *Syzygium  
aromaticum***

Présenté par :  
**Docteur Siham YANISSE**

Sous la direction du  
**Professeur Mustapha BOUATIA**

## Table des matières

I.	INTRODUCTION.....	5
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	6
1.	Matériel utilisé.....	6
a.	Matériel végétal .....	6
b.	Réactifs et solvants utilisés .....	6
c.	Souches fongiques et bactériennes .....	7
d.	Appareil.....	7
e.	Extraction et identification des huiles essentielles .....	7
2.	Méthodes.....	10
a.	Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	10
b.	Evaluation de l'activité antioxydante .....	11
3.	Analyses statistiques .....	13
III.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	14
1.	Composition chimique des huiles essentielles .....	14
2.	Activité antioxydante .....	15
a.	Activité de piégeage des radicaux libres : DPPH .....	15
b.	Test FRAP : ions ferriques (Fe <sup>3+</sup> ) réduisant le pouvoir antioxydant .....	18
3.	Activité antimicrobienne.....	19
IV.	CONCLUSION .....	22

## Remerciement

*A mon maître de stage : Pr. Mustapha Bouatia*

*Je vous remercie d'avoir partagé avec moi votre passion  
pour la recherche et l'encadrement. J'ai grandement  
apprécié votre soutien, votre engagement, et votre partage  
d'expérience tout au long de mon stage.*

*Je suis très reconnaissante de votre engagement et des  
efforts que vous avez faits pour le bon déroulement de  
stage.*

*A toute l'équipe du laboratoire de chimie analytique et  
de bromatologie*

*Je vous remercie d'avoir enrichi mes connaissances et  
de m'avoir guidé durant mon stage*

## Résumé:

Détermination de la composition chimique et évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles obtenues à partir de l'espèce marocaine *Syzygium aromaticum*

*Siham YANISSE, Mustapha BOUATIA*

La composition, les activités antimicrobiennes et antioxydante des huiles essentielles obtenues à partir du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) ont été étudiées. L'extraction a été réalisée par hydrodistillation en utilisant l'appareil Clevenger apparatus recommandé par la pharmacopée, les HE ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'effet antioxydant a été évalué à l'aide de deux dosages d'antioxydants in vitro en utilisant les méthodes DPPH et FRAP, le radical libre 2,2-diphényl picryl-hydrazyle (DPPH) et la détermination de la capacité de réduction totale par la méthode de transformation  $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$  (FRAP : ferric reducing antioxidant power). Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont été évaluées par la méthode de diffusion sur milieu solide (gélifié).

Vingt-quatre composés ont été identifiés dans les huiles de girofle par GC-MS. Le principal constituant du clou de girofle était l'eugénol avec un pourcentage de 63,68%.

Le résultat a montré que l'huile de clou de girofle avait un effet antioxydant puissant dans les deux essais in vitro, y compris le pouvoir réducteur de FRAP et de piégeage des radicaux DPPH. Le résultat a été comparé avec celui des antioxydants de référence BHA (hydroxyanisols butylés) et AA (Acide ascorbique). Sur la base de la mesure du diamètre d'inhibition, une activité antimicrobienne modérée a été élevée des huiles révélées contre toutes les souches de levures et modérée contre les souches bactériennes. Les huiles essentielles de girofle ont montré un effet antioxydant et une activité antimicrobienne considérables contre les souches bactériennes et fongiques, méritant une étude plus approfondie pour une application clinique dans le traitement des infections fongiques.

**Mots clés :** Activité antimicrobienne ; effet antioxydant ; huiles essentielles ; composés phénoliques ; *Syzygium aromaticum*.

## Abstract:

Determination of the chemical composition and evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from the moroccan species *Syzygium aromaticum*

*Siham YANISSE, Mustapha BOUATIA*

The composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils obtained from cloves (*Syzygium aromaticum*) have been studied. The extraction was carried out by hydrodistillation using the clevenger apparatus recommended by the pharmacopoeia, the EOs were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant effect was evaluated using two assays of antioxidants in vitro using the DPPH and FRAP methods, the free radical 2,2-diphenyl picryl-hydrazyl (DPPH) and the determination of the total reduction capacity by the  $Fe^{3+} + -Fe^{2+}$  transformation method (FRAP: ferric reducing antioxidant power). The antimicrobial activities of essential oils were evaluated by the method of diffusion on solid medium (agar). Twenty-four compounds have been identified in clove oils by GC-MS. The main constituent of clove was eugenol with a percentage of 63.68%.

The result showed that clove oil had a potent antioxidant effect in both in vitro assays, including the reducing power of FRAP and the scavenging of DPPH radicals. The result was compared with that of the reference antioxidants BHA (butylated hydroxyanisols) and AA (Ascorbic acid). Based on the measurement of inhibition diameter, moderate antimicrobial activity was elevated in oils shown against all yeast strains and moderate against bacterial strains.

Clove essential oils have shown considerable antioxidant effect and antimicrobial activity against bacterial and fungal strains, meriting further study for clinical application in the treatment of fungal infections.

Keywords: Antimicrobial activity; antioxidant effect; essential oils; phenolic compounds; *Syzygium aromaticum*.

عنوان:

تحديد التركيب الكيميائي وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات للزيوت الأساسية

المستخرجة من *Syzygium aromaticum*

سهام يانيس، مصطفى بوعطية

تمت دراسة المكونات، وأنشطة مضادات الميكروبات ومضادات الأكسدة للزيوت الأساسية المستخلصة من القرنفل *Syzygium aromaticum*. تم الاستخلاص عن طريق التقطير المائي باستخدام جهاز كليفانجر Clevenger apparatus الموصي به من قبل دستور الأدوية Pharmacopée وتم تحليل الزيوت الأساسية بواسطة كروماتوغرافيا الغاز إلى جانب قياس الطيف الكتلي (GC-MS) chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse وتم تقييم تأثير مضادات الأكسدة باستخدام مقياسين لمضادات الأكسدة في المختبر باستخدام طريقتين، الجذور الحرة DPPH وتحديد قدرة الاختزال الكلية FRAP بواسطة طريقة التحويل  $-Fe2 + Fe3$  (فراب: الحد من الطاقة المضادة للأكسدة الحديدية). تم تقييم الأنشطة المضادة للميكروبات للزيوت الأساسية من خلال طريقة الانتشار على وسط صلب (gélosé) تم تحديد أربعة وعشرين مركبًا في زيوت القرنفل بواسطة GC-MS. المكون الرئيسي للقرنفل كان الأوجينول بنسبة 63.68 بالمئة (%). أظهرت النتيجة أن زيت القرنفل له تأثير قوي كمضاد للأكسدة في كل من الاختبارات المخبرية، بما في ذلك القوة المختزلة لـ FRAP وكسح جذور DPPH.

تمت مقارنة النتيجة مع تلك الخاصة بمضادات الأكسدة المرجعية BHA (هيدروكسيانيزول بوتيل) و AA (حمض الأسكوربيك). بناءً على قياس قطر التثبيط *diamètre d'inhibition*، تم زيادة نشاط مضادات الميكروبات المعتدلة في الزيوت الموضحة ضد جميع سلالات الخميرة ومعتدلة ضد السلالات البكتيرية.

أظهرت الزيوت الأساسية للقرنفل تأثيرًا كبيرًا كمضاد للأكسدة ونشاطًا مضادًا للميكروبات وذلك على السلالات البكتيرية والفطرية، هذه النتائج تتطلب مزيدًا من الدراسة للتطبيق السريري في علاج الالتهابات الفطرية لفعاليتها على السلالات الفطرية المقاومة.

**الكلمات الدالة:** نشاط مضادات الميكروبات؛ تأثير مضاد للأكسدة زيوت أساسية؛ مركبات فينولية؛ *Syzygium aromaticum*.

## I. INTRODUCTION

L'incidence des infections fongiques et des infections nosocomiales a considérablement augmenté ces dernières années, en particulier chez les patients immunodéprimés. Bien qu'on dispose aujourd'hui de médicaments antifongiques, le traitement des mycoses reste difficile d'une part du fait du nombre limité de principes réellement efficaces et de leur coût très élevé et d'autre part lié à l'émergence de souches résistantes à certains antimycosiques usuels.

Le Maroc de par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Leurs propriétés, dues notamment à la fraction huile essentielle (HE), peuvent être mises à profit pour traiter les infections microbiennes en particulier fongiques (1).

L'huile de girofle est connue pour son utilisation pour protéger contre la dégradation oxydative des aliments par les radicaux libres (2). Il existe deux classes d'antioxydants, synthétiques et naturels. Les antioxydants synthétiques tels que les hydroxyanisols butylés (BHA) et les hydroxytoluènes butylés (BHT) ont été largement utilisés dans l'industrie alimentaire, même si leurs utilisations ont commencé à être remise en question en raison de leurs toxicités (3). Ainsi, le développement et l'utilisation d'antioxydants naturels et plus sûrs, plus efficaces obtenus à partir de sources botaniques, en particulier de plantes médicinales, sont souhaitables (3).

Le clou de girofle a été utilisée aussi comme analgésique pour les douleurs dentaires. Il est connu pour son effet anesthésique pour les maux de dents, les maux de tête et les douleurs articulaires (4,5). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a établi la dose journalière acceptable d'huile de clou de girofle chez l'homme à 2,5 mg / kg de poids corporel pour l'homme (5-7).

En outre, l'huile de clou de girofle a été répertoriée comme une substance « généralement considérée comme sûre » par la Food and Drug Administration des États-Unis lorsqu'elle administrée à des niveaux ne dépassant pas 1500 ppm dans toutes les catégories d'aliments (25, 8). Le but de ce travail est d'évaluer les activités antimicrobiennes (antibactérienne et antifongique) et l'effet antioxydant des huiles essentielles de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*).

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le travail a été réalisé au laboratoire de Chimie Analytique de la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat.

### 1. MATÉRIEL UTILISÉ :

#### a. Matériel végétal :

Le matériel végétal constitué de giroflier (clou de girofle) obtenu de la région de Rabat et Salé, séché et conservé à température ambiante.



*Figure 1 : Clou de girofle*

#### b. Réactifs et solvants utilisés :

L'effet antioxydant de l'huile de *S. aromaticum* a été évalué par la méthode de DPPH (2,2-diphényl picryl-hydrazyle) qui consiste à tester la capacité de l'extrait à piéger les radicaux libres et la méthode de FRAP (ferric reducing antioxidant power), qui consiste à tester la capacité de l'extrait à réduire le fer ferrique en fer ferreux. Le hydroxyanisols butylés (BHA) et

l'acide ascorbique (AA) ont été utilisés comme antioxydants de références. Les réactifs ont été fournis par le laboratoire de Chimie Analytique et de Bromatologie de la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

### **c. Souches fongiques et bactériennes :**

Les souches fongiques et bactériennes ont été fournis par le laboratoire de recherche de l'hôpital Ibn Sina de Rabat (hôpital de pédiatrie).

### **d. Appareil**

Les analyses ont été réalisées à l'aide du spectrophotomètre UV / Vis (SPECTROPHOTOMETRE RAYLEIGH UV-1800).

### **e. Extraction et identification des huiles essentielles :**

L'extraction des huiles essentielles (HE) a été effectuée par hydrodistillation au laboratoire de chimie analytique pendant 3H en utilisant le Cleavenger apparatus recommandée dans la pharmacopée Européenne (Européenne 1996). L'hydrodistillation est la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le rendement d'extraction a été calculé, déterminés sur la base du poids sec de la plante. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) utilisés pour identifier la composition des HE.



*Figure 2 : Appareil clevenger apparatus*

*(laboratoire de chimie anaytique de faculté de médecine et de Phrmacie de Rabat).*

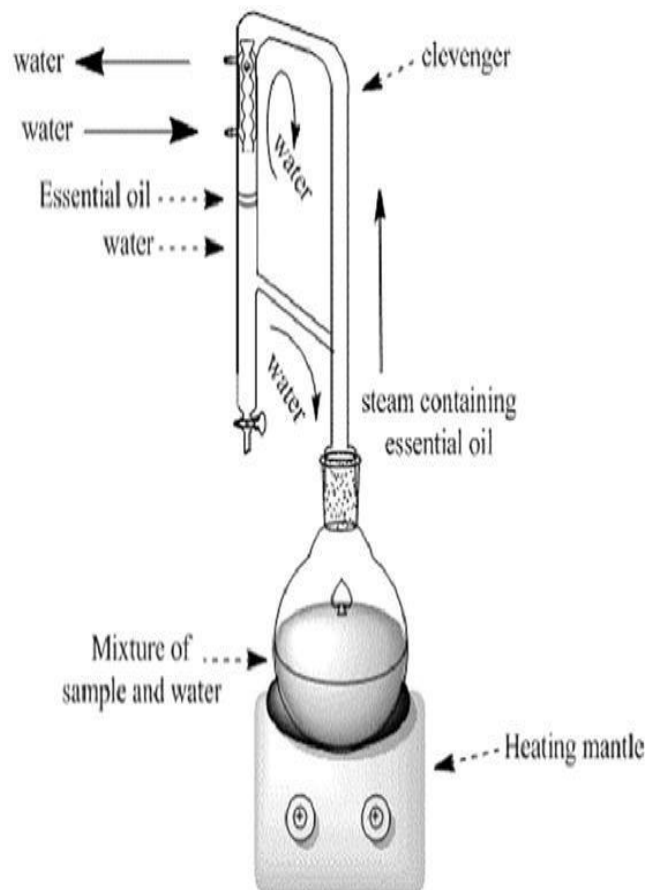


Figure 3: schéma de l'appareil clevenger apparatus

## 2. METHODES

### a. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'activité antibactérienne a été évaluée contre les souches suivantes

- *Pseudomonas aeruginosa* (bactéries à Gram négatif) ;
- *Staphylococcus epidermidis* Meti-R :
- Et deux *Staphylococcus* Meti-S (bactéries Gram-positives).

L'activité antifongique a été évaluée sur des souches fongiques : souches cliniques de *Candida albicans* et *non albicans*, souche clinique récurrente de candidose orale, cutanée et autres.

L'identification des isolats fongiques a été faite par des méthodes de microbiologie après stockage dans du dextrose Sabouraud.

Les contrôles positifs antibactériens réalisés avec des disques de gentamicine de 10 et 15 µg et les antifongiques témoins ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10% pour étudier leur activité antifongique sur des souches de levures isolées. Des gélules de fluconazole à 150 mg et un comprimé de terbinafine à 250 mg ont été ajoutés après broyage à 2 ml de DMSO à 10%.

### Technique de dispersion sur milieu solide (gélosé) :

Le pouvoir antimicrobien des différents extraits sur la croissance des levures et bactéries a été évalué par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Dans cette méthode, une boîte de pétri contenant 15 ml de gélose Sabouraud Chloramphénicol pour espèces fongiques et Mueller Hinton pour les espèces bactériennes, le milieu est inoculé par inondation avec une suspension contenant des colonies prélevées sur une culture fongique et diluée dans une solution saline physiologique, puis un disque stérile de papier whatman (6 mm) imbibé d'une quantité d'huile essentielle pure (5,10 et 15 µl) est déposé au centre de la gélose. Cette méthode a été réalisée selon la méthode de Hazzit et al (6, 8).

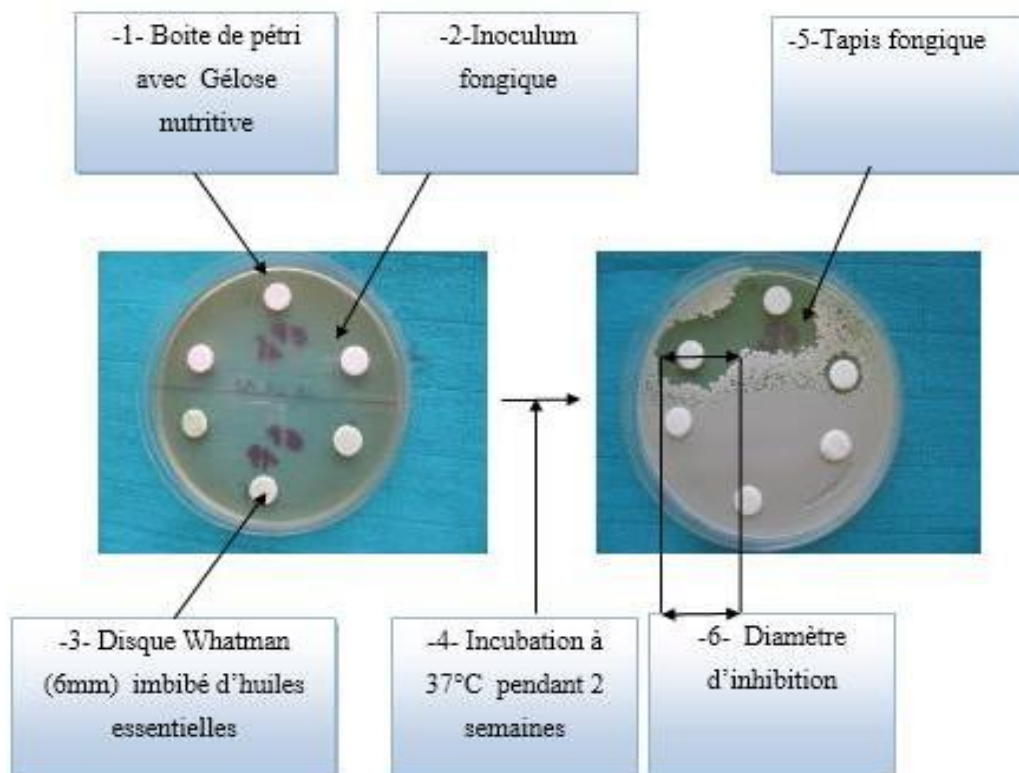


Figure 4 : Illustration de la technique de dispersion sur milieu gélosé

## b. Evaluation de l'activité antioxydante :

### Méthode de DPPH :

Consiste à tester in vitro l'activité antioxydante des huiles essentielles du clou de girofle par l'effet scavenger du radical DPPH.

Pour étudier l'activité anti-radicalaire des huiles essentielles, nous avons opté pour deux méthodes, la première méthode en utilisant le DPPH comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par (Brand-Williams, 1995). Dans ce test les **antioxydants réduisent** le diphényl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [18].

Pour déterminer le pouvoir antioxydant des extraits à l'aide de DPPH, l'extrait est mis à réagir (DPPH •) dans une solution méthanolique. Sous **sa forme radicalaire, le DPPH • absorbe à 517 nm**, et après réduction par un antioxydant, **l'absorption diminue progressivement en fonction de la concentration(9)**, l'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par la méthode décrite par Popovici et al (10) avec peu de modification. Brièvement, 50 µl des solutions d'extraits ont été ajoutés à 1950 µl DPPH (2,3 mg/100 ml préparée dans du méthanol),. Parallèlement à l'échantillon, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1950 µl de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par des solutions des antioxydants standards ou de références : le BHA et l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que l'échantillon et pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. Le pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH pour chaque concentration est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'inhibition de DPPH} = [(Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}) / Abs \text{ contrôle}] \times 100$$

$$I \% = \left( 1 - \frac{Ae}{Ao} \right) \times 100$$

**Ao** : l'absorbance sans échantillon

**Ae** : Absorbance avec l'échantillon

La courbe de la variation du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle testée a été tracé :  $I \% = f([IC])$ .

La concentration d'inhibition de 50% des radicaux DPPH (IC 50) a été déterminée en utilisant

L'équation de régression :  $I\% = f(C)$

## Méthode de FRAP :

Cette méthode est utilisée pour déterminer la capacité réductrice de l'huile de girofle. Il est basé sur une réaction redox dans laquelle un oxydant facilement réduit ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est utilisé dans l'excès stoechiométrique et les antioxydants agissent comme réducteurs(5). Certaines techniques impliquent la capacité de l'huile de girofle à réduire le complexe ferricyanure à la forme ferreuse .(11) Le dosage de l'antioxydant de réduction des ions ferriques (FRAP) ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a été utilisé pour déterminer le pouvoir réducteur de l'huile de girofle. Pour l'exécution de cette méthode, nous préparons des concentrations d'huile de clou de girofle entre (150-15  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) dans 1 mL d'eau distillée ont été mélangées avec du tampon phosphate de sodium (2,5 mL, 0,2 M, pH 6,6) et  $[[\text{K}_3\text{Fe} - (\text{CN})_6]$  ferricyanure de potassium] (2,5 mL, 1%). L'échantillon a été incubé à 50°C pendant 20 min. Des aliquotes (2,5 ml) d'acide trichloro-acétique (10%) ont été ajoutées au mélange. Ensuite, 2,5 ml de ces solutions a été mélangé avec de l'eau distillée (2,5 ml) et du  $\text{FeCl}_3$  (0,5 ml, 0,1%), et les absorbances ont été mesurées à 700 nm dans un spectrophotomètre. L'augmentation de l'absorbance des mélanges réactionnels indique une augmentation de la capacité de réduction.

### ***3. ANALYSES STATISTIQUES :***

Le résultat recueilli a été examiné à l'aide du logiciel Origin Pro (version 9.0) et enregistré sous la forme Moyenne  $\pm$  écart-type. L'analyse a été réalisée en utilisant des procédures ANOVA.

P < 0,050 était considéré comme significatif.

### III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 1. COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES :

Le résultat de l'identification a montré que 24 composants représentant 100% de l'huile l'échantillon avec une quantités élevée d'eugéno (63,68%). (Tableau 1).

Tableau 1 : composition qualitative et quantitative des huiles essentielles de *S. aromaticum* (%).

S/NO.	Name of constituent	Area %
1	Eugenol	63,68
2	Phenol-2-methoxy-4- (2-propenyl) -, acetates	13,28
3	Phenol --2-methoxy-3-(2-propenyl) -	10,11
4	Caryophyllenes.	5,97
5	1,4,7, -Cyclododecatriene, 1,5,9,9- 68676 1000062-61-9 93 tetramethyl-, Z, Z, Z-	2,29
6	(Z)-1-Methyl -4-(6-methylhept 5-en-2-ylidene) cyclohex-1-ene	0,71
7	Caryophyllene oxide	0,54
8	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methyl-ethyl)-, (1. alpha.,4a. beta.,8 a. alpha.)-	0,28
9	10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo [7.2.0] undecan-5. beta. -ol	0,12
10	(1R,3E,7E,11R)- 1,5,5,8-Tetramethyl -12-oxabicyclo [9.1.0] dodeca-3,7-dienes-	0,10
11- 24	Others	0,68

## 2. ACTIVITE ANTIOXYDANTE :

Pour déterminer la capacité antioxydante totale des extraits de plantes ou de composés purs, plusieurs méthodes ont été utilisées. Cependant, peu ont été largement utilisés en raison de la difficulté de mesurer la capacité antioxydante totale et des limites associées aux problèmes méthodologiques et aux sources de radicaux libres. Dans notre étude, l'activité antioxydante de l'huile de girofle a été comparée à celle du BHA, du BHT et de l'acide ascorbique hydrosoluble. L'activité antioxydante de l'huile de clou de girofle, de l'acide ascorbique et du BHA a été évaluée par deux méthodes in vitro : piégeage du DPPH et la méthode du FRAP.

### a. Activité de piégeage des radicaux libres : DPPH

Les résultats obtenus sont détaillés ci-dessous.

Tableau 2 : Résultats du piégeage des radicaux DPPH par les huiles essentielles de *S. aromaticum* (%).

Sample	Concentration µg/ml	Pourcentage d'inhibition du DPPH (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<i>S. aromaticum</i>	15	42,28	25
	25	49,81	
	50	54,29	
	100	58,90	
	250	77,16	
	530	83,42	
AA	15	23,65	180
	25	28,53	
	50	34,65	
	100	60,41	
	250	68,94	
	300		
BHA	15	23,74	170
	25	26,94	
	50	27,94	
	100	32,96	
	250	68,03	
	300	70,77	

Le résultat est la moyenne de trois mesures parallèles.

AA : acide ascorbique

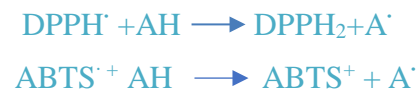
BHA : hydroxyanisole butylé

La DPPH est l'une des méthodes spectrophotométriques les plus largement utilisées pour déterminer les propriétés antioxydantes des aliments, des boissons et des extraits végétaux (9).

Les composés radicalaires chromogènes peuvent réagir directement avec les antioxydants. De plus, la méthode de piégeage du DPPH a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des composés en raison de leur procédure simple, rapide, sensible et reproductible. (10)

Diverses méthodes sont actuellement employées pour évaluer l'activité antioxydante des composés phénoliques végétaux. Les dosages chimiques sont basés sur leur capacité à piéger les radicaux libres synthétiques, en utilisant une variété de systèmes générateurs de radicaux et de méthodes pour la détection du point final d'oxydation. Les méthodes de piégeage des radicaux ABTS + ou DPPH sont des procédures spectrophotométriques courantes pour déterminer les capacités antioxydantes des composants.

Lorsqu'un antioxydant est ajouté aux radicaux, il y a un degré de décoloration dû à la présence des antioxydants qui inverse la formation du radical DPPH.



Les tests ont été appliqués pour déterminer l'activité antioxydante des composants purs. (5, 11)

Dans ce travail, la méthode de piégeage des radicaux DPPH a été utilisée pour évaluer la détermination des activités potentielles de piégeage des radicaux de l'huile de girofle. Le DPPH a été utilisé pour évaluer l'efficacité de piégeage des radicaux libres de diverses substances antioxydantes.(10)

Dans ce procédé, les antioxydants ont pu réduire le radical DPPH stable en diphényl-picrylhydrazine de couleur jaune. La méthode est basée sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène en raison de la formation de la forme non radicalaire DPPH – H par la réaction. Le DPPH est généralement utilisé comme réactif pour évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres des antioxydants (12). Le DPPH est un radical libre stable qui accepte un électron ou un radical hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable.

Avec cette méthode, il était possible de déterminer le pouvoir anti-radicalaire d'un antioxydant en mesurant la diminution de l'absorbance de DPPH à 517 nm avec un changement de couleur du violet au jaune, l'absorbance a diminué lorsque le DPPH a été piégé par un antioxydant par don d'hydrogène pour former une molécule de DPPH stable. Sous forme radicalaire, cette molécule avait une absorbance à 517 nm qui disparaissait après acceptation d'un électron ou d'un radical hydrogène d'un composé antioxydant pour devenir une molécule diamagnétique stable. (13)

Le résultat montre une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la concentration du radical DPPH en raison de la capacité de piégeage de l'huile de clou de girofle et des standards. L'Acide ascorbique et le BHA ont été utilisés comme antioxydants de références. L'effet de piégeage de l'huile de clou de girofle et des standards sur le radical DPPH a diminué dans l'ordre suivant : huile de clou de girofle > BHA > AA, qui étaient de 77,16, 68,03 et 60,41%, à la concentration de 250 µg / ml, respectivement.

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH de l'huile de clou de girofle a également augmenté avec une concentration croissante ( $R^2 : 0,9982$ ). La valeur EC50 pour l'huile de clou de girofle était de 25 µg / mL. Une EC50 inférieure indique une activité de piégeage des radicaux libres DPPH plus élevée.

Le piégeage des radicaux libre est l'un des mécanismes connus par lesquels les antioxydants inhibent l'oxydation des lipides. Ce test est un test standard dans les études d'activité antioxydante et offre une technique rapide pour cribler l'activité de piégeage des radicaux de composés spécifiques (14).

## **b. Test FRAP : ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ) réduisant le pouvoir antioxydant**

La capacité de don d'électrons selon des études précédentes, reflétant le pouvoir réducteur, des composés bioactifs était associée à une activité antioxydante. (15, 16)

Le test FRAP tire parti d'une réaction de transfert d'électrons dans laquelle un sel ferrique est utilisé comme oxydant. (8).

Dans cette méthode, la couleur jaune de la solution à tester change en différentes nuances de vert et de bleu en fonction du pouvoir réducteur des échantillons d'antioxydants. La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.

Le résultat de cet essai montre que l'huile de girofle avait un pouvoir réducteur efficace en utilisant la méthode de réduction du ferricyanure de potassium par rapport aux antioxydants standards de synthèse (BHT, acide ascorbique). Pour les mesures de la capacité réductrice de l'huile de girofle, la transformation  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  a été étudiée en présence d'huile de girofle en utilisant la méthode d'Oyaizu (1986). À différentes concentrations (25 à 300  $\mu g / ml$ ), l'huile de clou de girofle a démontré une puissante capacité de réduction ( $R_2 : 0,975$ ) et ces différences étaient statistiquement très significatives ( $p < 0,05$ ). Le pouvoir réducteur de l'huile de clou de girofle, de l'acide ascorbique et du BHT a augmenté régulièrement avec l'augmentation de la concentration des échantillons. Le pouvoir réducteur de l'huile de clou de girofle et des composés standard présentaient l'ordre suivant : huile de clou de girofle > BHT > acide ascorbique. Les résultats sur le pouvoir réducteur démontrent les propriétés de donneur d'électrons de l'huile de girofle neutralisant ainsi les radicaux libres en formant des produits stables. Le résultat de la réaction de réduction est de mettre fin aux réactions radicalaires en chaîne qui pourraient autrement être très dommageables.

### 3. ACTIVITES ANTIMICROBIENNES

L'activité antimicrobienne in vitro des huiles essentielles de *S. aromaticum* contre les espèces de microorganismes, estimée par le diamètre de l'inhibition, variait selon les souches (tableaux 3 et 4).

Tableau 3 : Activité antifongique des huiles essentielles de *S. aromaticum* estimée par le diamètre de la zone d'inhibition (y compris le diamètre du disque, 6 mm).

-

Levures	HE 5 µl/disc	HE 10µl/disc	HE 15µl/disc	Fluconazole 10 µl/disc)	Terbinafine 10 µl/disc)
<i>C.. Albicans</i>	22±2	24,3± 1,1	26,6 ±0,5	19 ±1	30 ± 1
<i>C. Albicans</i>	21,6± 2	24,6±0,5	40±1	26± 1	21 ±1
<i>C. Albicans</i>	27,3± 2,5	26± 0,5	39 ±1	29 ±1	22±1,7
<i>C. Albicans</i>	28,3±2,8	31,3±1,5	40 ±1	19±2	19,3±0,5
<i>C. Albicans</i>	25,3± 1,5	27,3± 0,5	29,3±1,1	23,3 ±0,5	20±1,7
<i>C. Albicans</i>	24,4±2,0	27,3±2	39,3±1,1	16±1	20 ±1
<i>C. Tropicalis</i>	21,3 ±3	20± 1,1	23 ±0,5	17,3±0,5	27±0,5
<i>C. Tropicalis</i>	22± 2,6	27±1	29 ±1,7	20±1	24,6±0,5
<i>C Tropicalis</i>	32± 6,8	43±1,7	44 ±1	30±2	33,7±1,5
<i>C Tropicalis</i>	27,3±2,5	29±1	35 ±1,5	26,3±1,5	30 ±1
<i>C. Tropicalis</i>	25±1,5	26±0,5	29 ±1,5	23,3 ± 1	28 ±1
<i>C. Tropicalis</i>	22±1	26±0,5	29±1,5	27±1,7	30±1
<i>C.Glabrata</i>	27 ±2,5	22±1	29,7±0,5	22,6±1,5	29±1
<i>C. Glabrata</i>	22±3	25 ±1	30 ±1	22,6±0,5	28±1,1
<i>C.Glabrata</i>	24±1	27±1	27±1,5	30±1	28±1
<i>C. Parapsilosis</i>	26 ±1,7	27 ±1	31±1,5	28,6±0,5	30±0,5
<i>C. Parapsilosis</i>	39± 1,15	39 ±1,7	44±1,5	30±1	35±0,5

Les valeurs exprimées sont des moyennes de trois mesures parallèles

Tableau 4 : Activité antibactérienne des huiles essentielles de *S. aromaticum* estimée par le diamètre de la zone d'inhibition (y compris le diamètre du disque, 6 mm).

Bactéries	HE	HE	HE	Gentamicine	Gentamicine
	5 µl/disc	10µl/disc	15µl/disc	10 µg/disc	15 µg/disc
<i>Staphylococcus Meti-S1</i>	0	11 ±0,5	13 ±1	15±1	25±0,5
<i>Staphylococcus Meti-S 2</i>	11± 1	15± 0,5	16± 0,5	26 ±0,5	28±1
<i>Staphylococcus</i>	16 ±0,5	25 ±0,5	25± 0,5	30 ±0,5	31±1
<i>epidermidisMulti-resistant</i>	0	0	10 ±0,5	12 ±3	20±0,5
<i>Pseudomas aeriginosa</i>					

Les valeurs exprimées sont des moyennes de trois mesures parallèles.

Cette huile essentielle a montré un large spectre d'activité contre une variété de levures pathogènes et d'espèces bactériennes.

Le niveau d'activité le plus élevé a été observé contre différentes espèces de *Candida*, les zones d'inhibition les plus fortes étant de 40 à 45 sur les espèces *Candida tropicalis* et *C parapsilosis* pour 10 µl d'huile essentielle (Tableau 3).

En comparant les diamètres moyens d'inhibition de la croissance des souches de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida parapsilosis* avec les souches de fluconazole et terbinafine, la différence est statistiquement significative (P <0,05).

En analysant les diamètres moyens d'inhibition des souches de *Candida glabrata*, la différence est statistiquement significative avec la terbinafine (P <0,05) et non significative pour une seule souche de *Candida glabrata* avec le fluconazole (p = 1).

Nos résultats sont en parfaite adéquation avec ceux rapportés par l'équipe de Palmeira-de- Oliveira et al (17) qui ont démontré que l'eugénol, qui est le principal composé des huiles essentielles de clou de girofle, est considéré comme un très bon inhibiteur de croissance des espèces du genre *candida spp* et qui posent également des problèmes de résistance aux antifongiques de références. (14, 18)

Une activité antimicrobienne légère à modérée observée avec un diamètre d'inhibition maximale de 20 mm observées pour la souche de *Staphylococcus epidermidis Meti R* à 10 µl des huiles essentielles, le léger effet a été observé sur *Pseudomonas aeruginosa* (tableau 4).

En comparant les diamètres moyens d'inhibition de croissance des souches de *Staphylococcus Meti-S1*, *Staphylococcus Meti-S 2* et *Pseudomas aeruginosa* avec celui de la gentamicine, la différence est statistiquement significative. Pour *Staphylococcus epidermidis* Multi résistant, la différence n'est pas statistiquement significative ( $p > 0,05$ ).

Ces résultats sont en accord avec d'autres études rapportant que l'huile essentielle de clou de girofle a montré une activité antibactérienne contre un grand nombre de *S. epidermidis* et *S. aureus* résistants à la méthicilline (Enzo et Susan, 2002.(19) L'huile semble également être efficace contre les microorganismes Gram-positifs et Gram-négatifs(20, 21).

Dans des études antérieures, l'activité antibactérienne de différents extraits de *S. aromaticum* a été démontrée contre des bactéries pathogènes, notamment *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. (7, 22)

Il est difficile d'attribuer l'activité de mélange naturel et complexe comme les huiles essentielles à un constituant particulier, néanmoins il est raisonnable de supposer que l'activité de cette huile peut être liée à la présence d'une concentration élevée (63,68%) d'eugénol. L'importance des groupes hydroxyle phénoliques pour l'activité antimicrobienne des huiles essentielles a déjà été rapportée. (21, 22).

#### IV. CONCLUSION :

En conclusion, les résultats de la présente étude indiquent que l'extrait d'huile de girofle de *S. aromaticum* a un potentiel intéressant en tant qu'agent thérapeutique contre les bactéries et les champignons pathogènes pour l'homme. Le clou de girofle est un agent à large spectre qui inhibe non seulement les dermatophytes, les espèces *Aspergillus* et *Candida* (telles que *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*), mais également les isolats de *C. albicans* résistants au fluconazole. *Krusei*, qui est intrinsèquement résistant au fluconazole, et *C. glabrata*, dont la résistance est facilement inductible.

De plus, l'huile de clou de girofle s'est avérée être un antioxydant efficace dans différents tests in vitro, y compris le pouvoir réducteur, l'élimination des radicaux DPPH, lorsqu'elle est comparée à des composés antioxydants standard tels que le BHA et le BHT, un antioxydant naturel et l'acide ascorbique qui est un analogue soluble du tocophérol. Sur la base de nos résultats, il peut être utilisé pour minimiser ou prévenir l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires et pharmaceutiques, retarder la formation de produits d'oxydation toxiques, maintenir la qualité nutritionnelle et prolonger la durée de conservation des produits alimentaires et pharmaceutiques.

Les résultats de cette étude valorisent *S. aromaticum* marocain comme plante médicinale endémique pouvant être une source de composés actifs biologiques. Cette plante peut protéger notre organisme contre les effets nocifs des radicaux libre

## REFERNCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Rabenhorst J. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996 ;46(5-6):470-4.
2. Gülçin İ, Şat İG, Beydemir Ş, Elmastaş M, Küfrevioğlu Öİ. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food chem.* 2004 ;87(3):393-400.
3. Scalbert A, Manach C, Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *CritRevFood Sci.* 2005 ;45:287-306.
4. Anderson WG, McKinley RS, Colavecchia M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *N Am J Fish Manag.* 1997 ;17(2):3017
5. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996 ;239(1):70-6.
6. Européenne P. Sainte Ruffine: Conseil de l’Europe Maisonneuve SA. 1996.
7. Feres M, Figueiredo L, Barreto I, Coelho M, Araujo M, Cortelli S. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. *J Int Acad Periodontol.* 2005 ;7(3):90-6.
8. Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo A, Faleiro M, Miguel MG. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chem.* 2009;116(3):714-21.
9. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Sci Technol.* 1995 ;28(1):25-30.
10. Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. Evaluation de l’activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. 2010.

11. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. *J Jpn Nutr Diet.* 1986 ;44(6):307-15.
12. ElHadj Ali IB, Zaouali Y, Bejaoui A, Boussaid M. Variation of the chemical composition of essential oils in Tunisian populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut.(Lamiaceae) and implication for conservation. *Chem Biodivers.* 2010 ;7(5):1276-89.
13. Gülçin İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicol.* 2006 ;217(2-3):213-20.
14. Amarowicz R, Pegg R, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil J. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chem.* 2004 ;84(4):551-62.
15. Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J Agric Food Chem.* 2003 ;51(23):6657-62.
16. Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J Agric Food Chem.* 2002 ;50(6):1619-24.
17. Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz J, et al. Anti-Candida activity of essential oils. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9(11):1292-305.
18. Siddhuraju P, Mohan P, Becker K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food chem.* 2002 ;79(1):61-7.
19. Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chem.* 2007 ;102(4):1233-40.
20. Zaika LL. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination1. *J Food Saf.* 1988;9(2):97-118.

21. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 1998;26(2):118-
22. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36(3):162.

