

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri
Faculté de Médecine
TIZI OUZOU



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

Département de Pharmacie
N° D'ordre :

٢٠٢٤/٢٠٢٣

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté sous forme d'article et soutenu publiquement
En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Le : 22/06/2024

Sous le Thème

THEME

Étude des activités antioxydante, antibactérienne et antibiofilm de l'extrait aqueux
du clou de girofle en vue d'une formulation de dentifrice

Réalisé par :

Mlle. Imane BERKANI
Mlle. Ouardia HERKANE
M. Nabil HOUALI

Encadré par :

Promoteur : Dr H. SEBBANE MCB
Co-promotrice : Dr N. BELKAID MAHU

Membres du jury

Pr. M. MAMOU	Professeur	Faculté de Médecine, UMMTO	Président
Dr. A. DAHMOUNE	MCA	Faculté de Médecine, UMMTO	Examinatrice
Dr. I. MOUALEK	MCA	Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, UMMTO	Examineur
Dr. K. DOUFENE	MCB	Faculté de Médecine, UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2023-2024

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer l'innocuité ainsi que le potentiel antioxydant et antimicrobien de l'extrait aqueux du clou de girofle (EACG) *Syzygium aromaticum* acheté chez un herboriste de la ville de Tizi-Ouzou. La richesse de l'EACG en polyphénols a été appréciée qualitativement par une RP-HPLC et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins, étaient de $15 \pm 0,1$; $07,25 \pm 1,18$ et $03 \pm 0,06$ mg eq/g poudre, respectivement. Six molécules phytochimiques (02 molécules de flavonoïdes et 04 molécules d'acides phénoliques). Le potentiel antioxydant a été déterminé par le test de la capacité antioxydante total (TAC), le test de piégeage du radical libre (DPPH) et le test de la réduction de fer (FRAP), l'activité antioxydante exprimée par la capacité totale était de $106 \pm 0,71$ mg eq AA/g de poudre, alors que les résultats de DPPH et le FRAP exprimés par IC_{50} et $DO_{0,5}$ étaient de $0,55 \pm 0,01$ mg eq/mL et $0,0519 \pm 0,009$ mg/mL, respectivement. L'étude de l'activité antibactérienne et antibiofilm a été menée par la technique de microdilution sur milieu liquide et rouge congo respectivement, l'EA a présenté des activités antibactérienne ($CMI=5,46$ mg/mL, $CMB= 21,87$ mg/mL) et antibiofilm ($CMIB=43,75$ mg/mL) à l'égard de *Staphylococcus aureus* ATCC25923. L'activité hémolytique a été étudié par spectrophotométrie et le test d'innocuité a montré l'absence d'effet hémolytique de l'EACG. Les potentiels antibactérien et antioxydant d'EACG ont été exploités dans la formulation d'un dentifrice à base d'EACG. L'effet bénéfique de son incorporation dans la formulation du dentifrice, a montré de meilleures activités antibactérienne, antibiofilm et antioxydante comparativement à celles du dentifrice de base. Ces résultats sont une preuve d'un effet synergique entre les ingrédients du dentifrice et de l'EACG. Les résultats de cette étude démontrent que l'EACG peut être intégré dans les formulations pharmaceutiques en Algérie, notamment celles orientées vers les produits d'hygiène dentaire.

Mots clés : Activité biologique, dentifrice, screening phytochimique, *Syzygium aromaticum*

Abstract

The aim of this study was to evaluate the safety and antioxidant and antimicrobial potential of the aqueous clove extract (ACE) *Syzygium aromaticum* purchased from a certified herbalist in the city of Tizi-Ouzou. The polyphenol richness of (ACE) was evaluated quantitatively and qualitatively, validated by a RP-HPLC. The antioxidant potential was determined by TAC, DPPH and FRAP tests. The antibacterial activity was carried out by the diffusion technique on Mueller Hinton agar and red congo. The antihemolytic power was driven by spectrophotometry. The antibacterial and antioxidant potential of AEC has been exploited in a formulation of a toothpaste based on ACE. The polyphenol levels, flavonoids and tannins, were $15 \pm 0,1$, $07,25 \pm 1,18$ and $03 \pm 0,06$ mgeq/g powder, respectively. 06 phytochemical molecules (02 flavonoids and 04 phenolic acid) were identified by RP-HPLC. The antioxidant activity in total capacity was 106 ± 0.71 mg eq AA/g powder, whereas the DPPH and FRAP results in IC_{50} and $DO_{0,5}$ were $0,55 \pm 0,01$ and $0,0519 \pm 0,009$ mg/ml, respectively. EA showed antibacterial activity ($CMI=5,467$ mg/ml, $CMB=21,875$ mg/ml) and antibiofilm ($CMIB=43,75$ mg/ml), against *S. aureus* ATCC25923. The safety test showed that the EACG is not hemolytic. The beneficial effect of the incorporation of EACG in the formulation of the toothpaste, showed better activities: antibacterial, antibiofilm and antioxidant compared to those of the basic toothpaste. These results are proof of a synergistic effect between ACE toothpaste ingredients. The results

of this study demonstrate that ACE, can be integrated in pharmaceutical formulations, in Algeria, in Algeria, particularly those focused on dental hygiene products.

Keywords : Biological activity, toothpaste, phytochemical screening, *Syzygium aromaticum*

I. Introduction

Syzygium aromaticum, synonyme : *Eugenia caryophyllata*, est un arbre de la famille des Mirtaceae, originaire des îles Maluku en Indonésie [1], il est souvent cultivé dans les zones côtières à des altitudes maximales de 200 m au-dessus du niveau de la mer [2]. Il est obtenu à partir des boutons floraux du Giroflier, il est très utilisé en médecine traditionnelle partout dans le monde car il est doté de multiples vertus thérapeutiques. Sa richesse en métabolites secondaires lui confère plusieurs activités biologiques tel que les activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anticancéreuses et antioxydantes [3]. En effet, les enquêtes ethnobotaniques ont démontré, que *S. aromaticum* est utilisé pour le traitement des maux de dents, de la bouche, de la gorge, de l'inflammation de la muqueuse buccale, de la mauvaise haleine, etc. [4,5]. L'eugénol est le principal composant du clou de girofle, qui se trouve en grande quantité dans l'huile essentielle, mais à de faible quantité dans l'extrait aqueux. Ce dernier est non cancérigène, il agit comme un antalgique en médecine dentaire en entravant les canaux Na^+ régulant la tension dans les neurones principaux des dents [6].

Les caries dentaires sont une maladie bactérienne locale, progressive et transmissible [7]. Malgré l'augmentation de l'utilisation des produits de soins buccaux qui se prétendent sains et naturels, on dispose de peu de données probantes concernant leurs effets bénéfiques réels [8]. Il a également été constaté que les propriétés antimicrobiennes et antibiofilm de ces extraits peuvent varier en raison de leurs interactions avec d'autres composants présents dans les formulations commerciales [9]. Il est essentiel de tester chaque nouvelle formulation de dentifrice dans sa version finale. C'est dans cette optique que s'inscrit cette étude qui vise à évaluer les propriétés antimicrobienne, antibiofilm et antioxydante de l'EACG dans sa formulation finale. Cette étude a été menée afin d'approuver l'utilisation traditionnelle du clou de girofle en vue de leur incorporation dans les formulations pharmaceutiques destinées à l'hygiène buccale. Les buts sont la prévention, le traitement des caries dentaires et des inflammations de la gencive tout en favorisant l'utilisation des produits naturels issus de plantes ,et en réduisant l'utilisation des produits chimiques souvent nocif pour la santé.

II. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal est représenté par le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*). Ce dernier a été mis à notre disposition par un herboriste avec une fiche de traçabilité certifiant l'appartenance de l'échantillon à l'espèce citée.

2. Préparation de l'échantillon

Les échantillons ont été ensuite séchés par étuvage à 40°C, comme ça a été décrit par Madiélé et al. [10], puis broyés à l'aide d'un broyeur électrique, dans le but d'obtenir une poudre

homogène [11]. La poudre a été stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à son utilisation.

3. Préparation des extraits aqueux

Les EACG sont obtenus par macération d'une prise d'essai de 10g de poudre introduite dans un ballon contenant 100 ml d'eau distillée selon la méthode décrite par Ghedadba et *al.* [12]. L'ensemble a été maintenu sous agitation magnétique pendant 24 heures à une température ambiante. Une filtration grossière a été effectuée avec une passoire, le filtrat obtenu a été ensuite filtré sur papier whatman n°1 [13]. Ce dernier a été lyophilisé puis conservé dans des flacons stériles hermétiquement fermés (parafilmés) et stockés à +4°C.

4. Détermination du rendement d'extraction

La masse de l'EACG est déterminé par la différence entre le poids du tude ECBU plein et la masse du tude ECBU vide, et le rendement est calculé selon la formule suivante [14] :

Rendement (%) = (Masse d'extrait sec/Masse de poudre) *100

5. Etude phytochimique

5.1. Etude quantitative

5.1.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des EACG a été déterminée par la méthode adaptée de Singleton et Ross avec le réactif Folin-Ciocalteu. Selon Ouadan et *al.* [15], 200µl de l'extrait (0,1mg/ml) ont été mélangés avec 1000µl du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 800µl de carbonate de sodium à 7% (Na₂CO₃). L'ensemble a été incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 60 minutes et la lecture a été effectuée contre un blanc à 760nm à l'aide d'un spectrophotomètre, en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (0,01-0,1mg/ml, Y= 7,684X et R²=0,997). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide gallique (mg EAG) par gramme de poudre.

5.1.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par Rachedi et *al.* [16]. Dans un tube à hémolyse en verre, un volume de 100µl d'extrait (2mg/ml) a été mélangée avec 650µl d'eau distillée et 300µl de méthanol. Après 5 minutes, 20µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10% et la même quantité d'acétate de potassium (CH₃COOK) ont été additionnés et le milieu est mélangé vigoureusement. L'absorbance a été lue après incubation de 30 minutes à l'obscurité à 420 nm contre le témoin. Différentes concentrations (0,01-2mg/ml) préparées à partir d'une solution mère de quercétine ont permis de tracer la courbe d'étalonnage (Y=0,984 X et R²= 0,984). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine (mg EQ) par gramme de poudre.

5.1.3. Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés a été déterminée selon la méthode de Larwence et *al.* [17]. 1ml de l'extrait (1 mg/ml) a été ajouté à 75ml d'eau distillée puis mélangés vigoureusement. Ensuite, un volume de 10ml du réactif de Folin-Denis et 20ml de la solution saturée de carbonate de sodium (CO_3Na_2) ont été additionnés sous agitation mécanique. Le mélange obtenu a été laissé à température ambiante pendant 30 minutes à l'obscurité et l'absorbance a été mesurée à 760 nm. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide tannique (mg EAT) par gramme de poudre en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide tannique ($0,1-1\text{mg/ml}$, $Y=0,807X$ et $R^2= 0,994$).

5.2. Etude qualitative par RP-HPLC

La RP-HPLC a été réalisée à l'aide d'un système Shimadzu LC – 20 Chromatographie liquide Ultimate-1100 équipé d'un dégazeur, d'une pompe quaternaire, d'un échantillonneur automatique, d'un four à colonne et d'un détecteur ultraviolet (UV). La séparation a été effectuée à l'aide d'une colonne Hypersil BDS C18 (250 mm×4,6 mm). La température de la colonne a été maintenue à 30°C, le volume d'injection était de 5 μl à une concentration de 0,16g/ml d'EACG dissous dans du méthanol. La phase mobile à gradient utilisée est composée de méthanol (A) et de 0,2 % d'acide acétique dans l'eau distillée (B). Le débit a été maintenu à 1,5 ml/min. Les temps de rétention des différents étalons ont été utilisés pour identifier la composition de l'EACG. L'identification des composés chimique de l'EACG est déterminé en se référant aux temps de rétention des étalons standards utilisés.

6. Activité antioxydante

6.1. Capacité antioxydante totale (TAC)

La méthode utilisée est celle adaptée par Hadjadj et *al.* [18], elle consiste à introduire dans un tube 100 μl d'EA préparé a une concentration de 1mg/ml mélangé avec 1ml de réactif de molybdate (H_2SO_4 (0,6 M), Na_2PO_4 (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Après l'incubation a 95°C pendant 90 minutes, l'absorbance a été mesurée à 695 nm. À partir d'une courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (0-0,5 mg/ml, $Y=3,490X$ et $R^2=0,005$), les résultats obtenus ont été exprimés en milligrammes équivalents d'acide ascorbique (mg EAA/g) par gramme de poudre.

6.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les EACG a été déterminé selon la méthode décrite par Bougandoura et *al.* [19]. Un ml de l'EACG à différentes concentrations (0.01-0.1ml) a été mélangé avec 1 ml de solution tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) et 1 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%. L'ensemble a été incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 minutes, ensuite 1 ml de TCA à 10% a été ajouté pour stopper la réaction et les tubes ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes. Un aliquote (1 ml) de surnageant a été combinée avec 1 ml d'eau distillée et 0.2ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été faite à 760nm contre un blanc. Le pouvoir réducteur a été exprimé par l'augmentation de la densité optique de l'échantillon mesurée à 760

nm, en utilisant l'acide ascorbique comme étalon (0-0,1mg/ml, $Y=8,198X$ et $R^2=0,988$). Les résultats ont été exprimés en EC_{50} qui reflète la concentration d'antioxydant requise pour obtenir une absorbance de 0,5 [20]. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

6.3. Test de piégeage du radical libre (DPPH)

Selon Gülçin et al. [21], 50 μ l de l'extrait à différentes concentrations (de 0,01 à 3mg/ml) ont été ajoutés à 1 ml de la solution méthanolique de DPPH à 0,1 mM. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 μ l de méthanol avec 1 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance a été faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (Inh%), selon l'équation présentée ci-dessous et les valeurs de l'IC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (0-1mg/mL, $Y=19,33 \ln(x)+97,08$ et $R^2=0,981$), selon l'équation suivante :

$$\text{Inh\%} = [(\text{Absorbance contrôle} - \text{Absorbance test}) / \text{Absorbance contrôle}] * 100$$

Dont : Absorbance contrôle : Absorbance des mélanges de solutions DPPH sans extrait.

Absorbance test : Absorbance des mélanges DPPH contenant l'extrait.

7. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'EA contre *S. aureus* ATCC 25923 a été déterminée par la méthode de microdilutions sur microplaque de 96 puits, en utilisant du bouillon BHIB, à partir d'une suspension bactérienne standardisée de 18 heures (DO : 0.08 à 0.1 à $\lambda_{625\text{nm}}$). Nous avons utilisé le protocole décrit par Klančnik et al. [22] qui a été modifié comme suit : chaque puit contient 60 μ l du BHIB, 60 μ l d'EA à différentes concentrations (de 350 à 0,17 mg/ml), à partir d'une solution mère (350mg/ml) et 60 μ l d'une suspension bactérienne. Trois témoins ont été utilisés : deux témoins négatifs (BHIB seul et BHIB avec les différentes dilutions d'EA) et un témoin positif (BHIB avec la suspension bactérienne). Après une incubation à 37 °C pendant 18 heures, 40 μ L de résazurine (0,05 g/ml) ont été ajoutés dans chaque puit, puis ré-incubés pendant 03 heures afin d'évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI). La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) a été déterminée par ensemencement des puits négatifs sur la gélose Chapman [23]. La CMB a été définie à partir de la plus faible concentration ayant pas donnée de croissance bactérienne sur la gélose. Le rapport CMB/CMI a été utilisé pour estimer l'activité antibactérienne de l'EA : si $CMB/CMI \leq 4$, l'effet est bactéricide et si $CMB/CMI > 4$, l'effet est bactériostatique [24].

8. Activité antibiofilm

L'activité antibiofilm des extraits aqueux actifs a été étudiée contre la souche de *S. aureus* ATCC 25923 préalablement évaluée pour sa capacité à former un biofilm, et ce par la méthode de diffusion de disque sur gélose au rouge congo (GRC) [25]. Des disques de papier Wattman ($\varnothing = 6$ mm), imprégnés avec 30 μ L d'extrait à différentes concentrations (de 350 à 0,17 mg/ml) ont été déposés sur la surface de GRC, préalablement ensemencée par une solution standardisée

de *S. aureus* (DO : 0.08 à 0.1 à $\lambda_{625\text{nm}}$). De l'eau distillée stérile et de la vancomycine ont été utilisés comme témoins négatif et positif respectivement. Après 1 heure au réfrigérateur, les boîtes ont été incubées pendant 24 h à 37° C, le pouvoir antibiofilm a été apprécié par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (mm) autour de chaque disque [26].

9. Test d'innocuité d'EA

9.1.Préparation de la suspension d'hématies

Le sang utilisé pour cette étude provient de personnes volontaires, saines, non-fumeuses et ne consommant pas d'alcool. Le sang a été conservé au réfrigérateur dans des tubes héparinés. Après une centrifugation du sang (2500 tr/min pendant 10 min à 4°C), le plasma a été éliminé. Le culot sanguin a été lavé et centrifugé (3 fois à 2500 tours par minute pendant 10 min à 4°C) avec du tampon PBS: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 123 mmol/L, Na_2HPO_4 :27 mmol/L, NaCl :123 mmol/L; pH 7.4 [27]. La concentration finale de la suspension d'hématies (SH) a été fixée à 2%.

9.2.Test d'Hémolyse

Le test de toxicité a été évalué par l'étude de l'effet hémolytique d'EA sur la solution hématies (SH) constituée de globules rouges à 2% dans du PBS, selon le protocole décrit par Hebbani et *al.* [28], avec quelques modifications : 1 ml de SH (2%) a été mélangé avec 80 μl de solution d'EA à différentes concentrations (0 à 6000 $\mu\text{g/ml}$) diluée dans du PBS. La saponine à la concentration de 6000 $\mu\text{g/ml}$ a été prise comme témoin positif de 100 % d'hémolyse, en se référant à la courbe d'étalonnage (0 à 6000 $\mu\text{g/ml}$) d'hémolyse (figure 03), tandis que le tampon PBS a été pris comme témoin négatif de l'hémolyse. Les mélanges de solutions ont été incubés à 37°C pendant 1h sous agitation douce, puis centrifugés (2500 tours par minute pendant 10 min à 4°C). La mesure de l'absorbance du surnageant des différentes solutions (A : DO de surnageant des solutions d'EACG et B : DO de la saponine) ont été mesurées à $\lambda = 540 \text{ nm}$. La cytotoxicité de l'EA a été appréciée par le pourcentage d'hémolyse, selon la formule suivante :

$$\% \text{ Hémolyse} = (A/B) * 100$$

10. Formulation d'un dentifrice à base d'extrait aqueux de CG

Les ingrédients utilisés et les analyses qualitatives suivies pour la formulation de 100g de dentifrice (Tableau I) ont été élaborés selon le protocole décrit par Adeleye et *al* [29]. La base du dentifrice a été préparée comme suit : 02 g de Carboxyméthylcellulose (CMC) ont été triturés avec 30 g de glycérine pendant 15 min dans un mortier, puis 01 g de sorbitol et 02 g de SLS (Sulfate Lauryl de sodium) ont été dissous dans 5 ml d'eau distillée chaude sous agitation. Les deux mélanges ont été ensuite soigneusement incorporées avec trituration continue. Après cela, 20 g de Carbonate de calcium ont été dispersés dans 17 ml d'eau distillée, cette dernière préparation a été ajoutée au mortier avec trituration ; puis 23 ml ont été ajoutés au fur et à mesure avec une trituration continue jusqu'à l'obtention d'une texture pâteuse blanchâtre. Quant au dentifrice à base de clou de girofle, il a suivi les mêmes étapes, sauf pour l'EA qui a été d'abord dissout dans 15 ml d'eau distillée puis trituré avec la solution de mélange CMC-glycérine. L'eau distillée ajoutée pendant la trituration finale est de 8 au lieu de 23 ml.

Tableau I : Compositions des formulations des dentifrices (100g)

Ingrédients	Formulations	
	De Base	Contenant l'EA
EACG	—	03g
Carbonate de calcium	20g	20g
Sodium LaurylSulfate (SLS)	02g	02g
CarboxyMéthylCellulose (CMC)	02g	02g
Glycérine	30g	30g
Sorbitol	01g	01g
Eau distillé	QSP 100g	QSP 100g

11. Evaluation qualitative du dentifrice [29]

11.1. pH

Dix grammes de dentifrice ont été homogénéisés dans de l'eau distillée chaude (100 ml, 70°C) et le pH a été déterminé après refroidissement à l'aide d'un pH-mètre de paillasse PH-016A. Trois mesures de pH ont été réalisées, la première pour la base, la deuxième pour notre dentifrice à base d'EACG et le troisième pour un dentifrice commercial à base d'extrait de clou de girofle.

11.2. Particules abrasives

Le test du bout du doigt a été réalisé sur le dentifrice à base d'EACG extrudé sur une longueur de 15cm par pression du doigt pour ressentir la présence de particules abrasives pointues et dures, ce test a été fait en trois fois pour nos trois échantillons.

11.3. Moussabilité

Cinq grammes de chaque échantillon ont été homogénéisés dans un bécher de 250ml avec 50 ml d'eau déminéralisée sous agitation mécanique, jusqu'à complète dissolution. Le mélange a ensuite été transféré dans une éprouvette de 250ml, puis soumis à une agitation mécanique (3min), les volumes ont été ensuite notés : la hauteur avant l'agitation (V1) et la hauteur après l'agitations (V2). La moussabilité a été déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Moussabilité (\%)} = ((V2 - V1) / V1) * 100$$

11.4. Détermination de l'étalement

Dans cette technique 0,5 g de chaque échantillon a été placé entre deux couvercles de boîte de Pétri en verre (90mm). Un poids de 01 kg a été placé sur le couvercle supérieur et laissé au repos 10 min, puis il a été retiré. Le diamètre de l'étalement sur le couvercle a été mesuré (en mm) pour chaque échantillon de dentifrice : la base incorporée à l'EA, dentifrice de commerce à base d'huile essentiel de clou de girofle.

11.5. Activité antibactérienne, antibiofilm et le test de TAC des dentifrices

Le protocole suivi est le même que celui utilisé pour l'EACG avec quelques différences pour la méthode suivie pour l'activité antibactérienne, dont la méthode de diffusion sur gélose agar MH a été choisie à la place de la méthode de microdilutions. Pour l'activité antibiofilm, elle a été évaluée avec la même méthode que celle décrite dans la diffusion sur rouge congo (GRC). Quant au test de la TAC (mg eq AA /g de dentifrice), il a suivi également la même procédure que celle citée dans la partie d'activité antioxydante d'EACG.

12. Analyse statistique

Les données ont été présentées sous forme de moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA ($p < 0,05$).

III. Résultats

Le rendement de l'extraction de l'EA obtenu dans cette étude (15,505%) est inférieur à l'extrait méthanolique (29,7%) décrit par Boucherirt *et al.* [30], mais il reste proche des extraits aqueux (15%) et méthanolique (14,9%) obtenus respectivement par TrimetaAgroFood selon Rezzouk [31] et Ramzi *et al.* [32]. Le rendement d'extraction est un paramètre multifactoriel qui dépend des méthodes et des solvants d'extraction ainsi que des conditions biotiques et abiotiques entourant la plante [33]. En effet, Sahreen *et al.* [34] ont démontré que le méthanol et les solvants organiques présentent des meilleurs rendements d'extraction.

1. Résultats quantitatifs des constituants phytochimiques d'EA

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés, sont présentés dans le tableau II. Les taux des Polyphénols, obtenues dans cette étude, sont nettement inférieurs à ceux rapportés par Indiarito *et al.* [35] (38,20 mg EAG/g) mais proches de ceux de l'extrait méthanolique (15,174 mg EAG/g) trouvés par Ramzi *et al.* [32]. Quant aux flavonoïdes, ils corroborent avec ceux de l'extrait méthanolique (7,94 mg EQ/g) obtenus par Indiarito *et al.* [35]. Tandis que les teneurs en tanins condensés, sont largement inférieurs à ceux de l'extrait acétonique (40,53 mg EAT/g) rapportés par Nikousaleh et Prakash [36]. Ces différences peuvent être expliquées par la nature et la polarité des solvants utilisés [37].

Tableau II : Résultats des dosages quantitatifs et des activités antioxydantes

Teneurs	
• Polyphénols (mg eq AG/g)	15±0,1
• Flavonoïdes (mg eq Q/g)	7,25±1,18
• Tanins condensés (mg eq AT/g)	3±0,06
Activités antioxydantes	
• TAC (mg eq AA/g)	106±0,71
• FRAP (mg/mL)	0,0519±0.009
• DPPH (mg/mL)	0,55±0.01

2. RP HPLC

Les résultats de la RP-HPLC d'EA obtenus sont mentionnés dans le tableau III. Sur sept molécules standards utilisées, six ont été identifiées dans l'EA. Ces dernières appartiennent aux flavonoïdes et aux acides phénoliques, qui sont réputés pour leurs activités antioxydante, antibactérienne et antibiofilm. Selon Bachiri et *al.* [38], l'analyse qualitative des polyphénols dépend de l'origine de la plante, la nature du solvant d'extraction, les conditions de séchage et de la méthode utilisée.

Tableau III: Résultats RP-HPLC d'EA de clou de girofle

N°	Noms	Temps de retention (min)	Classification
01	Acide gallique	6,337	Acides phénoliques
02	Acide caféique	20,737	
03	Acide p-coumarique	27,777	
04	Acide cinnamique	44,290	
05	Quercetine	45,853	Flavonoïdes
06	Rutine	36,249	

3. Activités antioxydantes

Les résultats des activités antioxydantes d'EA présentés dans le tableau 1, montrent que le résultat de la TAC obtenu dans cette étude, est supérieur (18.156 mg/g) à celui obtenu par Hossen [39]. Tandis que les résultats du DPPH et du FRAP sont supérieurs aux résultats rapportés par Kara [40].

4. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'EACG sont illustrés dans la figure 1. La CMI et la CMB de l'EA sont de 5,467 et 21,875mg/mL, respectivement. Les résultats obtenus sont comparables aux résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont révélé une activité antibactérienne forte de cet extrait [41]. Pour le travail de St-louis [42] sur des souches de *Staphylocoques dorés* ayant une résistance aux antibiotiques, leurs résultats montrent que toutes les souches résistantes ont été inhibées par l'EACG avec un effet bactéricide dominant avec une CMI =4mg/mL, ainsi que pour les concentrations minimales inhibitrices des *S. aureus* peu résistants, le résultat est le même. Par contre, selon les résultats de Ajiboye et al.[43] la CMI et CMB sont respectivement de 0,06 et 0,10 mg/mL, ces résultats peuvent s'expliquer par la différence géographique (Nigeria), le stade de maturation de l'échantillon utilisé pour l'obtention de l'EA, ainsi que les facteurs environnementaux. Selon l'étude de Aiensaard et al. [44], la CMI et La CMB des huiles essentielles de CG , contre *S. aureus* et l'étude de Bachiri et al. [38] sur des extraits aqueux bruts et des HE de deux espèces de lavande, le rapport dose/effet est plus marqué pour les HE même à des concentrations faibles (à partir de 8,91 et 11,88 mg/mL) par rapport à l'EA brut. Ces résultats montrent que les HE sont très actives par rapport aux extraits aqueux qui nécessitent des concentrations nettement plus élevées (100 mg/mL) pour avoir une activité antibactérienne importante.

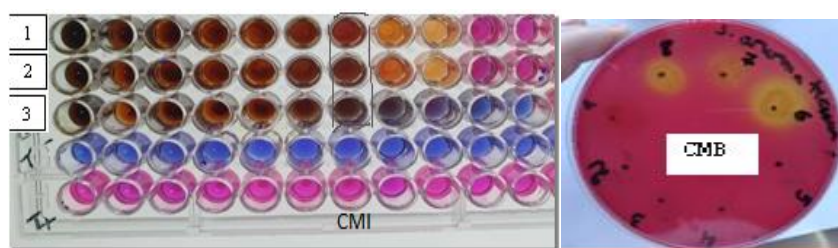


Figure 1 : Résultats d'activité antibactérienne d'EA (CMI et CMB)

$CMB/CMI = 4$ implique que le pouvoir de l'EA du CG est bactéricide. Ce résultat concorde avec l'étude de Rodrigues et al. [39], qui a testé les activités antimicrobiennes de 19 HE dont le CG contre la souche *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) et le CG a montré les activités les plus prometteuses, avec des effets à la fois bactéricides et antibiofilm. Selon Coppo et al. [40] l'acide gallique a influencé les propriétés d'adhésion de *S. aureus* tandis que l'acide caféique a interféré avec la stabilité de la membrane bactérienne et selon Taylor et al. [45] les catéchines pénètrent et interagissent avec les bicouches lipidiques.

5. Activité antibiofilm

Le résultat de la CMIB (43,75mg/mL) d'EA du clou de girofle est présenté dans la figure 2 avec des zones d'inhibition allant de 11,33 à 16,66mm. La CMI de l'activité antibiofilm est nettement plus élevée que la CMI de l'activité antibactérienne. D'après l'étude de Gracia et al. [46], la nano-émulsion de CG a eu la plus forte capacité inhibitrice de la formation de biofilm contre *S. aureus* aux doses sous-CMI testées, cela est dû à sa granularité, car les petites particules ont une plus grande surface de contact avec les microbes.



Figure 2 : Activité antibiofilm d'extrait aqueux de clou de girofle

6. Etude de l'innocuité

Les résultats de l'activité hémolytique, illustrés dans la figure 3, démontrent de manière évidente que l'EACG présente une faible capacité d'hémolyse, ne dépassant pas 7% d'hémolyse à la concentration maximale testée (6000 $\mu\text{g/mL}$), comparativement à la saponine et cela malgré que la saponine entre dans la composition de L'EACG a un taux non négligeable. Ces résultats confirment que l'EACG testé à différentes concentrations présente une faible toxicité envers les hématies.

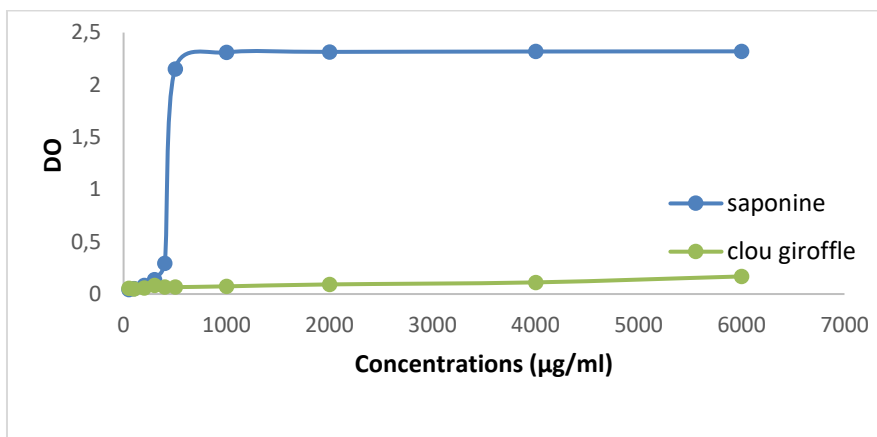


Figure 3 : Résultats de l'activité hémolytique

7. Activité antibactérienne et antibiofilm du dentifrice

Les activités antibactérienne (DCG3 (Dentifrice à l'EACG frais) = $28 \pm 0,46$ mm, DCG2 (Dentifrice à l'EACG qui date d'une semaine) = $26 \pm 0,97$ mm, B (Base) = $12 \pm 1,62$ mm et Dc (Dentifrice commercial) = $14 \pm 0,73$ mm) et antibiofilm (DCG3 = $27 \pm 1,06$ mm, DCG2 = $22 \pm 1,34$ mm, B = $17 \pm 0,68$ mm et Dc = $15 \pm 1,42$ mm), à une concentration de 25mg/mL d'EACG des dentifrices sont présentées dans la figure 4. Ces résultats montrent un effet synergique entre les constituants du dentifrice et l'EACG, avec une différence significative ($p < 0,05$) entre les échantillons testés. La base possède une activité antibiofilm et antibactérienne nettement inférieure à celle du DCG ce qui est expliqué par sa composition en LSS qui est doté d'un potentiel antibactérien et antibiofilm qui, en synergie avec l'EACG (DCG2 et DCG3), donne de meilleures activités inhibitrices contre *S. aureus*.



Figure 4 : Activité antibactérienne et anti biofilm des dentifrices

1 : la base (B), 2 : Dentifrice à l'EACG qui date d'une semaine (DCG2), 3 : Dentifrice à l'EACG frais (DCG3), 4 : Dentifrice commercial (Dc), Témoin positive : la vancomycine, Témoin négatif : disque imbibe d'eau physiologique stérile

8. Contrôle de qualité des dentifrices

8.1. Tests organoleptiques

Un échantillon de 03 g de la préparation de dentifrice a été placé dans un verre de montre, puis examiné à l'aide des sens de la vue, de l'odorat, du goût et du toucher afin de décrire sa couleur, son odeur et sa texture. Pour être considéré de bonne qualité, le dentifrice doit satisfaire aux critères de la norme indonésienne SNI n° 12-3524-1995, à savoir : être de texture douce et homogène, sans bulles d'air, sans grumeaux ni particules séparées.

Tableau V : Résultats des tests organoleptiques

Les caractéristiques organoleptique	Les résultats
• Odeur	caractéristique et agréable
• Couleur	marron clair
• Forme	pâteuse
• Aspect	homogène, douce, sans bulles d'air et sans grumeaux

8.2. Test de moussabilité

Les résultats des tests qualitatifs (test moussabilité, pH et test étalement) des dentifrices utilisés sont présentés dans le tableau IV. L'analyse statistique du test de moussabilité montre une différence significative entre les échantillons testés avec une moussabilité plus prononcée du dentifrice au clou de girofle par rapport aux autres dentifrices. Ces résultats peuvent s'expliquer par la contenance en SLS qui est un excipient synthétique doté de propriétés moussantes selon Ranjani et Ramamurthy [46]. Les résultats du test de moussabilité sont en faveur du dentifrice au clou de girofle (DCG), puis en second la formulation basique du dentifrice et enfin le dentifrice pris du commerce. Ces résultats peuvent être dus à la quantité de SLS ainsi qu'aux polyphénols d'EACG.

Tableau IV : Résultats des tests de moussabilité, pH et le test de l'étalement

Paramètres	Base	DCG	Dc
V0 avant agitation (mm)	53±1,21	53±0,96	53±1,41
V1 (3min) mm	85±1,07	92±0,89	76±1,25
Test de moussabilité (3min)	60,37±2,33	73,58±1,52	4,39±1,89
Test de PH	8,64±0,03	7,3±0,07	8,95±0,05
Test d'étalement (mm)	73±1,09	80±0,99	75±1,22

La valeur de pH du dentifrice est un facteur essentiel pour évaluer la stabilité, la qualité et l'efficacité du dentifrice, selon la pharmacopée européenne le pH doit être compris entre 5,5 et 10, L'instabilité de l'ingrédient actif dans le dentifrice entraîne souvent une variation du pH du produit final. Le DCG possède un PH neutre, ce dernier peut être dû aux constituants d'EACG qui agissent comme régulateurs d'acidité à coté de carbonate de calcium. En effet, le carbonate de sodium a été largement utilisé comme agent abrasif doux et comme ingrédient d'ajustement du pH dans de nombreux produits dentaires [47].

8.3. Test d'étalement

Les résultats des 3 échantillons sont proches, mais celui du dentifrice à base d'EACG est le plus élevé. La différence de pouvoir d'étalement produite par une pâte est due à plusieurs facteurs influents, à savoir le poids de la charge et la masse de la pâte [49].

9. Activité antioxydante du dentifrice (TAC)

L'EACG est doté d'une activité antioxydante qui s'est répercuté par un pouvoir antioxydant total TAC (62,54±2,14 mg AA /100g dentifrice) dans le DCG, en le comparant aux autres dentifrices : 16,99±0,60 et 8,53±1,53 mg AA/100g de la base et du commercial, respectivement.

IV. Discussion

Les composés polyphénoliques constituent l'un des groupes de métabolites secondaires les plus diversifiés du règne végétal avec une grande diversité structurale. Ils sont dotés de plusieurs activités biologiques : antioxydante, antibactérienne, antiinflammatoire, etc [50]. C'est ainsi que les polyphénols peuvent interagir avec divers matériaux (petites molécules, ions métalliques, polymères, acides nucléiques et protéines) via des liaisons : hydrogène, hydrophobes, interactions électrostatiques et des liaisons covalentes, et qui dépendent du nombre et la position de doubles liaisons des polyphénols [51].

Le pouvoir antioxydant remarquable de l'EACG de clou de girofle est expliqué du fait que la majorité des polyphenols appartiennent à la famille des flavonoïdes et des acides phénoliques avec un taux important de ces derniers comme l'acide gallique, acide caféique, acide P-coumarique, acide cinnamique et les flavonols (quercétine et la rutine). En effet, le pouvoir antioxydant des polyphénols, comme piègeur de radicaux libres dépend du nombre et de la position du OH sur leur cycle benzénique [52]. L'activité antioxydante peut être due à des mécanismes différents, tels que la prévention de l'amorçage de la chaîne oxydative, la décomposition des peroxydes et la prévention de l'abstraction continue de l'hydrogène. Le

pouvoir anti-radicalaire des acides phénoliques et des flavonoïdes contenus dans les extraits peut être dû à leur capacité à réduire et à décolorer le DPPH en raison de leur faculté de donner de l'hydrogène, ainsi qu'à leur potentiel de transfert d'électron dans le cas de test de FRAP. Ces aptitudes de transfert d'électron, de proton et d'hydrogène sont à l'origine de la neutralisation des radicaux libres en créant des produits stables. Ce pouvoir peut être assuré par la présence de groupes donateurs d'électrons ou de prélèvements au niveau du système aromatique et de la glycosylation en position OH sur le cycle benzénique qui influencent fortement le potentiel Red-Ox des composés phénoliques [53-56].

Les propriétés antibactériennes des polyphénols sont dues à leurs interactions avec les parois bactériennes et les membranes cytoplasmiques, ainsi que leur impact sur la fluidité membranaire et pariétale. Les polyphénols affectent également l'ADN et le métabolisme énergétique [57-59]. Les composés phénoliques contiennent des groupes d'hydroxyle (-OH) qui, en perturbant les structures de membrane, provoquent des fuites de composants cellulaires. Le groupe actif -OH favorise également la délocalisation des électrons, agissant comme échangeurs de protons. Ils réduisent le gradient cytoplasmique des bactéries, réduisant ainsi le gradient protonique (H⁺) de la cellule bactérienne, conduit à l'épuisement du pool ATP, provoquant finalement la mort cellulaire [60-62]. De même, Farag et al. [63] ont rapporté que l'inhibition enzymatique des polyphénols est attribuée à la capacité du groupement -OH à se fixer les sites actifs des enzymes. Selon, Dorman et Deans [64], la position du groupe -OH dans les polyphénols influence considérablement son activité antimicrobienne. Effectivement, Figueiredo et al. [65] ont révélé que l'acide caféique a une activité antimicrobienne plus élevée que l'acide p-coumarique en raison d'un groupe hydroxylique supplémentaire dans la structure de l'acide caféique.

Le potentiel antibiofilm d'EACG est attribué à leur richesse en polyphénols qui inhibe le biofilm formé par *S. aureus*. Cette action est provoquée soit par leurs potentiels antibactérien soit par la perturbation de la régulation quorum sensing comme ça a été rapporté par Freundorfer et al. [66] ; Khelifi et Kolia [67]. En effet, selon Silva et al. [68] la suppression du biofilm peut s'effectuer par la perturbation des mécanismes de régulation bactériens du *quorum sensing*, sans effet sur la croissance bactérienne.

Afin d'exclure une cytotoxicité potentielle de l'EACG, une étude de l'activité hémolytique sur les érythrocytes humains a été menée. Les globules rouges humains constituent un outil pratique pour les études de toxicité, car ils sont facilement accessibles, leurs propriétés membranaires sont bien connues et leur lyse peut être facilement surveillée par la mesure de la libération d'hémoglobine. Les saponines peuvent se lier au cholestérol des membranes des globules rouges, ce qui déstabilise l'intégrité de ces membranes et conduit à la formation de pores. Cela permet le relargage du contenu intracellulaire des érythrocytes, aboutissant finalement à leur hémolyse selon Suwalsky et al. [69]. L'effet non hémolytique de l'EACG peut s'expliquer par sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes qui lui confère la capacité de stabiliser les membranes des globules rouges, ainsi un effet protecteur contre l'hémolyse [70-72].

Le rôle du brossage dans la prévention de la carie n'est pas toujours suffisant, et un antibactérien buccal efficace devrait avoir un large éventail d'activité antimicrobienne, conserver le microbiome buccal, et être compatible avec d'autres ingrédients de dentifrice [73,74]. L'activité antibactérienne et antibiofilm du DCG contre *S. aureus*, peut s'expliquer par l'effet synergique

des constituants de la base du dentifrice (SLS, carbonate de calcium et le sorbitol), qui une fois associés avec l'EACG, donnent de meilleurs résultats.

Effectivement, le potentiel antibactérien du SLS est probablement attribué à la présence dans sa structure d'une chaîne alkyle, lui conférant ainsi un effet antimicrobien direct en raison de son adsorption, sa pénétration à travers la membrane cellulaire et de son interaction avec les composants lipidiques et les protéines de membrane. Ce qui lui permet d'inhiber la formation des plaques dentaires selon Shen et *al.* [75] ; Birkeland et Steinhaus [76] Sabri et *al.* [77]. En absence d'étude suffisamment claire sur les effets indésirables de SLS, néanmoins Sabri et *al.* [77], suggèrent que bien qu'il puisse améliorer l'action de nettoyage, il peut également déshydrater et irriter la muqueuse, ce qui devrait être évité en cas de bouche sèche et de muqueuse sensible. La présence de carbonate de calcium dans la formulation des dentifrices, affecte le pH de la plaque après un défi acide, ce dernier semble donner un pH plus neutre au dentifrice à base d'EACG. Selon Lynch et TenCate [78], les particules de carbonate de calcium, retenues par la plaque, peuvent influencer les caries en neutralisant les acides nocifs et tout en libérant du calcium. En plus de ces deux composés, la présence de sorbitol dans les dentifrices leur confère non seulement un pouvoir humectant et adoucissant, mais également un potentiel antibactérien, comme ça a été rapporté par Smolarek et *al.* [79].

Les saponines sont des métabolites secondaires qui agissent comme un détergent et un émulsifiant, entraînant une mousse persistante selon Panontin et *al.* [80]. Il a été rapporté que l'extrait du bouton de clou de girofle contient des quantités suffisantes en saponine ($28 \pm 1,67$ mg eq /g d'extrait). Selon, Tomlin et *al.* [81], les douzaines premières chaînes de carbones, dans la saponine, fournissent suffisamment d'effet hydrophobe pour que les micelles et les films de bulles se forment.

La valeur de pH du dentifrice est un facteur essentiel pour évaluer la stabilité, la qualité et l'efficacité du dentifrice, L'instabilité de l'ingrédient actif dans le dentifrice entraîne souvent une variation du pH du produit dentifrice. Selon la pharmacopée européenne le pH doit être compris entre 5,5 et 10, Une valeur de pH trop acide irritera la bouche, tandis qu'une valeur de pH trop alcaline peut entraîner une peau rugueuse/écailleuse [82]. En ce qui concerne l'étalement, la viscosité est un facteur déterminant ainsi que la concentration de l'EACG, et la teneur en humidité, l'étalement des dentifrices formulés diminuait avec l'augmentation de la concentration de l'extrait, par contre, la capacité moussante et la viscosité augmentaient selon Adeleye [29].

Les taux de TAC enregistré dans le DCG apportent une preuve sur le maintien des activités d'EACG qui ont un effet synergique avec les composants du dentifrice de base. En effet notre DCG contient moins de produit chimique (absence de benzoate de sodium) ce qui permet de préserver une plus grande partie de ses bienfaits thérapeutiques tandis que le Dc a une composition potentiellement moins riche en composés bioactifs. Le clou de girofle est réputé pour ses propriétés antioxydants ce qui en fait un ingrédient précieux dans la formulation des dentifrices par son pouvoir de neutraliser les radicaux libres et les molécules instables, qui peuvent provoquer des dommages cellulaires, en contribuant à la prévention de caries dentaires par protection de l'email et en favorisant la reminéralisation des dents.

V. Conclusion

L'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* est riche en composés phénoliques, en l'occurrence les flavonoïdes et les acides phénoliques, qui sont à l'origine de leurs activités antioxydantes, exprimées par le DPPH, FRAP et TAC. Ces derniers ont permis d'exercer un effet antibactérien et antibiofilm contre *S.aureus* . Le faible pouvoir hémolytique d'EACG, est un atout majeur pour son utilisation dans le domaine dentaire mais sous un contrôle. L'effet bénéfique de l'incorporation d'EACG dans la formulation du dentifrice a été apprécié par les zones d'inhibitions sur géloses MH (antibactérienne) et GRC (antibiofilm), ainsi que les résultats du pouvoir antioxydant (TAC), comparativement à la base de dentifrice. Ce qui laisse présager leur utilisation dans l'hygiène buccodentaire tout en réduisant les quantités des produits chimiques, et la validation d'utilisation devra subir des études et essais ultérieures supplémentaires.

Références bibliographiques

1. Kamatou GP., Vermaak I., & Viljoen AM. (2012). Eugenol-from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953-6981.
2. Cortés-Rojas DF., de Souza CRF., & Oliveira W P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(2), 90-96.
3. Atmani H., Baira K. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères Physico-chimique de l'huile essentielle du clou de girofle *Syzygium aromaticum* L. Biologie et physiologie végétale. Algérie : Université Frères Mentouri 1 Constantine, 2015, 86 p
4. Boukhatem F. (2017). Activité antibactérienne de l'huile essentielle de deux épices : *Syzygium aromaticum* et *Illicium verum*. Mémoire de master : valorisation de substance naturelle et végétale. Université Abdelhamid IbenBadis. Mostaganem, p79.
5. Boucherit A., & Hamadi I. (2016). Activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du clou de girofle sur les bactéries responsables des carie dentaires et comparaison de son effet avec celui du Fluor (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
6. Park MJ., Gwak KS., Yang I., Choi WS., Jo HJ., Chang WJ., Jeung EB., Choi IG. (2007). Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum betersonni* Bailey and their constituents against various derma-tiphytes. *J Microbiol*; 45:460-465.
7. Featherstone JDB. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J* 53: 286-291
8. Freires IA, Rosalen PL. (2016). How natural product research has contributed to oral care product development. A critical view. *PharmRes*33: 1311–1317
9. Guven Y, Ustun N, Tuna EB, Aktoren O. (2019). Antimicrobial effect of newly formulated toothpastes and a mouthrinse on specific microorganisms: An in vitro study. *Eur J Dent* 13: 172–177.
10. Madiélé AB., Quio Zhao JM., Thiéry V., Agnanié H., Brunet C., Graber M., & Ouamba, JM. (2015). Caractérisations analytiques des extraits colorants des plantes tinctoriales d'Afrique Centrale. *Lebanese Sci. J*, 16(1), 33-33.
11. Benahmed-Djilali A., Chemoul T., Kal S., Nabiev M., & Besombes C. (2017). Propriétés d'une pommade antibactérienne formulée à base de saponines extraites des feuilles de noyer. *Phytothérapie*, 16, 1-9.
12. Ghedadba N., Hambaba L., Aberkane MC., Oueld-Mokhtar SM., Fercha N., & Bousselsela H. (2014). Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*, 2(2), 64-74.
13. Victor OE., & Gaël NM. (2019). Etude de l'activité antibactérienne (in vitro) des extraits aqueux et méthanoliques de l'ail (*Allium sativum* L.). *Journal of Applied Biosciences*, 141, 14419-14425.

14. Bohui PSG., Adima AA., Niamké FB., & N'Guessan JD. (2018). Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirach taindica* et *Psidiumgua java*. Journal de la Société Ouest-Africaine. Chimie, 46, 50-58.
15. Ouadan L., Mahjoubi M., Zair T., & Alistiqsa F. (2018). Étude phytochimique et ethnobotanique, dosage des polyphénols totaux de l'huile essentielle et des extraits du *Thymus capitatus*. J. Natl. Sur La Chim, 57-62.
16. Ali-Rachedi F., Meraghni S., Touaibia N., & Mesbah S. (2018). Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa atropurpurea* sub. *Maritima* L. Bulletin de la société royale des sciences de liège.
17. Larwence A., Hammouda F., Salah A., Abada S., & Ouchaï N. (1984). Valeur alimentaire des marcs de raisin. III.-Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton: effet d'une addition de polyéthylène glycol 4 000. In Annales de zootechnie (Vol. 33, No. 4, pp. 533-543).
18. Soumia H., Farah R., Imane R., EL HADJ O., & Aminata K. (2023). Assessment of safflower flowers (*Carthamus tinctorius* L.) as potential food antioxidants. Revue des bioressources, 13(1), 2-10.
19. Bougandoura N., & Bendimerad N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. Nature & Technology, (9), 14.
20. Kherraf A. (2018). Caractérisation physicochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire de la microalgue Na 21. Gülçin, İ., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2012). Antioxidant activity of clove oil—A powerful antioxidant source. Arabian Journal of chemistry, 5(4), 489-499.
22. Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., & Možina SS. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of microbiological methods, 81(2), 121-126.
23. Chebaibi A., Marouf Z., Rhazi-Filali F., Fahim M., & Ed-Dra A. (2016). Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. Phytothérapie, 14(6), 355-362.
24. Bouharb H., El Badaoui K., Zair T., Chakir S., & Alaoui T. (2014). Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Biosciences, 78, 6685-6693.
25. Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170 p.
26. Ponce AG., Fritz R., del Valle C., et Roura SI. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensm.-Wiss.u.-Technol.36, pp.679-684, 2003

27. Arbos KA., Claro LM., Borges L., Santos CA., & Weffort-Santos AM. (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition research*, 28(7), 457-463.
28. Hebbani AV., Reddy VD., & Nallanchakravarthula V. (2014). In vitro anti-hemolytic activity of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wt. and Arn. Bark powder aqueous extract. *Indian J Adv Chem Sci*, 3, 102-108.
29. Adeleye OA., Bamiro O., Akpotu M., Adebowale M., Daodu J., & Sodeinde MA. (2021). Physico-chemical evaluation and antibacterial activity of *Massularia acuminata* herbal toothpaste. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 476.
30. Boucherit A., & Hamadi I. (2016). Activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du clou de girofle sur les bactéries responsables des carie dentaires et comparaison de son effet avec celui du Fluor (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
31. Rezzouk S. (2022). Evaluation de la longévité du *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae) ravageur secondaire des figues sèches traité par l'huile essentielle du clou de girofle *Syzygium aromaticum* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
32. Ramzi A., & Kamouche MI. (2021). Thème: Evaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de quelques épices (*Cuminum cyminum*, *Curcuma longa* et *Syzygium aromaticum*).
33. Boukhatem MN., Hamaidi MS., Saidi F., & Hakim Y. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technology*, (3), 37.
34. Sahreen S., Khan MR., Khan RA. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem*, 122, 1205-1211.
35. Indiarto R., Herwanto JA., Filianty F., Lembong E., Subroto E., & Muhammad DRA. (2024). Total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and characteristics of a chocolate beverage incorporated with encapsulated clove bud extract. *CyTA-Journal of Food*, 22(1), 2329144.
36. Nikousaleh A., & Prakash J. (2016). Antioxidant components and properties of dry heat treated clove in different extraction solvents. *Journal of food science and technology*, 53, 1993-2000.
37. Marco JG. Quot A. (1968). Rapid method for evaluation of antioxidants quot; *Journal of the American Oil Chemists; Society*, 1968, Vol. (45), page : 594.
38. Bachiri L., Echchegadda G., Ibijbjen J., & Nassiri L. (2016). Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavande Autochtones Au Maroc : «*Lavandul astoechas* L. et *Lavandul adentata* L.»». *European Scientific Journal*, 12(30), 313-333.
39. HossenJenia S. (2019). Study on Nutritional Composition, Bioactive Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Clove (*Syzygium aromaticum*) (Doctoral dissertation, Chattogram Veterinary and Animal Sciences University Chattogram-4225, Bangladesh).

40. Kara M. (2023). Etude comparative des activités antioxydante et antifongique des huiles essentielles de clou de girofle et de la cannelle (Doctoral dissertation, Université Ibn Khaldoun)
41. Almati manquante
42. St-Louis, F. Evaluation des Effets Biologiques des Extraits Aqueux de Plantes Médicinales Seules et Combinées.
43. Ajiboye TO, Mohammed AO, Bello SA, Yusuf II, Ibitoye OB, Muritala HF, Onajobi IB. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* seed: Studies on oxidative stress biomarkers and membrane permeability. *Microb Pathog.* 2016 Jun;95:208-215. doi: 10.1016/j.micpath.2016.03.011. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27038843
44. Aiensaard J, Borlace GN, Thongkham E, Jarassaeng C. (2023). Antibacterial efficacy of essential oil spray formulation for post-milking disinfection in dairy cows. *Vet World.* 16(7):1552-1561.
45. Garcia CR., Malik MH., Biswas S., Tam VH., Rumbaugh KP., Li, W., & Liu X. (2022). Nano emulsion delivery systems for enhanced efficacy of antimicrobials and essential oils. *Biomaterials Science*, 10(3), 633-653.
46. Ranjani G., & Ramamurthy K. (2010). Analysis of the foam generated using surfactant sodium lauryl sulfate. *International Journal of Concrete Structures and Materials*, 4(1), 55-62.
47. Price RB., Sedarous M., & Hiltz GS. (2000). The pH of tooth-whitening products. *Journal-Canadian dental association*, 66(8), 421-426.
48. Pratiwi PY., Nirmalasari TP., & Ridlo A. (2023). Formulation and quality evaluation of the preparation of combination of toothpaste bay leaf extract (*Syzygium polyanthum*) and mint leaves extract (*Coleus amboinicus* L.). *Jurnal Jamu Kusuma*, 3(1), 42-53.
49. Doko E. (2018). Kalam cosmological argument and the modern science. *Kader.* 50. Stojkovic, D., Petrovic, J., Sokovic, M., Glamoclija, J., Kukic-Markovic, J., & Petrovic, S. (2013). In situ antioxidant and antimicrobial activities of natural lyoccurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6156>
51. Gochev V., Dobрева A., Girova T., & Stoyanova A. (2010). Antimicrobial activity of essential oil from *Rosa alba*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment, Special Edition*, 24, 512e515
52. Muanda FN. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Université Paul Verlaine-Metz, 238.
53. Carocho M., & Ferreira, ICFR. (2013a). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy : Natural and synthetic compounds , screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
54. Huang D., Boxin O. & Prior RL. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.

55. Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik SE., Bektaşoğlu B., Dilek Ö. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, (12), 1496–1547.
56. Ramkisson JS., Mahomoodally MF., Ahmed N., & Subratty AH. (2012). Relationship Between Total Phenolic Content, Antioxidant Potential, and Antiglycation Abilities of Common Culinary Herbs and Spices 1. *Journal of Medicinal Food*, 15(12), 1116–1123.
57. Silva LN., Zimmer KR., Macedo AJ., Trentin DS. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chem. Rev.*
58. Xu C., Yagiz Y., Hsu WY., Simonne A., Lu J., & Marshall MR. (2014). Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace against selected food borne pathogens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(28), 6640-6649.
59. Yang MF, Yao X, Chen LM, Gu JY, Yang ZH, Chen HF, Zheng X, Zheng ZT. (2020). Synthesis and biological evaluation of resveratrol derivatives with anti-breast cancer activity. *Arch Pharm (Weinheim)*. 353(7):e2000044.
60. Ultee A., Bennik MHJ., & Moezelaar RJAEM. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.
61. Xue J., Davidson PM., & Zhong Q. (2013). Thymol nano emulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 12720e12726.
62. Lai PK., & Roy, J. (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current medicinal chemistry*, 11(11), 1451-1460.
63. Farag RS., Daw ZY., Hewedi FM., & El-Baroty, GSA. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of food protection*, 52(9), 665-667.
64. Dorman H., & Deans S. (2000). Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308e316
65. Figueiredo AR., Campos F., de Freitas V., Hogg T., & Couto JA. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*, 25(1), 105e112
66. Freundorfer C. A., M., Mah T. F., Otárola-Rojas M., Garcia M., Sanchez-Vindas P., & Arnason J. T. (2014). Inhibition of bacterial quorum sensing and biofilm formation by extracts of neotropical rainforest plants. *Planta Medica*, 343-350.
67. Khelifi D., & Koliai C. (2021). Activité anti-biofilm des extraits végétaux (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
68. Silva LN., Zimmer KR., Macedo AJ., Trentin DS. (2016). Plant natural product targeting bacterial virulence factors. *Chem. Rev.* 116:9162–9236.

69. Suwalsky M., Orellana P., Avello M., & Villena, F. (2007). Protective effect of *Ugnimolinae Turcz* against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 130-135.
70. Kaviarasan S., Vijayalakshmi K., & Anuradha CV. (2004). Polyphenol-rich extract of fenugreek seeds protect erythrocytes from oxidative damage. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 143-147.
71. Saffari Y., & Sadrzadeh SH. (2004). Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life sciences*, 74(12), 1513-1518.
72. Sangeetha P., Balu M., Haripriya D., & Panneerselvam C. (2005). Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins. *Experimental gerontology*, 40(10), 820-828.
73. Axelsson P., Buischi YAP., Barbosa MFZ., Karlsson R., & Prado MCB. (1994). The effect of a new oral hygiene training program on approximal caries in 12-15-year-old Brazilian children: results after three years. *Advances in dental research*, 8(2), 278-284
74. Nwakalor EO., & Okpokwasili GC. (2019). Evaluation of Tooth paste Effectiveness in Reducing Oral Bacteria. *International Journal of Bioengineering & Biotechnology*, 4(3), 26-31
75. Shen Y., Li P., Chen X., Zou Y., Li, H., Yuan G., & Hu, H. (2020). Activity of sodium lauryl sulfate, rhamnolipids, and N-acetyl cysteine against biofilms of five common pathogens. *Microbial Drug Resistance*, 26(3), 290-299.
76. Birkeland JM., & Steinhaus EA. (1939). Selective bacteriostatic action of sodium lauryl sulfate and of "Dreft.". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 40(1), 86-88.
77. Sabri H, Derakhshan Barjoei MM, Azarm A, Sadighnia N, Shakiba R, Aghebati G, Hadilou N, Kheiri P, Ghanbari F, Deravi N, Mokhtari M. The Yin and Yang O. (2023). Sodium Lauryl Sulfate Use for Oral and Periodontal Health: A Literature Review. *J Dent (Shiraz)*. 24(3):262-276.
78. Lynch RJ, tenCate JM. (2005). The anti-caries efficacy of calcium carbonate-based fluoride toothpastes. *Int Dent J*. 55(3 Suppl 1):175-8.
79. Smolarek PC, Esmerino LA, Chibinski AC, Bortoluzzi MC, Dos Santos EB, Junior VAK. (2015). In vitro antimicrobial evaluation of toothpastes with natural compounds. *Eur J Dent*. 9(4):580-586.
80. Panontin JF, Rambo MKD, Isaac V, Seibert CS, Scapin E. (2022). New antioxidant lauryl-free herbal shampoo formulation with a Brazilian plant extract. *Braz J Biol*. 21;82.
81. Paul TJ, Taylor TA, Rajendra Santosh AB. (2020). The potential of saponin from Jamaica & Blighiasapida (ackee) as a substitute for sodium laurylsulphate in toothpaste. *Med Hypotheses*. 137:109555.
82. Pratiwi PY., Nirmalasari TP., & Ridlo A. (2023). Formulation and quality evaluation of the preparation of combination of toothpaste bay leaf extract (*Syzygium polyanthum*) and mint leaves extract (*Coleusam boinicus* L.). *Jurnal Jamu Kusuma*, 3(1), 42-53.