



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
Domaine sciences de la nature et de la vie
Filière Sciences biologiques
Spécialité : Immunotoxicologie

Thème

**SCREENING CHIMIQUE ET EFFETS
PHYTOTHERAPEUTIQUES DE L'EXTRAIT DE
CLOU DE GIROFLE DANS UN MODELE
D'ASTHME EXPERIMENTAL**

Présentée par : Mme Ounaceur Lynda Sabrina

Membres de Jury:

Directrice de thèse	Boumendjel Amel	Professeur, Université Badji Mokhtar (Annaba)
Présidente	Saoudi Amel	Professeur, Université Badji Mokhtar (Annaba)
Examineur	Houali Karim	Professeur, Université Mouloud Maamri (Tizi Ouzou)
Examinatrice	Salhi Amina	Professeur, Université Badji Mokhtar (Annaba)

Année universitaire : 2023 - 2024

Dédicaces

*Tout d'abord, je dédie ce modeste travail de recherche à la mémoire de **mon père** et ma **grand-mère (MiMi)** décédés et **ma chère mère** pour m'avoir accompagnée, soutenue et permis de m'accrocher et de dépasser tous les obstacles auxquels j'ai pu faire face durant mes études. Je ne pourrais jamais suffisamment les remercier pour leur amour inconditionnel et tous les sacrifices consentis juste pour nous rendre heureux.*

*À mon frère **Samy** et à ma Sœur **Ines** pour m'avoir soutenue, encouragée, et d'être toujours là pour moi durant toutes ces années et plus particulièrement dans les moments difficiles. Merci infiniment.*

*À mon mari **Khaled**, à ma fille **Chahd Nelya** et à ma meilleure amie **Amira** pour m'avoir épaulée moralement quasi-quotidiennement, depuis le jour où je les ai rencontrés. Leurs soutiens inconditionnels et leur amour m'ont toujours permis d'avancer et de m'accrocher.*

*À mes amies, merci de m'avoir fait rire et oublier mes tracas, notamment **Sara** et **Nesrine**.*

*À mes adorables tantes **Karima** et **Fatiha**, à **mes cousines Sara et Sandra** et à mes cousins **Mehdi et Mokhtar**, pour m'avoir encouragée et d'être là pour moi*

À tous mes professeurs qui ont accepté de me faire partager leur expérience et leur savoir durant mes années de Doctorat. Merci du fond du cœur.

Ounaceur Lynda Sabrina

Remerciements

En préambule à cette thèse, je remercie **ALLAH** le tout Puissant et Miséricordieux qui m'a aidé, et m'a donné la force, le courage et la patience jusqu'à l'accomplissement de ce modeste travail.

Je tiens à remercier vivement et particulièrement mon encadrante Pr. **BOUMENDJEL** Amel, d'abord pour le choix de la thématique sur l'asthme expérimental associé à une phytothérapie. Ensuite je la remercie pour ses précieux conseils, ses orientations, son écoute et sa disponibilité tout au long de cette recherche. Je lui suis reconnaissante pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer et sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

Mes remerciements vont également aux membres du jury, qui m'ont honoré par leur présence et comblé par leurs appréciations, à savoir : Madame **SAOUDI** Amel, Professeur à l'UBMA, ayant bien voulu présider mon jury. Je lui exprime ma sincère gratitude et mon profond respect. Monsieur **HOUALI** Karim, Professeur à l'UMMTO, à qui j'exprime toute ma gratitude pour avoir accepté de se déplacer afin de participer à mon jury, malgré ses multiples occupations. Merci pour avoir pris le temps d'examiner ma thèse. Madame **SALHI** Amina, Professeur à l'UBMA, qui me fait l'honneur et le plaisir de participer à mon jury et d'examiner ma thèse. Sincères remerciements.

Je saisis cette occasion afin d'adresser mes vifs remerciements et ma reconnaissance à un grand nombre de personnes sans l'aide de qui cette thèse n'aurait pas été possible.

Je commencerai par remercier Monsieur **MESSARAH** Mahfoud, Professeur et Directeur du Laboratoire de Biochimie et Toxicologie Environnementale (UBMA), pour la prise en charge de la quasi-totalité de ma recherche doctorale au sein de son laboratoire, mais aussi pour ses bons et judicieux conseils, ainsi que pour son soutien moral tout le long de cette étude. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.

Je remercie également Monsieur **LANKAR** Abdelaziz, Professeur anatomopathologiste à la Clinique Bellevue (Annaba), pour son immense aide dans l'étude histologique..

Je remercie particulièrement la doctorante Mme **DJABER** Nesrine pour son aide sans limite, son immense gentillesse, son dévouement, ses encouragements et son soutien durant chaque étape de ma présente thèse. Puisse Allah le tout puissant l'en récompenser.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à tous les Professeurs qui m'ont enseignée et qui, par leurs compétences, m'ont soutenue pour persévérer dans mes études. Pour finir, je remercie tous les doctorants du Laboratoire de recherche de Biochimie et Toxicologie Environnementale ainsi que toute personne qui, de près ou de loin, a contribué à la réalisation de ce travail de recherche.

Table des matières

Résumé.....	IV
Abstract.....	V
ملخص.....	VI
LISTES DES FIGURES	XI
LISTES DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES ABREVIATIONS	XVI
INTRODUCTION.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE I : L’asthme allergique.....	4
1. Définition.....	4
2. Épidémiologie.....	4
3. Manifestations cliniques	5
4. Les facteurs déclenchant.....	5
5. Les mécanismes physiopathologiques	5
5.1. Phase de sensibilisation	5
5.2. La réexposition à l’allergène	6
6. Classification d’asthme.....	8
7- Physiopathologie de l’asthme.....	9
8- Traitement	9
CHAPITRE II : L’explosion oxydative (Respiratory burst) et implications dans l’asthme	11
1- Définition.....	11
2- Les espèces réactives de l’oxygène et du nitrogène.....	11
3- Les anti-oxydants	12
3.1- Les anti-oxydants enzymatiques	13
3.1.1- Les superoxydes dismutases	13
3.1.2- La catalase	13
3.1.3- La glutathion peroxydase	14
3.2- Les systèmes anti-oxydants non-enzymatiques	14
3.2.1. La glutathion (GSH)	14
4 - Liens existant entre le stress oxydatif et la pathologie asthmatique	14
CHAPITRE III : Le giroflier (<i>Syzygium aromaticum</i>)	17

1. Historique	17
2. Répartition géographique	17
3. Classification botanique	19
4. Description botanique	19
5. Classification taxonomique	19
5.1. Dénomination	19
5.2 . Classification botanique	20
6. Production mondiale de girofle	20
7. Culture et récolte	21
8. Usage du clou de girofle	22
9. Valeur économique	22
10. Constituants du clou de girofle	23
10.1. Le principe actif	23
10.2. Intérêt thérapeutique de l'eugénol	23
CHAPITRE IV : Activités biologiques du girofler	25
1. Généralités	25
2. Composition chimique	25
3. Activité anti-oxydante	26
3.1. Les oxydants	26
3.2 Les anti-oxydants	26
3.3 Techniques d'évaluation	27
4. Composés phénoliques	28
4.1. Classification chimiques	28
4.1.2 Acides phénoliques	28
4.1.3 Les Tanins	29
4.1.4 Les Flavonoïdes	29
4.1.5. Les flavonoïdes	30
4.2 Rôles et activités biologiques des polyphénols	30
5. Activités biologique du girofle	31
5.1 Activité antivirale	31
5.2. Activité anti-nociceptives	31
5.3 Pharmacocinétique du girofle	32
PARTIE EXPERIMENTALE	33
CHAPITRE V : Matériel et méthodes	33
5.1. Objectifs de l'étude	33
5.2 Matériels biologiques	36
5.2.1 Choix du matériel végétal	36

5.2.2 Préparation de l'extrait aqueux et dosage phytochimique	36
5.3. Dosages colorimétriques des composés phénoliques	36
5.3.1 Dosage des phénols totaux	36
5.3.2 Dosage des flavonoïdes	36
5.3.3 Dosage des tanins condensés.....	37
5.3.4 Dosage des flavonols.....	37
5.3.5 Dosage des ortho-diphénols	37
5.4 chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	37
5.5 Évaluation de l'activité anti-oxydante.....	37
5.5.1 étude de l'activité anti-oxydante (Méthode DPPH)	37
5.5.2. Méthode de blanchissement du β -carotène	38
5.5.3. Méthode d'ABTS	38
6. Expérimentation animale.....	38
6.1. Animaux et conditions d'élevage.....	38
6.2. Composition des lots et traitements des rats	38
6.3. Sensibilisation des rats et provocation des animaux par l'aérosol.....	39
6.4 Sacrifice et prélèvements des organes.....	40
6.4.1. Prélèvement sanguin.....	40
6.4.2. Prélèvement du liquide broncho-alvéolaire.....	40
6.4.3- Prélèvement des organes	40
6.4.3.1-Préparation de l'homogénat des tissus	40
6.4.3.2- Préparation du lysat érythrocytaire	41
6.5. Formule de numération sanguine (FNS)	41
6.6 Dosage des paramètres biochimiques	41
6.7 Dosages des paramètres de stress oxydatif	41
6.7.1 Dosage des protéines totales.....	41
6.7.2 Détermination du taux de la peroxydation lipidique	42
6.7.3 Détermination du taux des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP)....	42
6.7.4 Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)	42
6.7.5 Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (E.C. 1.11.1.9).....	42
6.7.6 Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (EC 2.5.1.18).....	42
6.7.7 Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6).....	42
6.8 Dosage ELISA de l'Interleukine-4.....	43
6.9. Étude histologique.....	47
7. Analyses statistiques des résultats.....	47

CHAPITRE VI : Résultats et discussion	52
1. Composition chimique et activités anti-oxydantes de l'extrait aqueux de <i>Syzygium aromaticum</i>	52
1.1 Rendement d'extraction.....	52
1.2 Dosages des composés phénoliques.....	52
1.3 Activité anti-oxydante du clou de girofle.....	52
1.4 Identification des composés phénoliques par HPLC.....	53
1.8. Discussion de l'expérimentation <i>in vitro</i>	54
Variation des paramètres physiologiques, inflammatoires, hématologiques et biochimiques dans un modèle murin d'asthme expérimental.....	57
2. Variation du poids corporel.....	57
2.1. Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson.....	57
2.2. Variation du poids absolu et relatif sur les organes prélevés.....	58
2.3 Effet sur certains paramètres biochimiques.....	59
2.3.1 Dosage des biomarqueurs hépatiques.....	59
2.4 Effet bénéfiques et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de <i>Syzygium aromaticum</i> sur des paramètres hématologiques.....	60
2.4.1 Variation des paramètres hématologiques.....	60
2.4.2 Variation des protéines totales dans le sérum et dans le liquide du LBA.....	61
2.4.3 Variations des taux d'interleukine-4 (IL-4).....	63
2.5. Discussion de la partie expérimentale <i>in vivo</i> (paramètres physiologiques, inflammatoires, hématologiques et biochimiques).....	65
2.6 Effets de l'extrait aqueux du <i>Syzygium aromaticum</i> sur les paramètres du stress oxydatif.....	70
2.6.1 Paramètres non-enzymatiques.....	70
2.6.1.1 Taux de malondialdéhyde (MDA).....	70
2.6.1.2 Taux des protéines carbonylées (PC).....	70
2.6.1.3 Taux du glutathion réduit (GSH).....	72
2.6.1.4 Taux des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP).....	72
2.6.2. Paramètres enzymatiques.....	73
2.6.2.1 Taux du glutathion peroxydase (GPx).....	73
2.6.2.2 Taux de catalase (CAT).....	74
2.6.2.3 Taux du glutathion - S- transférase (GST).....	76
2.7. Discussion sur la partie des effets protecteurs de l'extrait aqueux du <i>Syzygium aromaticum</i> sur les paramètres du stress oxydatif chez les rats asthmatiques.....	77
2.8 Étude histologique.....	80
2.8.1 Etude histologique du foie :.....	80
2.8.2 Etude histologique des poumons :.....	81
2.9. Discussion de la partie des effets protecteurs de l'extrait aqueux du <i>Syzygium aromaticum</i> au niveau histologique (foie et poumons) chez les rats asthmatiques.....	82

Conclusion et perspectives	93
Références Bibliographiques	95
ANNEXES	124
ACTIVITÉS ET PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	

Résumé

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires qui peut être soulagée par l'utilisation des plantes à effet anti-phlogistique. Parmi ces plantes, le clou de girofle, *Syzygium aromaticum*, détient une place de choix dans la médecine traditionnelle, notamment pour traiter les affections respiratoires. Le but de ce présent travail est, de réaliser, dans un premier temps, un screening chimique (par HPLC) et le dosage de certains composés polyphénols ainsi que la mise en exergue des activités anti-oxydantes de l'extrait aqueux du clou de girofle. Les résultats obtenus ont révélé des quantités plus ou moins importantes de certains composés phénoliques, tels que l'eugénol, l'acide ellagique et l'acide gallique. Ce qui explique le potentiel antioxydant notable de l'extrait aqueux de cette plante. Ensuite, dans un deuxième temps, le but était de confirmer l'effet protecteur anti-inflammatoire et anti-oxydant de la plante étudiée. A cet effet, des rats mâles Wistar ont été sensibilisés à l'ovalbumine, dans le cadre d'un asthme expérimental, puis traités par l'extrait aqueux de *S. aromaticum*. Les propriétés biologiques ont été évaluées par la mesure, au niveau de plusieurs compartiments (Poumons, LBA, sang et foie), du MDA, GSH, AOPP, PC, GPx, CAT, GST—ainsi que l'interleukine-4, par la technique ELISA. Les biomarqueurs hépatiques ASAT, ALAT, PAL et l'albumine ont également été déterminés. Les résultats ont montré une amélioration statistiquement significative des marqueurs inflammatoires et ceux du stress oxydatif, dans les organes étudiés chez les rats sensibilisés et traités. Pris dans leur ensemble, ces résultats confirmés par l'analyse microscopique des coupes histologiques du foie et des poumons, ont permis de mettre en évidence les fortes propriétés , anti-oxydantes, anti-inflammatoire et donc antiasthmiques de l'extrait acqueux du clou de girofle.

Mots-clés : asthme expérimental ; *Syzygium aromaticum* ; composants phénoliques ; HPLC ; anti-inflammatoire ; anti-oxydant .

Abstract

Asthma is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract which can be relieved by the use of plants with an anti-phlogistic effect. Among these plants, clove, *Syzygium aromaticum* holds a special place in traditional medicine, particularly for treating respiratory conditions. The aim of this work is, initially, to carry out a chemical screening (by HPLC) and the dosage of certain polyphenol compounds as well as to highlight the antioxidant activitie of the aqueous extract of the nail. cloves. The results obtained revealed more or less significant quantities of certain phenolic compounds, such as eugenol, ellagic acid and gallic acid. Which explains the notable antioxidant potential of the aqueous extract of this plant. Then, in a second step, the aim was to confirm the protective anti-inflammatory and anti-oxidant effect of the plant studied. For this purpose, male Wistar rats were sensitized to ovalbumin, in the context of experimental asthma, then treated with the aqueous extract of *S. aromaticum*. The biological properties were evaluated by measuring, at the level of several compartments (Lungs, BAL, blood and liver), MDA, GSH, AOPP, PC, GPx, CAT, GST as well as interleukin-4, using the technique ELISA. Liver biomarkers ASAT, ALT, ALP and albumin were also determined. The results showed a statistically significant improvement in inflammatory markers and those of oxidative stress, in the organs studied in sensitized and treated rats. Taken as a whole, these results, confirmed by microscopic analysis of histological sections of the liver and lungs, made it possible to highlight the strong antioxidant, anti-inflammatory and therefore anti-asthmatic properties of clove.

Keywords: experimental asthma; *Syzygium aromaticum*; phenolic components; HPLC; anti-inflammatory; anti-oxidant.

ملخص

الربو هو مرض التهابي مزمن يصيب الجهاز التنفسي ويمكن تخفيف أعراضه عن طريق استخدام النباتات المضادة للالتهاب. ومن بين هذه الأخيرة، يحتل القرنفل *Syzygium aromaticum* مكانة خاصة في الطب التقليدي، لا سيما لعلاج أمراض الجهاز التنفسي. ان الهدف الأولي من هذا العمل هو إجراء فحص كيميائي (بواسطة HPLC) للمستخلص مائي للقرنفل وتحديد كمية بعض مركبات البوليفينول وكذلك تسليط الضوء على الأنشطة المضادة للأكسدة. لقد كشفت النتائج التي تم الحصول عليها عن كميات كبيرة نوعا ما لبعض المركبات الفينولية، مثل الأوجينول وحمض الإيلاجيك وحمض الغاليك. وهو ما يفسر الإمكانات الملحوظة المضادة للأكسدة للمستخلص المائي لهذا النبات. بعد ذلك، قمنا في الخطوة الثانية من بحثنا بتأكيد التأثير الوقائي المضاد للالتهابات والمضاد للأكسدة لهذا النبات. لهذا الغرض، تم حقن ذكور فنران ويستار بالألبومين البيضاوي، في اطار اثارة الربو التجريبي، ثم تم علاجها بالمستخلص المائي لـ *S. aromaticum*. تم تقييم المعايير البيولوجية عن طريق قياس، على مستوى عدة أعضاء (الرئتين، الدم والكبد) : GST، CAT، GPx، PC، AOPP، GSH، MDA، بالإضافة إلى IL-4 (وذلك باستخدام تقنية ELISA). تم أيضاً تحديد المؤشرات الحيوية للكبد ASAT و ALT و ALP والألبومين. أظهرت النتائج بعد التحليل الاحصائي تحسنا ملحوظا في مؤشرات الالتهاب والإجهاد التأكسدي في جل الأعضاء التي تم دراستها عند الفنران الذي تم تحسيسهم ومعالجتهم. وبشكل عام، هذه النتائج، التي أكدها التحليل المجهرى للمقاطع النسيجية للكبد والرئتين، مكنت من تسليط الضوء على خصائص القرنفل المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات وبالتالي المضادة للربو.

الكلمات المفتاحية: الربو التجريبي؛ *Syzygium aromaticum*؛ المكونات الفينولية؛ HPLC؛ مضاد التهاب؛ مضاد للأكسدة.

Liste des figures

Figure 1	Bronche pulmonaire normale et asthmatique	4
Figure 2	Obstruction bronchique	7
Figure 3	Mécanismes physiopathologiques de l'asthme	7
Figure 4	Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des anti-oxydants régulateurs de leur production	13
Figure 5	Physiopathologie de l'asthme adapté avec permission	15
Figure 6	Le stress oxydatif et nitrosant dans l'asthme	16
Figure 7	Marché mondial du clou de girofle en 2019	18
Figure 8	Clou de girofle	19
Figure 9	Le girofle (<i>Syzygium aromaticum</i> L) avant, pendant et après la période de floraison	19
Figure 10	Timbre-poste émis en 1946	21
Figure 11	Les clous de girofle avant et après le séchage	21
Figure 12	Propriétés de l'eugénol	22
Figure 13	L'effet de l'eugénol dans le contrôle de l'inflammation.	24
Figure 14	Structure chimique de l'eugénol	25
Figure 15	Structure chimique de l'acide caféique	28
Figure 16	Structure chimique des tanins condensés	29
Figure 17	Squelette de base des flavonoïdes	30
Figure 18	Les activités biologiques de <i>S. aromaticum</i> et ses composés apparentés	31
Figure 19	Résumé graphique de la présente étude sur le dosage des composés phénoliques et la détermination des activités anti-oxydantes de l'extrait aqueux de <i>Syzygium Aromaticum</i> .	34
Figure 20	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	35
Figure 21	Le protocole expérimental global.	39
Figure 22	Schéma du principe de la technique ELISA sandwich utilisée	43
Figure 23	Chromatogramme HPLC de l'extrait aqueux de <i>Syzygium aromaticum</i>	53
Figure 24	Variation de taux des protéines totales dans le sérum et le liquide du LBA chez les rats témoins et traités.	62
Figure 25	Variation de taux de L'IL-4 dans le sérum, le liquide de LBA et les poumons chez les rats des 4 lots.	64
Figure 26	Variation des niveaux des protéines carbonylées (PC) dans le foie et les poumons chez les rats des 4 lots.	71
Figure 27	Variation des niveaux des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP) dans le foie et les poumons chez les rats des 4 lots.	73
Figure 28	Variation des niveaux de CAT dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.	75
Figure 29	Coupes histologiques de du foie de rats issus de 4 lots expérimentaux. (x40)	80
Figure 30	Coupes histologiques de poumons de rats issus de 4 lots expérimentaux. (x40)	81

Liste des tableaux

Tableau 1	Facteurs déclenchant l'asthme	5
Tableau 2	Classification de l'asthme selon les stades de sévérité	8
Tableau 3	Classification du giroflier	20
Tableau 4	Les classes des anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques et leurs propriétés	27
Tableau 5	Activités biologiques de certains composés phénoliques	30
Tableau 6	Étapes de dépôt et plan de distribution sur la plaque ELISA	50
Tableau 7	Données du procédé d'extraction à partir de la plante étudiée <i>Syzygium aromaticum</i>	52
Tableau 8	Concentration en composés phénoliques de l'extrait aqueux de <i>Syzygium aromaticum</i>	52
Tableau 9	Pourcentage d'activité anti-radicalaire (ABTS) et d'activité anti-oxydante de l'extrait aqueux de <i>Syzygium aromaticum</i> par les méthodes DPPH et β -carotène	53
Tableau 10	Identification de certains composés phénoliques d'extraits aqueux de <i>Syzygium aromaticum</i> par instruments HPLC.	54
Tableau 11	Variation du poids corporel chez les 4 lots.	57
Tableau 12	Variation de la consommation quotidienne chez les 4 lots.	57
Tableau 13	Variation du poids absolu (PA) (g) et relatif (PR) des poumons et du foie chez les rats témoins et traités.	59
Tableau 14	Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités.	60
Tableau 15	Variation des paramètres hématologiques	61
Tableau 16	Variation de taux de MDA dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.	70
Tableau 17	Variation de taux de GSH dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.	72
Tableau 18	Variation de taux de GPx dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.	74
Tableau 19	Variation de taux de GST dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.	76

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
IO₂	Oxygène singulet.
ABTS	2,2-azinobis “-ethyl-benzothiazoline 6-sulphonate
ADAM 33	A disintegrin and metalloprotease domain
ALAT	Alanine aminotransférase
ALB	Albumine
AL(OH)₃	Aluminium hydroxide
ALCL3	Trichlorure d'aluminium
AMP	Ampicilline
AOPP	Advanced oxidation protein products
AMX	Amoxicilline
ASAT	Aspartateaminotransférase
ATP	Adénosine Triphosphate
BHT	Burtylhydroxytoléine
BSA	Albumine bovine sérique
CAT	Catalase
CCL2	Chemokine Ligand 2
CHIL3	Chitinase-Like protein 3
CTX	Céfotaxime
CYP 450	Cytochrome P450
DO	Densité optique
DNP	2,4- dinitrophényl
DNPH	2,4-54 dinitrophénylhydrazine
DPP10	Dipeptidyl peptidase like 10
DPPH	2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque
ECQ	Extrait aqueux
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
EOA	Espèces oxygénées activées
Elisa	Enzyme Linked-Sorbent Assay
EP	Ertapénème
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène.
ERN	Espèces Réactives du nitrogène
FcεRI	Récepteur IgE de haute affinité
FMLP	N-formul-méthionyl-leucyl-phénylalanine
FNS	Numération formule sanguine
FRAP	Ferric reducing antioxidant power

GB	Globules Blancs.
GLP	Glyphosate
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colonie-stimulating factor
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Globule rouge
GR	Glutathion réductase
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S-transférase
GSH	Glutathion réduit
HRP	Horse Radish Peroxidase
HBR	Hyperréactivité bronchique
HPLC	High-performance liquid chromatography
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HSV-1	Anti-virus herpès simplex de type 1
IC₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
IgE	Immunoglobulines E
IL	Interleukine
IL-4R	Interleukin 4 receptor
ILC2	Cellules lymphoïdes innées de type 2
Ip	Intrapéritonéale
KH₂PO₄	Monopotassium phosphate
LBA	Liquide broncho – alvéolaire
LPO	Peroxydation lipidique
LTB₄	Leucotriène B ₄
MDA	Malondialdéhyde
mtNOS	No synthase mitochondriale
NADPH	Nicotinamide dinucleotide phosphate.
NaOH	Soude
NaCl	chlorure de sodium
NBT	Nitro-bleu tetrazolium.
NF-κβ	Nuclear factor-kappa β
NO	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
NO.	Ion nitroxyle
OH	Radical hydroxyle
O₂.	Oxide
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
OVA	Ovalbumine
PA	Poids absolu
PAL	Phosphatase alcaline

PC	Poids corporel
PCO	Protéines carbonylées
PR	Poids relatif
Prx	Peroxyredoxines
RANK-L	Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand
ROOH	Tert-Butyl hydroperoxide
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Superoxydes Dismutases
TBA	“2-Thiobarbituric acid”: L'acide thiobarbiturique
TBARS	Thiobarbituric reactive species
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloroacétique
TCR	T-cell receptor
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
Th0	Lymphocyte naïf
TH1	Lymphocyte T Helper 1
TH2	Lymphocyte T Helper 2
TLR	Toll Like Receptor
TMB	3,3', 5,5 -Tétraméthyl-Benzidine
TNF	Tumour Necrosis Factor
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WBC	White blood cells (cellules leucocytaires totales)

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires caractérisée par une hyperréactivité bronchique survenant sous l'influence complexe de facteurs environnementaux et génétiques (OMS, 2020). Les différents symptômes de l'asthme allergique apparaissent très vite, suite à l'inhalation de l'allergène et en raison de l'inflammation sous l'action des médiateurs relargués dans les voies aériennes des poumons engendrant un resserrement des muscles autour des petites voies respiratoires et un rétrécissement de ces dernières. Le développement de cette inflammation peut également conduire à un déséquilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les anti-oxydants, conduisant ainsi à un stress oxydatif. De plus, l'expression et la sécrétion accrues des ROS, dues à l'activation des cellules inflammatoires, peuvent conduire à la libération d'autres médiateurs inflammatoires, endommageant de surcroît les cellules épithéliales et augmentant l'hyperréactivité bronchique (Aldakheel *et al.*, 2016).

En raison de la nature chronique de l'asthme allergique et de sa prévalence croissante, outre l'inefficacité réputée des médicaments actuellement utilisés pour guérir définitivement cette pathologie et la crainte de leurs effets secondaires connus, il existe un besoin urgent de trouver de nouveaux traitements. À cet égard, les remèdes naturels (épices et plantes médicinales) ont été utilisés en médecine traditionnelle depuis plusieurs centaines d'années déjà (Xue *et al.*, 2022) et leur richesse en composés bioactifs a été bien documentée ces dernières décennies. Leurs propriétés anti-oxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires, antidiabétiques et anticancéreuses qui aident à combattre diverses maladies ont également fait l'objet d'une recherche florissante. Parmi ces remèdes naturels il y a le clou de girofle. Cette épice est la forme séchée des boutons floraux de l'arbre du giroflier, également connu sous le nom de *Syzygium aromaticum*, membre de la famille des Myrtacées qui pousse dans les zones tropicales (Jamel Kiki, 2023), et qui fait partie de ces plantes utilisées ancestralement à des fins thérapeutiques et souvent associées au renforcement du système immunitaire (Jamel Kiki., 2023 ; Batiha *et al.*, 2020). Ce rôle étant attribué à la présence de divers constituants chimiques présents en concentrations élevées, parmi lesquels l'eugénol, connu pour ses vertus antiseptique et analgésique et est ainsi utilisé dans le domaine dentaire pour la fabrication de bains de bouche et de pâtes gingivales contre les infections buccales. On peut également le retrouver dans des pommades servant à décongestionner les bronches en cas de rhume ou de bronchite.

Aussi, la présente étude a exploré les effets préventifs (anti-inflammatoire et anti-oxydants) de l'extrait aqueux des boutons floraux de cette plante sur l'inflammation des voies respiratoires

induite par un allergène dans le cadre d'un modèle d'asthme allergique chez le rat Wistar. Par ailleurs, dans un premier temps, nous avons pris le soin d'établir le dosage de certains composés polyphénols de l'extrait aqueux de la plante *Syzygium aromaticum* et leur identification par l'intermédiaire de l'HPLC. Puis, nous avons analysé le potentiel antioxydant de notre extrait avant d'entamer l'expérimentation animale précédemment citée.

C'est ainsi que nous avons présenté notre thèse en développant successivement les points suivants :

✓ **Une partie bibliographique comprenant :**

- La maladie de l'asthme, ses origines et facteurs déclenchants, sa physiopathologie et sa symptomatologie
- Le stress oxydatif et son implication dans l'asthme
- Une description de la plante étudiée (le giroflier), notamment ses origines, son mode de culture,
- Les activités biologiques (anti-oxydante, antimicrobienne, antivirale...etc.), et également de sa composition chimique.

✓ **Une partie expérimentale, elle-même subdivisée en deux :**

- Etude *in vitro* comprenant :
 - L'obtention de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum*.
 - Les dosages des phénols totaux, des flavonols, des orthodiphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés réalisés sur notre extrait aqueux.
 - L'évaluation de son activité anti-oxydante par le test de DPPH, ABTS et β -carotène
 - Screening chimique par l'intermédiaire de l'HPLC
- Etude *in vivo* le traitement des rats wistar par l'extrait aqueux du clou de girofle dans le cadre d'un modèle d'asthme expérimental et évaluation de certains paramètres :
 - En commençant par les poids relatifs et absolus des rats et des organes clés (foie et poumons).
 - Biomarqueurs hépatiques (ASAT, ALAT, PAL et ALB)
 - Biomarqueurs du stress oxydatif (MDA, PC, GSH, AOPP, GPx, GST et CAT).

- Paramètres hématologiques et inflammatoires (FNS, l'IL-4 dans le sérum, les poumons et le LBA)
 - Étude histologique des organes clés (foie et poumons)
 - Enfin, nous présenterons les résultats obtenus avec l'analyse statistique et l'interprétation correspondantes.
- ✓ **Nous terminerons l'ensemble par une conclusion et des perspectives.**

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I
L'ASTHME ALLERGIQUE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : L'asthme allergique

1. Définition

L'asthme est une pathologie chronique caractérisée par une inflammation des voies aériennes aboutissant à une obstruction bronchique réversible (voir figure 1) (Taillé, 2019).

Il s'agit d'une maladie très hétérogène ; c'est-à-dire que plusieurs asthmes avec des caractéristiques cliniques, biologiques et fonctionnelles communes ont été identifiés. Ainsi, l'asthme allergique est le plus fréquent de ces phénotypes d'asthme. D'autres phénotypes, tels que l'asthme de l'obèse, l'asthme à éosinophiles non allergique, qui ont leurs caractéristiques propres, ont également été décrits (Conde *et al* ; 2021).

On estime que 50 % des patients présentent une forme d'origine allergique qui se caractérise par une inflammation des bronches et une gêne respiratoire à la suite de l'inhalation d'allergènes, le plus souvent des acariens (Guillon N, 2021).

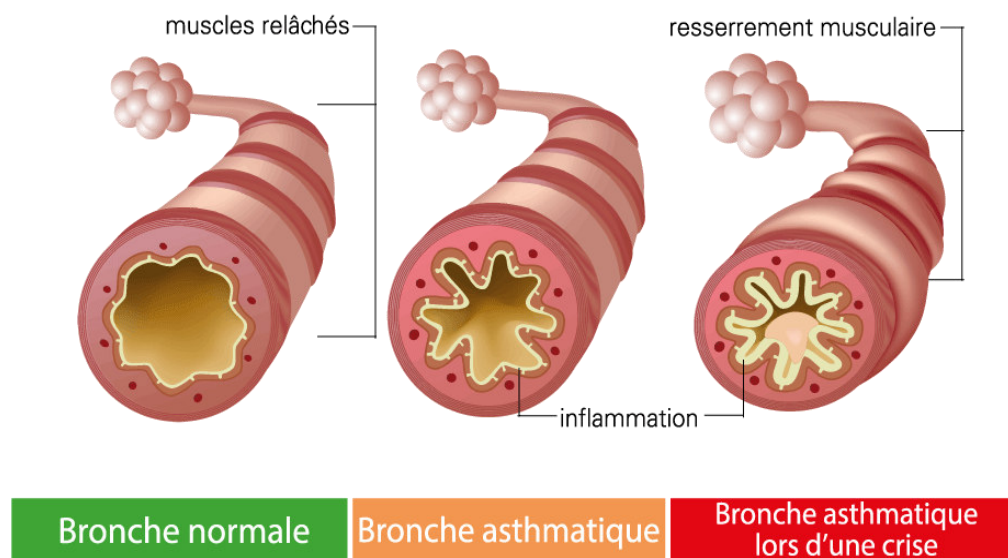


Figure 1. Bronche pulmonaire normale et asthmatique

(L'Association pulmonaire du Québec, 2019)

2. Épidémiologie

En 2019, on estime que 262 millions de personnes souffraient d'asthme et que cette maladie a entraîné 461 000 décès (Lancet, 2020).

À la faveur des enquêtes nationales et internationales menées et auxquelles l'Algérie a participé, pas moins de 4% de la population adulte est asthmatique, soit plus d'un million et demi d'Algériens et près de 8% des enfants ont un asthme bronchique.

3. Manifestations cliniques

Les symptômes ou les manifestations cliniques de cette maladie sont :

- Essoufflement et oppression thoracique
- Respiration sifflante
- Toux
- Production augmentée de mucus

Lorsqu'on exprime un ou plusieurs de ces symptômes, on peut parler de « crise d'asthme ». Cette dernière lorsqu'elle est sévère peut être une expérience terrifiante qui s'accompagne de sensations de suffocation, d'essoufflement et de perte de contrôle. Ainsi, l'asthme mal traité ou sous-estimé peut mettre la vie en danger (L'Association pulmonaire du Québec, 2019).

4. Les facteurs déclenchant

L'asthme est une maladie multifactorielle résultant d'interactions complexes entre des facteurs génétiques, environnementaux et comportementaux (voir tableau 1).

Tableau 1. Facteurs déclenchant l'asthme (GINA, 2017)

Facteurs liés à l'hôte	Facteurs environnementaux
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Génétique ex : gènes (ADAM33, CHI3L1, DPP10), hyperréactivité bronchique, inflammation des voies aériennes) ➤ Obésité ➤ Sexe (Enfants : garçons+++ Adultes : femmes +++) ➤ Stress, émotions fortes 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Allergènes <ul style="list-style-type: none"> - A l'intérieur : acariens domestiques, animaux à fourrure, champignons... - A l'extérieur : pollen, moisissures - Allergènes et sensibilisateurs professionnels (ex : farine, laboratoire, rongeurs, peintures) ➤ Infections (principalement virales) ➤ Exposition à la fumée de tabac ➤ Pollution de l'air intérieur et extérieur ➤ Régime alimentaire ➤ Certains médicaments (ex : Paracétamol)

5. Les mécanismes physiopathologiques

5.1. Phase de sensibilisation

Les allergènes entrent en contact avec l'épithélium bronchique. Le contact entre les allergènes et les cellules épithéliales par l'interaction avec certains récepteurs, comme les Toll Like

Receptor (TLR), provoque la sécrétion de différentes molécules. Parmi lesquelles, on retrouve: des alarmines (telle que l'IL-33, l'IL-25 et le TSLP), des cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IL-1a et le GM-CSF) et des chimiokines (telles que le CCL2) (Barnes, 2018) (Hoffmann *et al*, 2016). La sécrétion de l'ensemble de ces molécules recrute les cellules lymphoïdes innées de types 2 (ILC2) et les macrophages alvéolaires qui permettent ensuite la mise en place d'une surveillance allergénique par le réseau de cellules dendritiques (Lambrecht *et al*, 2015).

L'allergène rentre en contact avec les cellules dendritiques qui vont l'apprêter, puis le présenter aux lymphocytes T naïfs. Ces derniers vont se différencier en lymphocytes Th2 qui vont produire des cytokines (notamment l'IL-4), qui agissent sur les lymphocytes B et induisent la production des IgE par les plasmocytes (Figure 3) (Madore *et al*, 2010).

5.2. La réexposition à l'allergène

La réexposition du système immunitaire à l'allergène s'établit en deux phases, une phase aiguë et une phase retardée.

-La phase aiguë survient dans les minutes suivant la réexposition. Lors de l'exposition à un allergène, le crosslinking d'IgE, spécifiques de cet allergène, liés aux récepteurs FcεR1 situés à la surface des mastocytes, entraîne la libération du contenu de leurs granules cytoplasmiques (histamine, sérotonine, héparine, chondroïtine sulfate, tryptase, chymase, carboxypeptidase), de chimiokines et de cytokines, de facteurs de croissance (Tumor necrosis factor (TNF)-α et vascular endothelial growth factor (VEGF-A) ainsi que des médiateurs lipidiques dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique (Reber *et al*, 2017). Ces médiateurs provoquent une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire bronchique ainsi qu'un recrutement de cellules inflammatoires telles que les lymphocytes Th2, la contraction des muscles lisses bronchiques (figure 2), une sécrétion de mucus. Tous ces effets vont se traduire, d'un point de vue symptomatologique, par des sifflements, des éternuements et de la toux (Barnes, 2011).

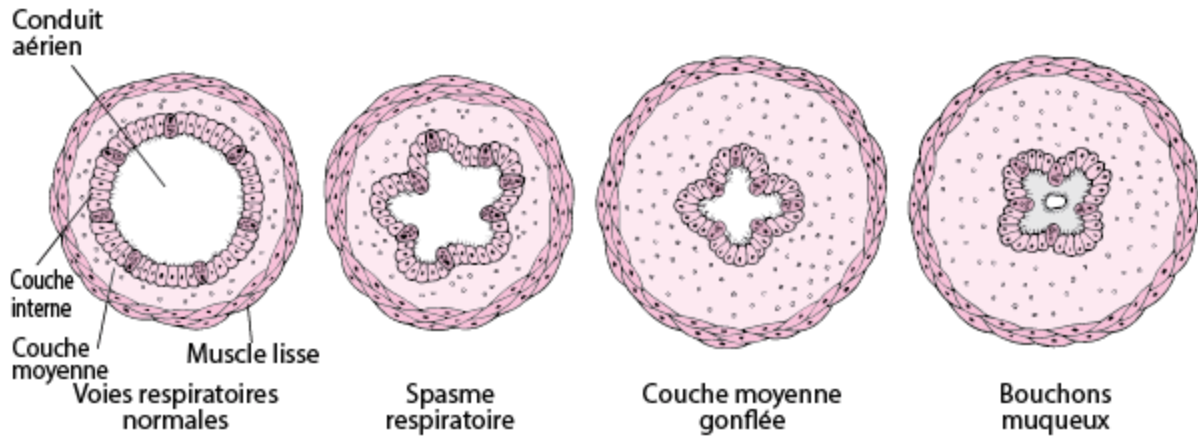


Figure 2. Obstruction bronchique (Ortega, 2019)

-La phase retardée se développe entre 2 et 6 heures après la réexposition à l'allergène (Figure 3). Elle est le résultat de l'activation des lymphocytes Th2 et aboutie au remodelage bronchique. Ainsi, les lymphocytes Th2 provoquent une surproduction de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) dans les voies aériennes. Ces cytokines orchestrent le recrutement d'éosinophiles (Inserm, 2017) qui à leur tour, contribuent à l'inflammation par la synthèse de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (protéine basique majeure, peroxydase éosinophilique, superoxyde, produits dérivés de leucotriènes) (Lambrecht *et al.*, 2017).

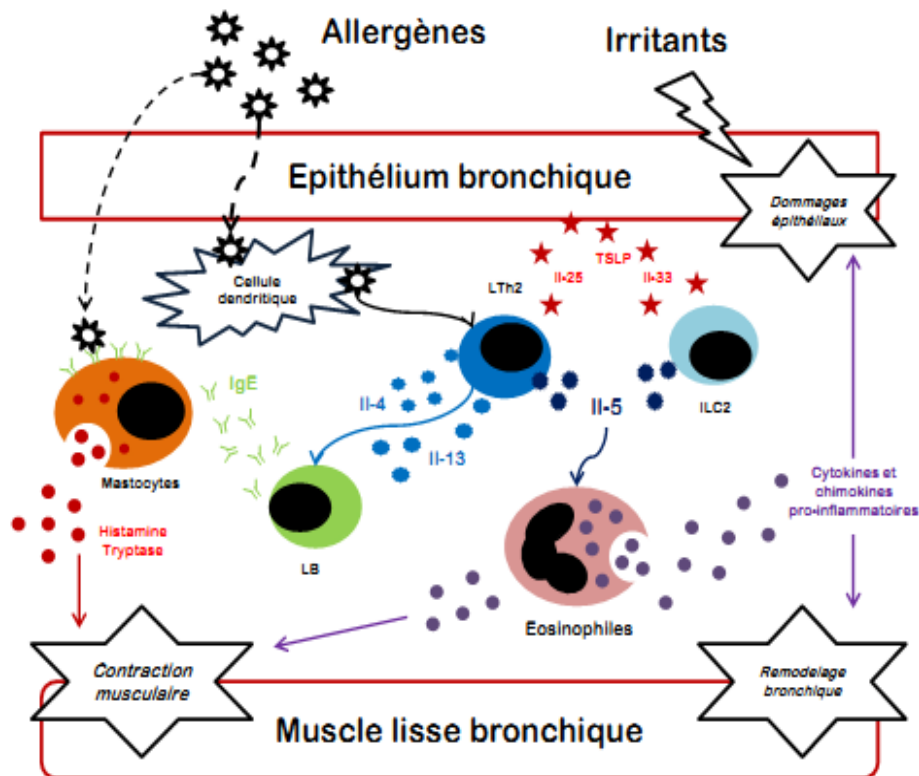


Figure 3 . Mécanismes physiopathologiques de l'asthme (Hassoun, 2019)

6. Classification d'asthme

La classification actuelle de l'asthme prend en considération la sévérité clinique, la thérapeutique et le débit expiratoire de pointe DEP (Mantik *et al*, 2011). Ainsi, selon Global Initiative for Asthma (GINA), l'asthme peut être intermittent, persistant léger, persistant modéré ou persistant sévère (voir tableau 2). La sévérité de l'asthme varie selon les individus. Elle n'est pas nécessairement associée à la fréquence ou la sévérité des symptômes, et, elle peut changer chez un même individu avec le temps. Les décisions d'un traitement sont prises sur la base de la sévérité de l'asthme. La classification se fait selon une évaluation associant les symptômes et les mesures de la fonction respiratoire. Lorsque le patient reçoit un traitement lors de l'évaluation de la sévérité, la classification de cette dernière doit être basée sur les caractéristiques cliniques et le traitement administré au patient le jour de l'évaluation (GINA, 2017).

Tableau 2. Classification de l'asthme selon les stades de sévérité (GINA, 2017)

Stade asthme	Signes respiratoires	VEMS ou DEP/ théorique	Variation DEP*
Asthme intermittent léger (Stade I)	Symptômes intermittents et brefs moins d'une fois/semaine Symptômes nocturnes moins de 2/mois Asymptomatique entre les crises	>80%	<20%
Asthme persistant léger (Stade II)	Symptômes >1 fois/semaine et non quotidiens Symptômes nocturnes >2/mois Possibilité de perturbation de l'activité	>80%	20-30%
Asthme persistant modéré (Stade III)	Symptômes quotidiens Symptômes nocturnes >1 fois/semaine Activité physique perturbée	<80% et >60%	>30%
Asthme persistant sévère (Stade IV)	Symptômes permanents Symptômes nocturnes fréquents Activité limitée	<60%	>30%

7- Physiopathologie de l'asthme

Le principal processus physiopathologique de l'asthme est une inflammation persistante, mais variable des voies respiratoires (Mantik *et al*, 2011). Les deux caractéristiques principales largement liées à la sévérité de l'asthme sont : l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation bronchique.

L'hyperréactivité bronchique (HBR), est la tendance des bronches à obstruer (Bronchospasme) sous l'influence des stimuli divers qui seraient sans effet chez un sujet normal. Elle est présente chez 99% des asthmatiques, dans plus de 50% des cas de rhinite chronique, ou même certaines bronchites chroniques.

L'inflammation bronchique se traduit par une altération de l'épithélium, qui perd alors son effet de barrière vis-à-vis des allergènes et de nombreux médiateurs. Ceci permet l'infiltration des bronches par des cellules inflammatoires dont principalement des mastocytes, des éosinophiles et des lymphocytes, ainsi que par de nombreux médiateurs tels que l'histamine et les cytokines. Enfin un important gonflement de la muqueuse bronchique s'installe (œdème), une contraction de la musculature bronchique (bronchospasme) et une sécrétion de mucus abondant et collant (hypersécrétion) sont la cause de la dyspnée (voir figure3) (Prudhomme, 2008).

8- Traitement

On ne peut pas guérir de l'asthme, mais une bonne prise en charge avec des médicaments par inhalation permet aux personnes asthmatiques de maîtriser la maladie et de mener une vie normale et active.

On distingue deux types d'inhalateurs :

- les bronchodilatateurs (tels que le salbutamol) qui ouvrent les voies aériennes et soulagent les symptômes ; et
- les stéroïdes (tels que la béclométhasone) qui réduisent l'inflammation des voies aériennes. Ils améliorent les symptômes de l'asthme et réduisent le risque de crise d'asthme sévère et de décès.

Les personnes qui souffrent d'asthme ont parfois besoin d'utiliser leur inhalateur tous les jours. Le traitement dépend de la fréquence des symptômes et des différents types d'inhalateurs disponibles.

Il peut être difficile de coordonner sa respiration avec un inhalateur, notamment pour les enfants et en situation d'urgence. L'utilisation d'une chambre d'inhalation facilite l'utilisation des aérosols et permet au médicament d'atteindre plus efficacement les poumons. Une chambre

d'inhalation est un contenant en plastique dont l'une des extrémités est équipée d'un embout ou d'un masque. À l'autre extrémité, un trou permet d'insérer l'inhalateur. Une chambre d'inhalation fabriquée artisanalement à partir d'une bouteille en plastique de 500 ml peut se révéler aussi efficace qu'une chambre d'inhalation vendue dans le commerce.

L'accès aux inhalateurs demeure un problème dans de nombreux pays. En 2019, dans les établissements publics de soins de santé primaires des pays à faible revenu, seule la moitié des personnes asthmatiques avaient accès à un bronchodilatateur et moins d'une sur cinq avait accès à un inhalateur stéroïdien (WHO, 2020).

Les personnes asthmatiques et leur famille doivent être informées pour mieux comprendre l'asthme, son traitement, les facteurs déclenchants à éviter et la prise en charge des symptômes chez soi. Il est également important de sensibiliser la population afin de mettre un terme aux idées reçues et à la stigmatisation associées à l'asthme dans certains endroits.

Chapitre II :

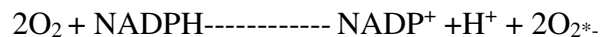
***L'EXPLOSION OXYDATIVE
(RESPIRATORY BURST) ET
IMPLICATIONS DANS
L'ASTHME***

CHAPITRE II : L'explosion oxydative (Respiratory burst) et implications dans l'asthme

1- Définition

L'explosion oxydative dite aussi Respiratory burst se définit comme étant un mécanisme qui permet l'élimination de l'agent pathogène phagocyté. Cette élimination conduit à la production et à la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (ERO), comme l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), par différents types de cellules appartenant aux système immunitaire (Ex : Les polynucléaires neutrophiles humains, les cellules , les leucocytes) (Gougerot-Pocidallo *et al*,2002).

Cependant, la production excessive des ERO participe à l'induction des lésions tissulaires dans certaines maladies inflammatoires aiguës ou chroniques, telles que l'asthme. Les ERO sont produites par un système multimoléculaire complexe, comme la NADPH oxydase. Cette enzyme qui se trouve dans le système circulatoire, permet de produire des ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en premier lieu afin de permettre à ce dernier de se recombiner avec d'autres molécules pour produire à son tour d'autres radicaux réactifs (Gougerot-Pocidallo *et al*,2002).



L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et des ERO. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement (Bourgoin, 2012).

Beaucoup de constatations expérimentales et cliniques suggèrent que les oxydants jouent un rôle dans la pathogénie de plusieurs désordres respiratoires, telle que l'asthme. En particulier, Il est de plus en plus évident que l'inflammation chronique des voies aériennes, typique de l'asthme résulte d'une augmentation du stress oxydatif dans ces voies, ce que démontrent les taux élevés des produits de stress chez les asthmatiques. De ce fait, le poumon possède un système anti-oxydant bien développé (Zhao, 2008).

2- Les espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène

Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées telles que les radicaux libres, ions oxygénés, peroxydes, rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés dans l'orbitale la plus externe. L'équilibre est rétabli soit par oxydation (perte de cet électron libre) ou par réduction (gain d'un autre électron). Le caractère radicalaire de la

molécule ne disparaît pas, l'électron libre peut passer sur d'autres molécules, c'est le phénomène d'oxydation en chaîne (Delattre *et al*, 2007).

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'O₂, les espèces réactives de l'oxygène ou ERO (en anglais, Reactive Oxygen Species ou ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également les composés non radicalaires (hydroperoxydes ROOH et H₂O₂). L'H₂O₂, produit de la dismutation de l'O₂^{•-}, est beaucoup plus stable que ce dernier et a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques (contrairement à l'O₂^{•-}) (Droge, 2002 ; Thannickal, 2000).

Les ERO jouent le rôle de seconds messagers, régulant plusieurs processus physiologiques moléculaires cellulaires et tissulaires. Elles participent dans la défense antibactérienne au cours des réactions de cytotoxicité face aux agents pathogènes, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la transduction de signaux cellulaires, la régulation des gènes par un phénomène appelé contrôle redox des gènes, la modulation du métabolisme cellulaire par interaction ligand – récepteur, le développement embryonnaire, la croissance, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (W.A. Pryor, 2012).

Il y a aussi les espèces réactives du nitrogène ERN dont le monoxyde d'azote NO est formé à l'issue d'une réaction catalysée par la NO synthase mitochondriale (mtNOS) entre l'atome d'azote appartenant à une L-Arginine (un acide aminé) et une molécule O₂. Le NO[•] est peu réactif et diffusible dans les milieux biologiques, il est oxydable en ion nitrosonium NO⁺ et peut être réduit en ion nitroxyle NO⁻.

Le monoxyde d'azote joue le rôle de vasodilatateur au niveau cardiovasculaire. Il joue aussi un rôle dans la signalisation extra et intercellulaire, l'apoptose, les mécanismes de défense, dans la relaxation des cellules musculaires lisses, la coagulation sanguine, la neurotransmission, le maintien de la plasticité neuronale, et dans l'intégrité muqueuse gastro-intestinale (Helmut, 2013).

3- Les anti-oxydants

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses anti-oxydantes (Figure. 4). On distingue deux sources d'anti-oxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages

oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes anti-oxydantes (Haleng, 2007).

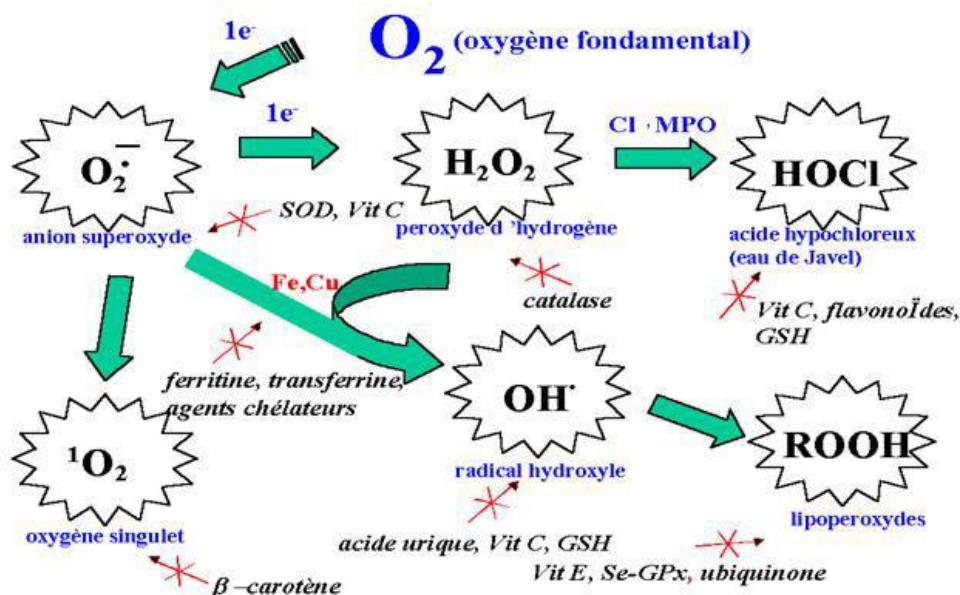


Figure 4. Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des anti-oxydants régulateurs de leur production (Haleng, 2007).

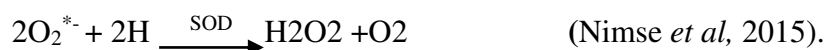
3.1- Les anti-oxydants enzymatiques

Les principales enzymes anti-oxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion Peroxydase (GPX) et la catalase (CAT). Plus récemment d'autres enzymes ayant des propriétés anti-oxydante sont été révélées, il s'agit des peroxyredoxines (Prx).

3.1.1- Les superoxydes dismutases

Les SOD constituent la première ligne de protection contre les dérivés radicalaires de l'oxygène (Vergely *et al*, 2003). Ils sont présents dans presque toutes les cellules aérobies et dans les liquides extracellulaires (Kabel *et al*, 2014).

Les SOD catalysent la conversion d'anions superoxydes en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (Belge, 2016).



3.1.2- La catalase

C'est une enzyme peroxysomale qui se trouve également dans les autres compartiments cellulaires (Castaldo *et al*, 2016). La CAT catalyse la dismutation d'eau oxygénée en eau et oxygène.

3.1.3- La glutathion peroxydase

La GPx fait partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H₂O₂. Le système glutathion inclut la glutathion, la glutathion réductase, la glutathion peroxydase (Mandal, 2012). La glutathion réductase (GR) est une oxydoréductase NADPH-dépendant, coopérant avec la glutathion peroxydase. Il catalyse la conversion du glutathion oxydé (GSSG) à glutathion réduit (GSH). (Csiszár *et al*, 2016). Le GPx désintoxique le H₂O₂ et le ROO utilisant le GSH comme un substrat. (Omodanisi *et al*, 2017)

3.2- Les systèmes anti-oxydants non-enzymatiques

Les anti-oxydants non-enzymatiques réagissent directement avec les agents oxydants et les désactivent.

3.2.1. La glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de la glycine : γ -L-Glutamyl-L-cystéinylglycine .Il peut réagir chimiquement avec O₂⁻, OH, H₂O₂. Cette réaction signifie que le GSH peut fonctionner comme un éboueur de radical libre (Sharma *et al*, 2012). Il intervient dans la défense contre l'oxydation *via* leur rôle comme cofacteur de certaines enzymes anti-oxydantes

4 - Liens existant entre le stress oxydatif et la pathologie asthmatique

Le stress oxydant est censé avoir un rôle dans le développement des maladies humaines telles que le cancer, les désordres cardiovasculaires et les maladies respiratoires. L'asthme est une maladie résultante de l'inflammation chronique des voies aériennes, et le stress oxydant peut être impliqué dans sa pathogénie (Figure 6) (Comhair et Eruzum, 2010).

En effet, la pathogénèse de l'asthme implique des interactions complexes entre plusieurs types cellulaires et médiateurs, parmi ces derniers, les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote endogènes et exogènes (Comhair et Eruzum, 2010).

L'augmentation de l'explosion oxydative par les cellules immunitaires peut contribuer à la progression ou la persistance de l'inflammation des voies aériennes en provoquant une hyperréactivité accrue de ces voies, une stimulation de la sécrétion de mucine, une induction de divers médiateurs chimiques pro-inflammatoires et la stimulation de bronchospasme (Massoud et Rezaei, 2014).

Les ERO réduisent aussi la fonction béta-adrénergique dans le poumon rendant donc les muscles lisses des voies respiratoires plus sensibles à l'acétylcholine (Rahman, 2012) et provoquent aussi l'hyperréactivité bronchique en stimulant la libération d'histamine par les

mastocytes et la sécrétion de mucus des voies aériennes de l'épithélium (Kirkham *et al*, 2006). Le plus haut niveau de stress oxydatif provoque de graves effets cytotoxiques, y compris l'apoptose et la nécrose (Sook Cho, 2010) (Figure 5).

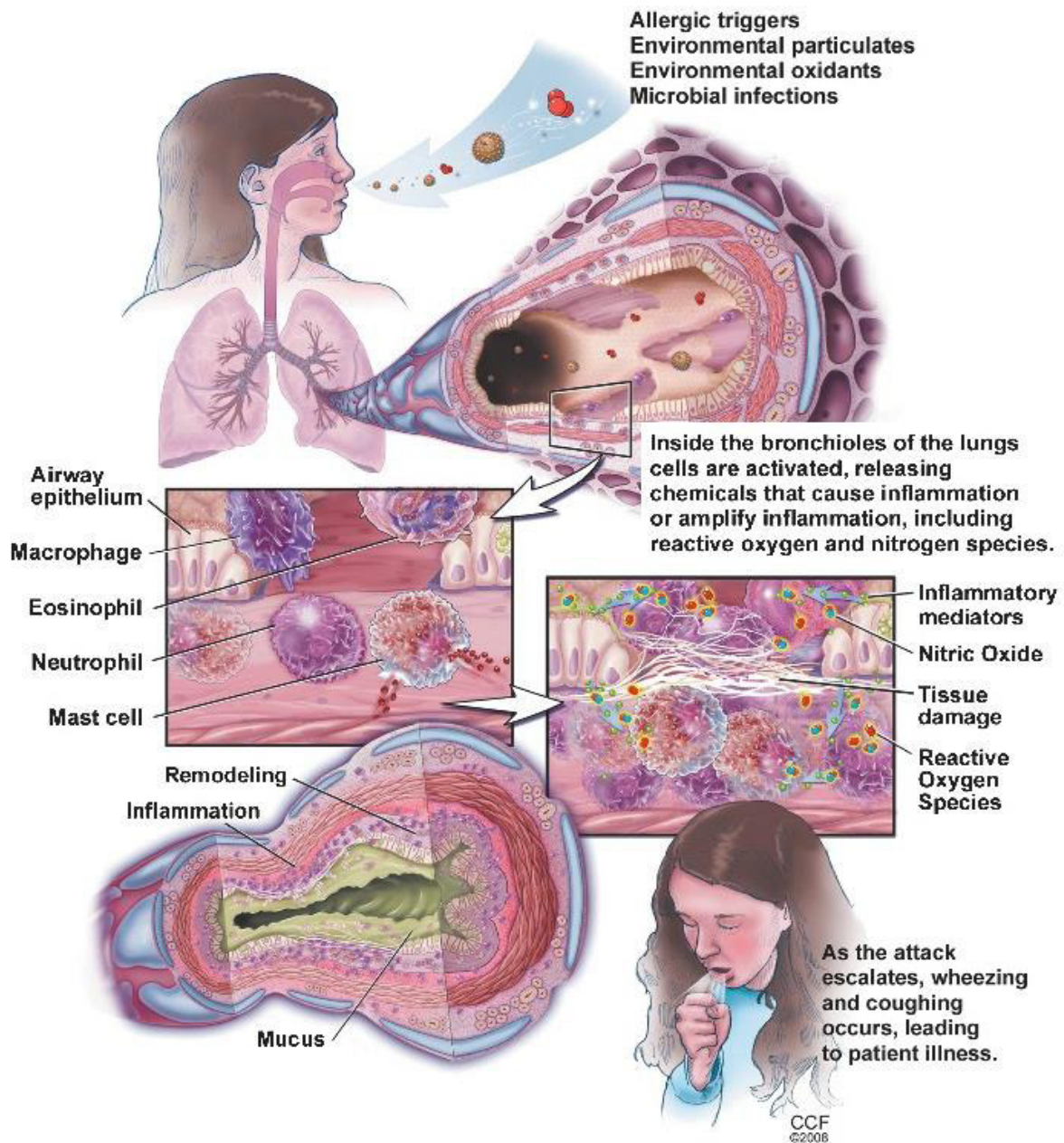


Figure 5. Physiopathologie de l'asthme (Comhair et Erzurum, 2010).

Les cellules inflammatoires et immunitaires dans les voies respiratoires, tels que les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles, libèrent une quantité accrue d'ERO chez des patients asthmatiques (Kirkham *et al*, 2006). Lorsqu'elles sont activées, ces cellules peuvent produire du superoxyde (O_2^-) par l'intermédiaire de complexe membranaire NADPH-dépendant et la dismutation ultérieure de l' O_2^- donne le peroxyde d'oxygène (H_2O_2). Le O_2^- et le H_2O_2 sont essentiels pour la formation des radicaux cytotoxiques puissants comme le radical d'hydroxyle ($\bullet OH$) ainsi que les ERN (Dworski, 2000) (Barnes, 2009).

Des études ont montré que les niveaux de GPx et de SOD ainsi que les composants non enzymatiques du système anti-oxydant incluant le glutathion réduit, l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, le lycopène, et le β -carotène ont été significativement plus faibles chez les enfants souffrant d'asthme par rapport aux sujets contrôles sains (Sahiner, 2011). Ainsi, l'asthme est caractérisé par la perte de l'activité anti-oxydante touchant à la fois les anti-oxydants, enzymatiques et non enzymatiques (Figure 6).

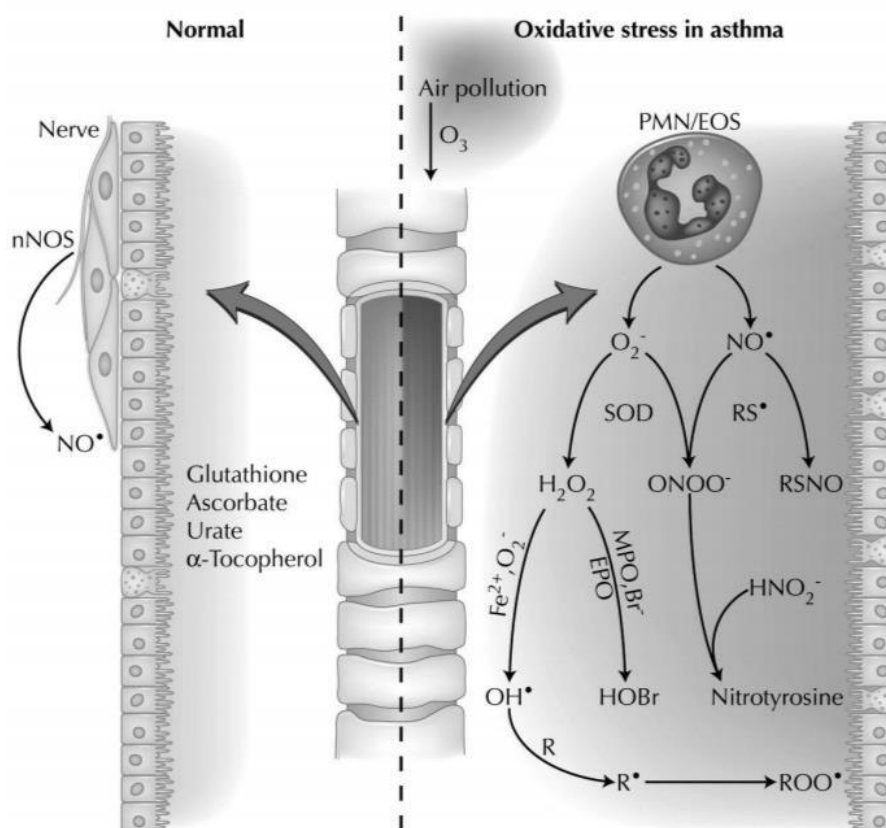


Figure 6. Le stress oxydatif et nitrosant dans l'asthme (Bowler, 2004)

Chapitre III

LE GIROFLIER

(Syzygium aromaticum)

CHAPITRE III : Le giroflier (*Syzygium aromaticum*)

1. Historique

Le giroflier ou girofle (*Syzygium aromaticum*) est un arbre originaire des îles Moluques en Indonésie. Son usage comme épice et plante aromatique est plurimillénaire, il est mentionné dans des livres chinois d'avant l'ère chrétienne. Les produits du giroflier furent importés régulièrement en Europe dès le septième siècle (François, 1936; Maistre, 1964).

Mais l'histoire moderne du girofle commence avec la découverte des Moluques par les Portugais et l'expédition commandée par Magellan. D'ailleurs, c'est "La Victoria", le premier navire à réaliser une circumnavigation en 1522, qui ramena en Espagne, un chargement d'épices dont le girofle.

2. Répartition géographique

Aujourd'hui, les exportations malgaches et zanzibar (mais aussi des petits pays exportateurs : Comores, Kenya, Brésil) sont en grande partie destinées au marché asiatique et principalement indonésien qui absorbe la quasi-totalité des volumes exportés (Danthu *et al* ; 2014).

En effet, le marché mondial du girofle est dominé par l'Indonésie et son industrie de la *kreteks* (cigarette indonésienne locale confectionnée à partir d'un mélange complexe de tabac, de clou de girofle et d'une sauce aromatique), suivie de Madagascar, de la République-Unie de Tanzanie notamment les îles productrices Pemba et Zanzibar, du Sri Lanka et des îles Comores qui arrivent loin derrière en termes de quantité produite (Figure 7).

Ce pays est de loin le plus gros producteur de clous de girofle, mais sa production ne couvre cependant pas toujours ses besoins (Danthu *et al* ; 2014).

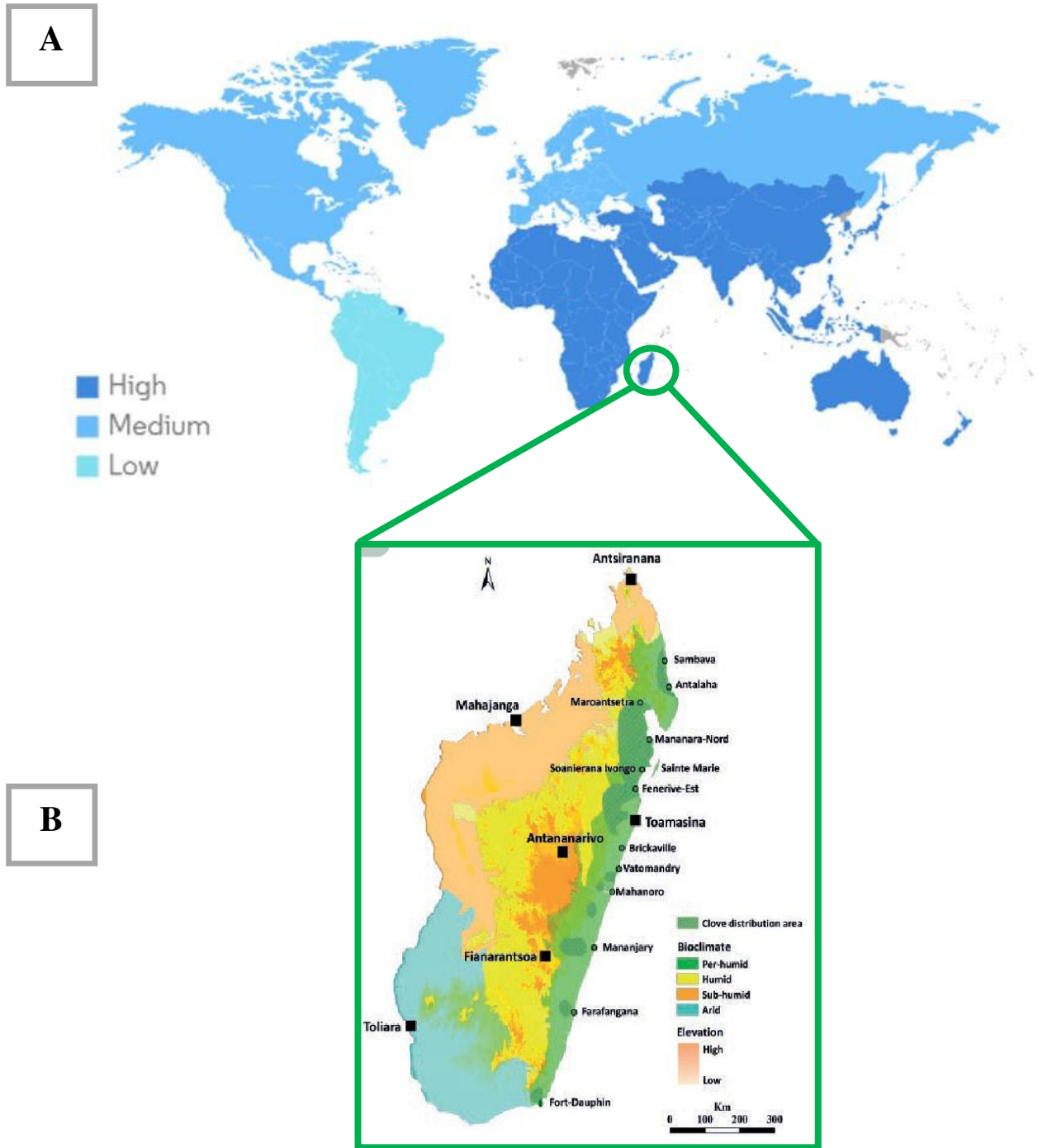


Figure 7. Marché mondial du clou de girofle en 2019 (A) et couverture de la zone de culture du clou de girofle à Madagascar en 1955 (B) (Mordor intelligence, 2023) (Danthu et *al.*, 2014) .

3. Classification botanique

Classification selon l'INPN (INPN. 2021) (Figure 8)

Famille :	Myrtaceae
Genre :	<i>Syzygium</i>
Espèce :	<i>Syzygium aromaticum</i>
Nom Commun :	Giroflier
Nom Anglais :	Clove buds
Nom Arabe :	القرنف



Figure 8. Clou de girofle (Socasau, 2017)

4. Description botanique

Les feuilles du giroflier de couleur vert foncé sont effilées, coriaces et persistantes. Ses fleurs sont blanches, légèrement rosées. Le calice, rouge et long, contient un bouton de fleur, qui s'ouvre en révélant quatre pétales. Si elle est fécondée, la fleur du giroflier donne un fruit appelé mère de girofle ou antofle (la partie la plus aromatique) figure 9 (Phytothérapie, 2019).

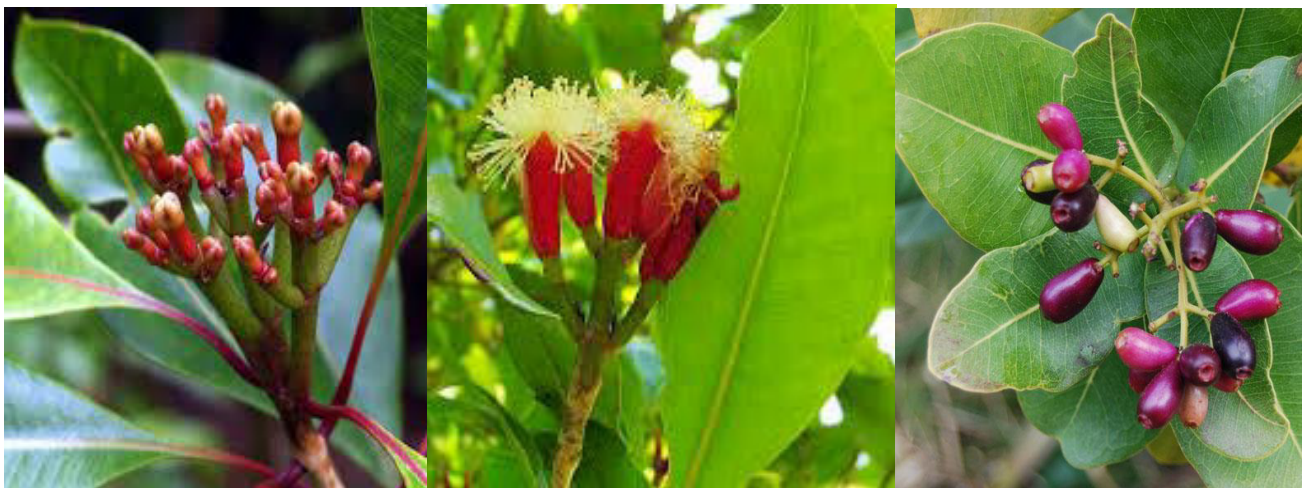


Figure 9. Le girofle (*Syzygium aromaticum* L) avant, pendant et après la période de floraison (Merr. & L.M.Perry, 2019)

5. Classification taxonomique

5.1. Dénomination

Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être nommé *Syzygium aromaticum* (Mahdid et Hamichi, 2018).

- *Caryophyllus aromaticus* L. (1753)
- *Eugenia caryophyllata* Thunb. (1788)

- *Eugenia caryophyllus* Spreng. (1825)
- *Eugenia aromatica* (L.) Baill. (1876)
- *Jambosa caryophyllus* (Thunb.) Nied. (1893)
- *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, (1939)

Actuellement, les noms *Syzygium aromaticum* et *Eugenia caryophyllus* sont tous les deux employés.

5.2 . Classification botanique

Le clou de girofle (*Syzygium aromaticum* L), est un bouton de fleur séché appartenant à la famille des Myrtacées tableau 3 qui est indigène des îles Moluques en Indonésie mais qui a été récemment cultivé dans différents endroits du monde (Gaber, 2020).

Tableau 3. Classification du giroflier (Goetz, 2010)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta (phanérogames)
Sous-embranchement	Magnoliophytina (angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (dicotylédones)
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i>

6. Production mondiale de girofle

L'Indonésie n'est pas le principal exportateur de clou de girofle malgré son titre de premier producteur, c'est que sa consommation locale est très importante.

L'Indonésie est avec l'Inde l'un des gros consommateurs de cette épice qui entre notamment dans la fabrication des « *Kretek* », cigarettes locales.

Madagascar est aujourd'hui le second producteur mondial après l'Indonésie et premier exportateur mondial de clous et d'essence de girofle.

L'une des particularités du girofle, comparé à la majorité des plantes à épice, est de fournir deux produits d'intérêt économique majeur: les clous séchés et les huiles essentielles extraites des clous, des feuilles et des griffes (Razafimamonjison, 2018) (Figure 10).



Figure 10 . Timbre-poste émis en 1946 (Cocoual and Danthu., 2018)

7. Culture et récolte

Le giroflier, comme beaucoup d'autres plantes de la famille des Myrtacées, est habitué aux climats tropicaux. Il a besoin d'humidité, de chaleur, et d'une altitude basse, ne dépassant pas 300 mètres. Les climats marins semblent favoriser son développement.

Le giroflier a besoin d'un sol volcanique (ou sédimentaire), au bord de mer, avec une forte pluviométrie bien répartie sur l'année, et un ensoleillement plus marqué à l'apparition des inflorescences. Le moment le plus favorable à la récolte est déterminé par la couleur rosé du



clou de girofle. Les clous de girofle sont en réalité les boutons de ses fleurs avant leur éclosion que l'on récolte et on fait sécher (Figure 11).

Figure 11. Les clous de girofle avant et après le séchage (Delavault, 2013)

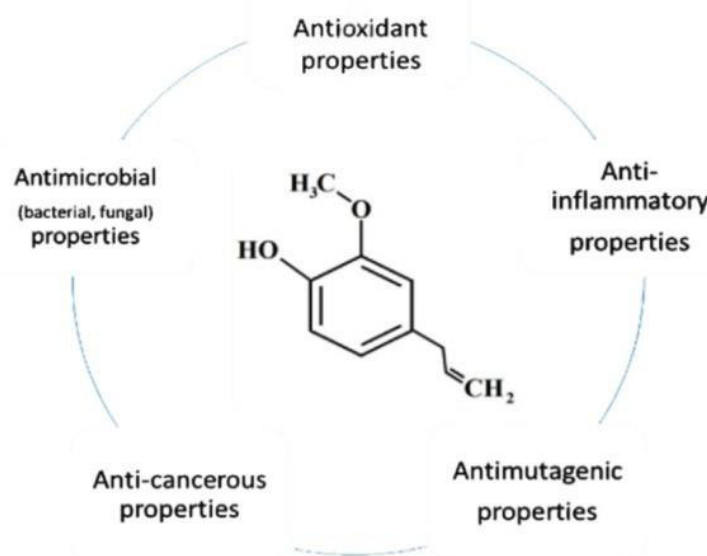


8. Usage du clou de girofle

L'essence de girofle, est connue en Europe depuis le 16^{ème} siècle. L'intérêt de cette essence réside essentiellement dans sa richesse en eugénol. Cette molécule est connue pour ses propriétés antibactériennes. L'essence de girofle est très utilisée en pharmacie, en médecine humaine et vétérinaire notamment par les dentistes pour ses propriétés antiseptiques, anesthésiantes et analgésiques (Parle, 2011). Elle a servi de base à l'hémi-synthèse de vanilline. C'est aussi une base largement utilisée en parfumerie : Opium d'Yves Saint-Laurent ou Air du Temps de Nina Ricci (entre autres) contiennent des essences de girofle, (Duchaufour et *al.*, 2016)

9. Valeur économique

Le girofle prend une part de plus en plus importante pour devenir la première source de matières premières (Danthu et *al.* 2014). En 2013, elle constitue aujourd'hui 10% des importations, elle importe presque la moitié des huiles essentielles (Adouk et *al.* 2014) 1000 kilogramme de clou de gi



ations jusqu'à 1000 kg des malgaches, l'exportation de mille tonnes de matières médicinales, médicinales et aromatisées et une valeur de 154000

Figure 12 . Propriétés de l'eugénol (Zari, 2021)

10. Constituants du clou de girofle

Les principaux constituants du clou de girofle sont (Gruffat, 2021) :

- Huiles essentielles (eugénol+++)
- Flavonoïdes
- Tanins

10.1. Le principe actif

L'eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol; $C_{10}H_{12}O_2$) en anglais : eugenol, est le principe actif du clou de girofle. En pratique, il s'agit d'une molécule organique, dont l'état physique est un liquide fluide de couleur jaune clair pouvant foncer avec le temps. C'est aussi un acide faible qui peut réagir avec un oxyde (Gladwin et Bagby, 2018).

Un nombre croissant de publications a montré que l'eugénol possède des caractéristiques anti-inflammatoires, anti-oxydantes, antiseptiques, anticancéreuses et antimutagènes (Figure 12) (Zari, 2021).

10.2. Intérêt thérapeutique de l'eugénol

-S'il y a bien une chose que l'odeur de clou de girofle évoque, c'est le cabinet dentaire. L'eugénol est utilisé de façon universelle pour ses propriétés anti-infectieuses et analgésiques dans pratiquement tous les domaines odontologiques: pansement, scellement de pièces prothétiques provisoires (Auvray, 2020).

-Propriétés analgésiques de l'eugénol proviennent de son groupe éther (Boukhobza *et al*, 2018).

- Propriétés anti-infectieuses, l'eugénol; à des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice, a inhibé efficacement les biofilms simples et mixtes formés par les souches résistantes aux médicaments de deux pathogènes *Streptococcus mutans* et *Candida albicans* (Huma, 2018).

- L'eugénol, comme de nombreux composés phénoliques, possède des propriétés anti-oxydantes et la capacité de neutraliser des radicaux libres (Nejad *et al*, 2017).

- Action antiproliférative et induction de l'apoptose des différentes cellules cancéreuses (Zari et Hakeem 2021).

-Il a été montré que des concentrations modérées d'eugénol (13 μ M) possèdent la propriété d'un agent anti-inflammatoire en raison de sa capacité à inhiber l'expression de gènes tels que ceux de NF- κ B et TNF α (Martínez-Herrera *et al*, 2016).

Les effets anti-inflammatoires de l'eugénol ont été aussi recherchés *in vitro* sur le remodelage de l'os alvéolaire chez des rongeurs ayant eu une ménopause provoquée. L'eugénol corrige l'augmentation de RANKL, d'ostéoprotégérine (membre de la famille des récepteurs au TNF et exprimée par les ostéoblastes) et de cytokines inflammatoires dans l'os. Les effets sur les trabécules osseuses sont positifs avec des altérations de morphologie significativement réduites (Buohashish *et al*, 2018) (Figure 13).

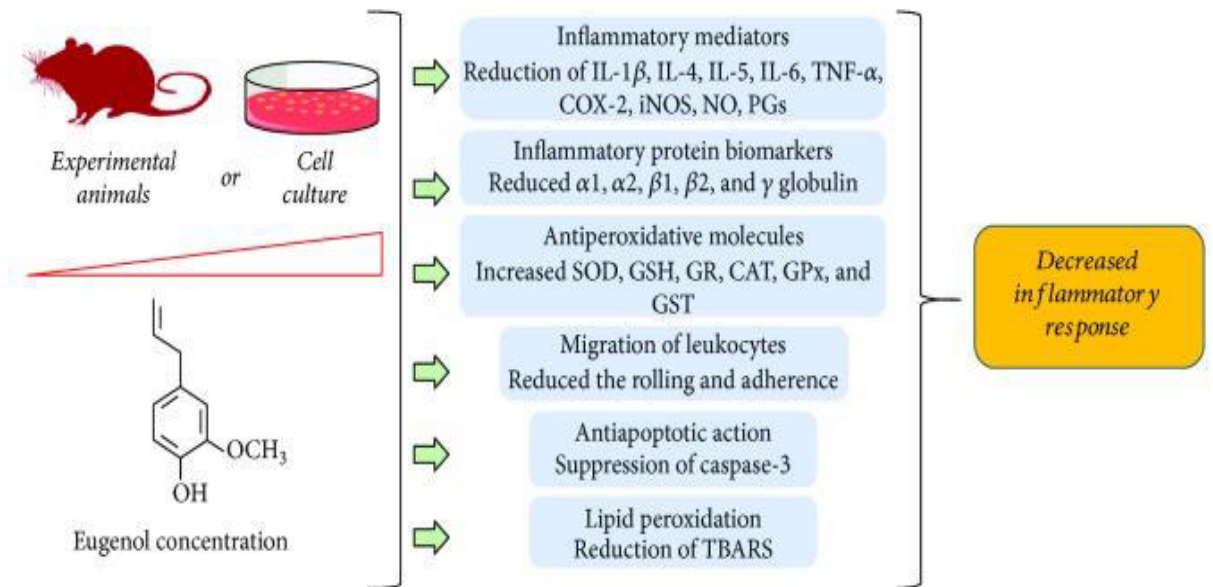


Figure 13. L'effet de l'eugénol dans le contrôle de l'inflammation (Barboza et al, 2018)

Chapitre IV.

***ACTIVITES BIOLOGIQUES
DU GIROFLIER***

CHAPITRE IV : Activités biologiques du giroflier

1. Généralités

Le girofle s'utilise le plus souvent sous forme d'huile essentielle et en contient 18 à 20 %. Le dosage de ses composés phénoliques diffère selon le problème à traiter (Hamadou & Touki, 2017). En plus de l'huile, le clou de girofle est composé de 16 % d'eau, de tanins, d'amidon et de matières fibreuses cellulosiques. Les clous de girofle sont utilisés pour le traitement des maux de dents (Karkosh, 2012). Très bon anesthésiant local dans les soins des plaies (Ghedira *et al.*, 2010), il est également un anti carcinogène, antidiabétique, antivirale, anti-inflammatoire. Il est aussi connu par son-activité anti-oxydante (Lim, 2014). Cette plante représente l'une des sources les plus riches en composés phénoliques tels que l'eugénol (Cortés-Rojas *et al.*, 2014). Tout comme elle a une activité analgésique, avec des propriétés antibactériennes (Cortés-Rojas *et al.*, 2014).

2. Composition chimique

L'*eugénol*, appelé aussi 4-allyl-2-méthoxyphénol est un composé aromatique de la famille des phénylpropènes, une sous-classe des phénylpropanoïdes. Il s'agit d'un liquide pratiquement incolore, brunissant à l'air. L'eugénol est donc un phénol qui donne la couleur jaune pâle à l'huile essentielle de clou de girofle. C'est aussi lui qui donne la forte odeur caractéristique de cette même épice. La molécule d'eugénol de formule brute $C_{10}H_{12}O_2$, constitue le principe actif du clou de girofle dans lequel elle est présente à une proportion de 75-90 % (Memmu, 2015). C'est une molécule très lipophile et sa formule développée est montrée dans la figure 14.

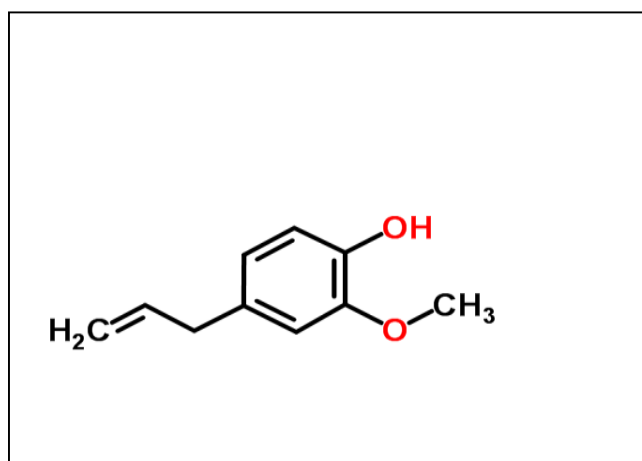


Figure 14. Structure chimique de l'eugénol (Paoli *et al.*, 2011)

3. Activité anti-oxydante

L'oxygène (O_2) est certes source de vie, mais-il est considéré parfois aussi comme une source d'agression pour les organismes aérobies. En effet, des radicaux hautement réactifs dérivent de l'oxygène ou encore des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) qui peuvent apparaître pendant des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux (Ekoumou, 2003). Lorsque la concentration de ces radicaux augmente, cela cause un effet néfaste sur le métabolisme de l'organisme, ça peut même endommager les structures cellulaires et conduire à l'apoptose (Lu, 2012).

3.1. Les oxydants

On appelle oxydant une espèce capable de capter un ou des électrons (accepteur d'électrons) L' O_2 est un élément utilisé par les cellules pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) et des radicaux libres en parallèle au sein des mitochondries, mais cette voie n'est pas unique. Ces sous produits résultent de processus redox cellulaire (Canciani, 2008).

3.2 Les anti-oxydants

Un anti-oxydant est défini comme "une substance qui retarde, empêche ou élimine les dommages oxydatifs à une molécule cible", (Krim, 2014). Les anti-oxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les anti-oxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes (Benaissa, 2012). Parmi les anti-oxydants, nous citons deux classes majeures, tableau 04.

Tableau 4 . Les classes des anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques et leurs propriétés (Bouhalouas, 2018)

Antioxydants enzymatiques		Antioxydants non enzymatiques	
Antioxydants	Propriétés	Antioxydants	Propriété
La catalase	Catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau	Vitamine C (acide ascorbique)	L'ascorbate est un capteur des ERO puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles (OH), mais aussi avec les radicaux superoxydes (O ₂). Il capte aussi les radicaux peroxydes (RO ₂)
La glutathion peroxydase (GPX)	Décompose aussi le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion comme donneur d'hydrogène	Vitamine E (α-tocophérol)	L'α-tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée HO ₂ ·), les radicaux hydroxyles (OH°), ainsi que l'oxygène singlets (1O ₂)
Les superoxydes dismutases (SOD)	Catalysent-la dismutation de l'anion superoxydes en peroxyde d'hydrogène	Caroténoïdes (β-carotène)	Réagissent avec les radicaux peroxyde (ROO°), les radicaux hydroxyles (OH-) et les radicaux superoxydes (O ₂ ⁻)

3.3 Techniques d'évaluation

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité anti-oxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (Prior et *al.*, 2005), ORAC (oxygen radical absorbance capacity) (Ou et *al.*, 2001), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azino bis 3-ethyl-benzothiazoline 6-sulphonate) (Jiri et *al.*, 2010), et DPPH+ (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Athamena et *al.*, 2010). Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (Benhammadi Zeyneb, 2016).

4. Composés phénoliques

Les composants phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Djemai, 2008).

Les principales classes des composants phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamiques, acide férulique, acide chlorogénique...), les flavonoïdes, les coumarines et les tanins (Figure 15).

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en thérapie comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, anti-oxydants et anti-radicalaires et antimicrobiens (Brahimi et Terrai, 2018).

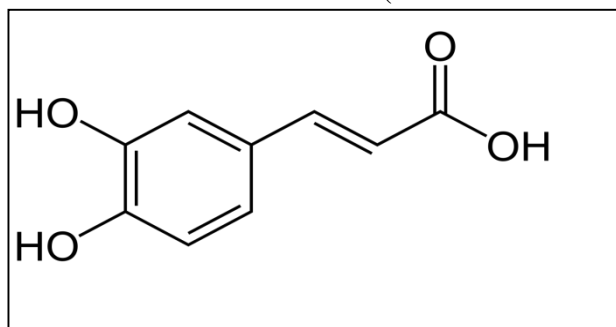


Figure 15. Structure chimique de l'acide caféique (Chung *et al.*, 2006)

4.1. Classification chimiques

Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques (présence d'une ou de plusieurs fonctions hydroxyles sur un cycle benzénique) dans leur structure. Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné .

4.1.2 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Ils sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. (Psotova *et al.*, 2003)

Nous distinguons :

- ✓ Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones)
- ✓ Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type (C6-C3).

4.1.3 Les Tanins

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse et concise car il n'y a pas de structure chimique de base. Leurs structures chimiques sont en effet variées et rassemblées en famille en fonction d'activités communes, figure 16.

De ce fait, toute classification chimique des tanins est forcément arbitraire. Cependant, on se réfère souvent à une distinction entre tanins hydrolysables et tanins condensés, (Il existe ainsi deux types :

- ✓ Tanins hydrolysables : ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique.
- ✓ Tanins condensés : ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leuco anthocyanidines). Ils sont aussi désignés sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides (Haioun et Hamoudi, 2015).

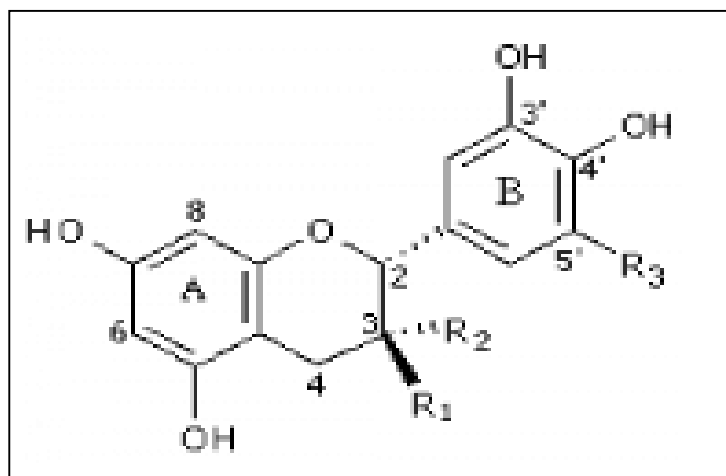


Figure 16. Structure chimique des tanins condensés (Guignard, 1996)

4.1.4 Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo-pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (Figure 17). Les flavonoïdes représentent la classe la plus largement répandue de polyphénols dans les aliments, figure 17. Les différents flavonoïdes sont retrouvés dans la nature soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides (Djenidi, 2019).

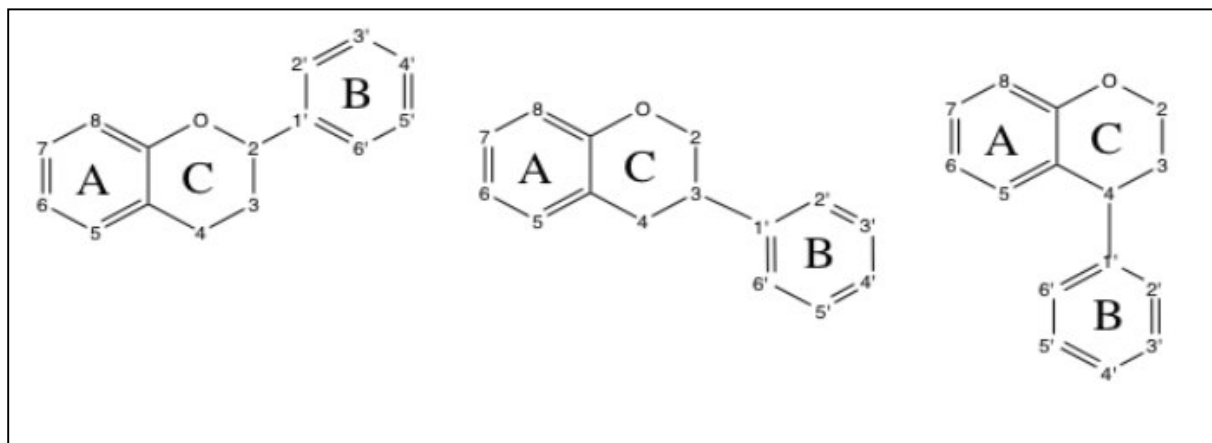


Figure 17. Squelette de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

4.1.5. Les flavonoïdes

Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, qui pourraient avoir des propriétés anti-oxydantes. En effet les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif et ils sont également capables de chélater les ions métalliques oxydants (Institut numérique, 2013).

4.2 Rôles et activités biologiques des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites). Les activités de certains composés phénoliques sont résumées dans le tableau 05.

Tableau 5 . Activités biologiques de certains composés phénoliques (Ourahmane, 2012)

Acides Phénols	Activités
Flavonoïdes	Anti tumorales; Anti carcinogènes; Anti-inflammatoires, Antioxydante
Tannis galliques et catéchines	Antioxydante

5. Activités biologique du girofle

La famille des Myrtacées possède plusieurs activités, comme activité cytotoxique, antiviral anti-inflammatoire et antibactérienne, (Medfouni et Hafsi , 2018).

Les activités biologiques de *S. aromaticum* et de ses composés ont illustrées dans la figure 18.

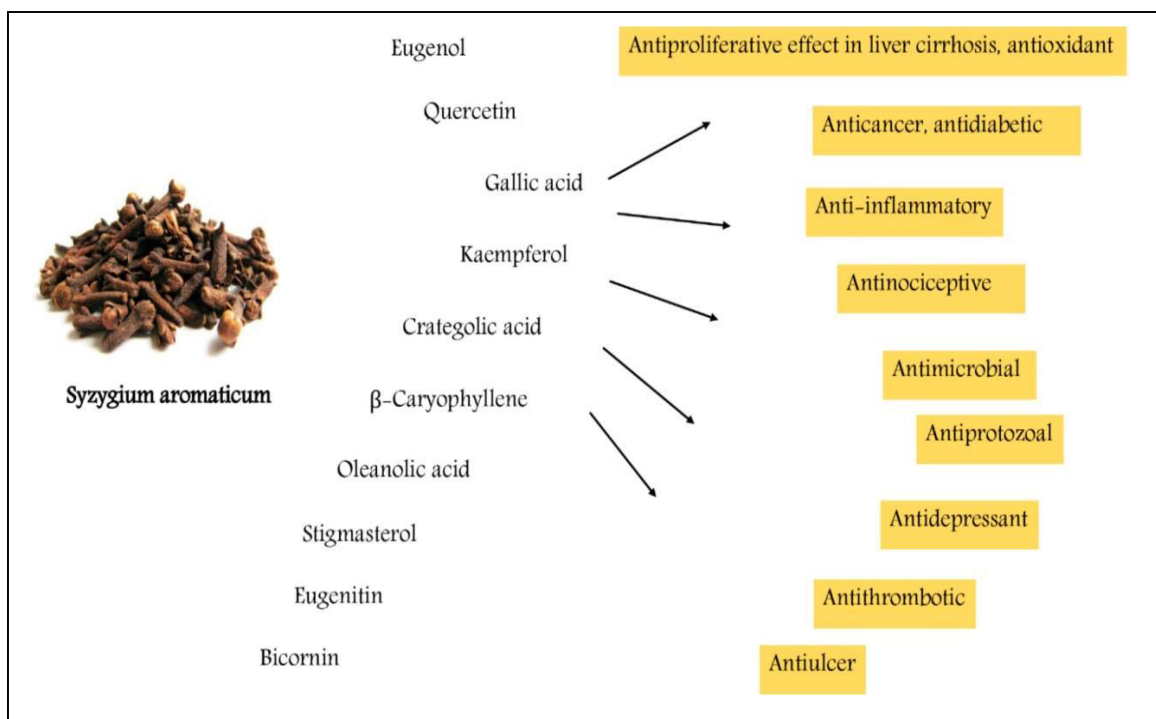


Figure 18. Les activités biologiques de *S. aromaticum* et ses composés apparentés (Gaber et al., 2020)

5.1 Activité antivirale

L'activité antivirale de l'eugénol, a été testée contre des souches du virus de l'herpès et a démontré son efficacité à 5 $\mu\text{g/mL}$ (Kurokawa, 1998) et il a été déduit que l'une des principales cibles de l'eugénol est la synthèse de l'ADN viral par l'inhibition de l'ADN polymérase virale.

Dans une autre étude, des extraits aqueux de *S. aromaticum(L)* et d'autres plantes comme *Geum japonicum Thunb.*, *Rhus javanica L.*, et *Terminalia chebula Retzus* ont montré une forte activité anti-virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) lorsqu'ils étaient combinés avec de l'acyclovir.

Cette activité synergique était plus forte dans le cerveau que dans la peau et il a également été prouvé que ces combinaisons n'étaient pas toxiques pour les souris (Cortés-Rojas et al, 2014).

5.2. Activité anti-nociceptives

L'emploi du clou de girofle comme analgésique a été signalé dès le 13^{ème} siècle, pour les maux de dents, les douleurs articulaires et comme antispasmodique, l'eugénol étant le principal

composé responsable de cette activité. Le mécanisme qui a évolué a été attribué à l'activation des canaux de calcium et de chlorure dans les cellules ganglionnaires (Thomson, 2004).

Les effets voltage-dépendants de l'eugénol dans les canaux sodiques et calciques et dans les récepteurs exprimés dans le ganglion trigéminal ont également contribué à l'effet analgésique du clou de girofle (Li et *al*, 2008).

D'autres résultats montrent que l'effet analgésique du clou de girofle est dû à l'action en tant qu'agoniste de la capsaïcine (Ohkubo et *al*, 1997).

L'activité anti-nociceptive périphérique de l'eugénol a été rapportée par Daniel et *al* (2009) montrant une activité significative à des doses de 50, 75 et 100 mg/Kg.

5.3 Pharmacocinétique du girofle

Le métabolisme de l'eugénol a été examiné sur des rats de sexe masculin et féminin il a été facilement absorbé après administration orale et atteint rapidement le plasma et le sang avec une demi-vie de 14 et 18 h, respectivement. Son impact cumulatif a été observé après son administration quotidienne pour le traitement de la douleur neuropathique. Ensuite, l'eugénol est métabolisé en acide glucuronique ou en sulfate conjugué dans le foie. Le méthyleugénol a été partiellement métabolisé dans le foie par l'action de différentes enzymes du CYP 450 en dérivés réactifs 2', 3'-(allylique) époxyde (Guénette et *al*, 2007), (Garber et *al*, 2020).

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre V.
MATERIEL ET METHODES

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE V : Matériel et méthodes

5.1. Objectifs de l'étude

Dans un premier temps, un des objectifs de cette étude a été d'identifier les principaux composés phytochimiques de l'extrait aqueux du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), tout en mettant en exergue *in vitro* le pouvoir anti-oxydant (Voir figure 19) par :

- Dosages colorimétriques des polyphénols,
- Quantification des composés phénoliques par chromatographie liquide haute performance (HPLC),
- Etude du pouvoir anti-oxydant par la méthode du DPPH, ABTS et bêta carotène,

Ensuite, un second objectif été de confirmer l'effet de l'extrait aqueux de la plante chez le rat wistar sensibilisé à l'ovalbumine dans un protocole d'asthme expérimental en mesurant essentiellement :

- L'IL-4 par le dosage ELISA , les protéines totales dans le sang, le tissu pulmonaire et dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA), la détermination de la formule de numération sanguine (FNS).
- Les paramètres du stress oxydatif au niveau du compartiment hépatique, bronchique et érythrocytaire, en mesurant : l'indice de la peroxydation lipidique par le dosage du malondialdéhyde (MDA) ; les enzymes anti-oxydantes (CAT, GPx) ; la teneur en glutathion réduit (GSH).
- Les marqueurs biochimiques hépatiques : Les enzymes hépatiques (ASAT, ALAT et PAL) et l'albumine.
- les modifications de l'architecture tissulaire pulmonaire et hépatique.

Le protocole général utilisé est illustré dans la figure 20.

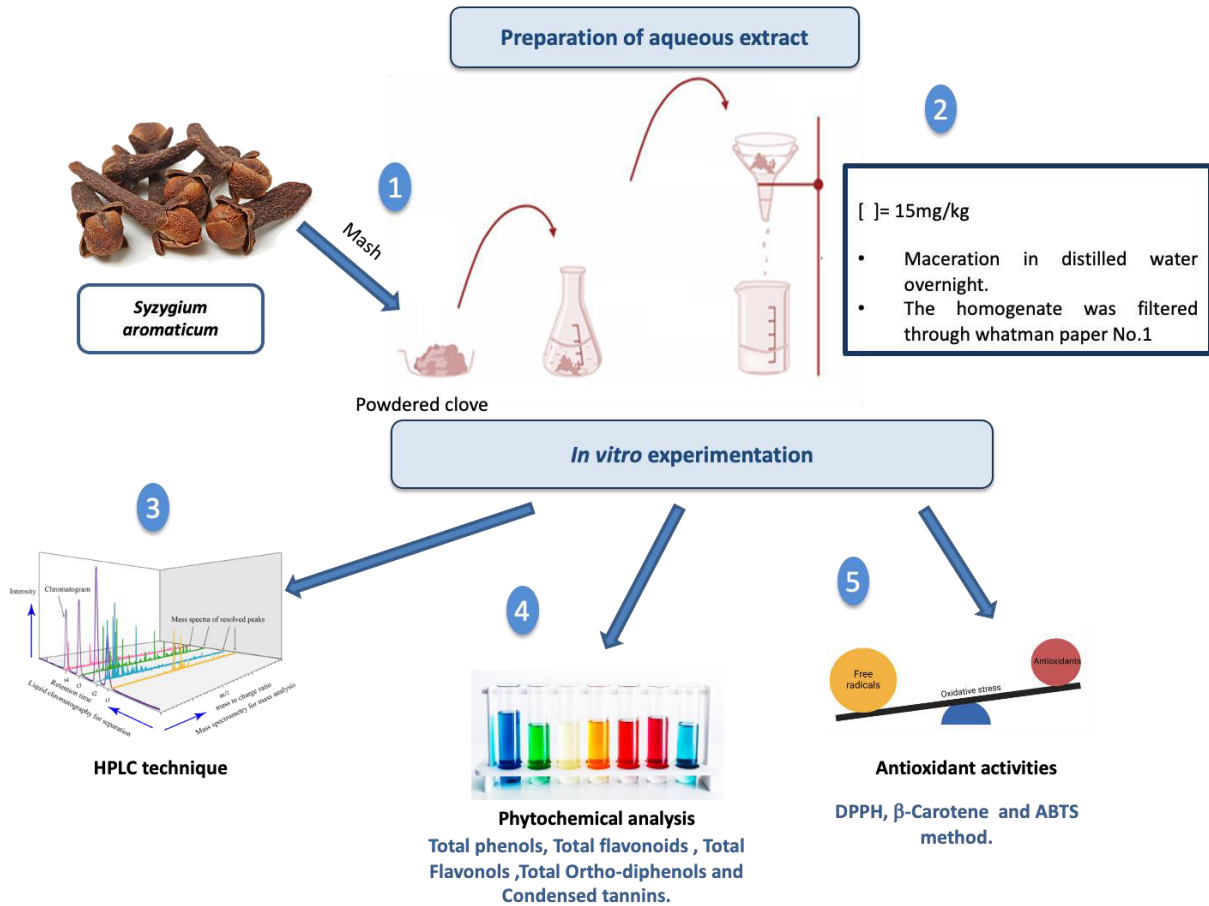


Figure 19. Résumé graphique correspondant à la première partie de la présente étude sur l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum*

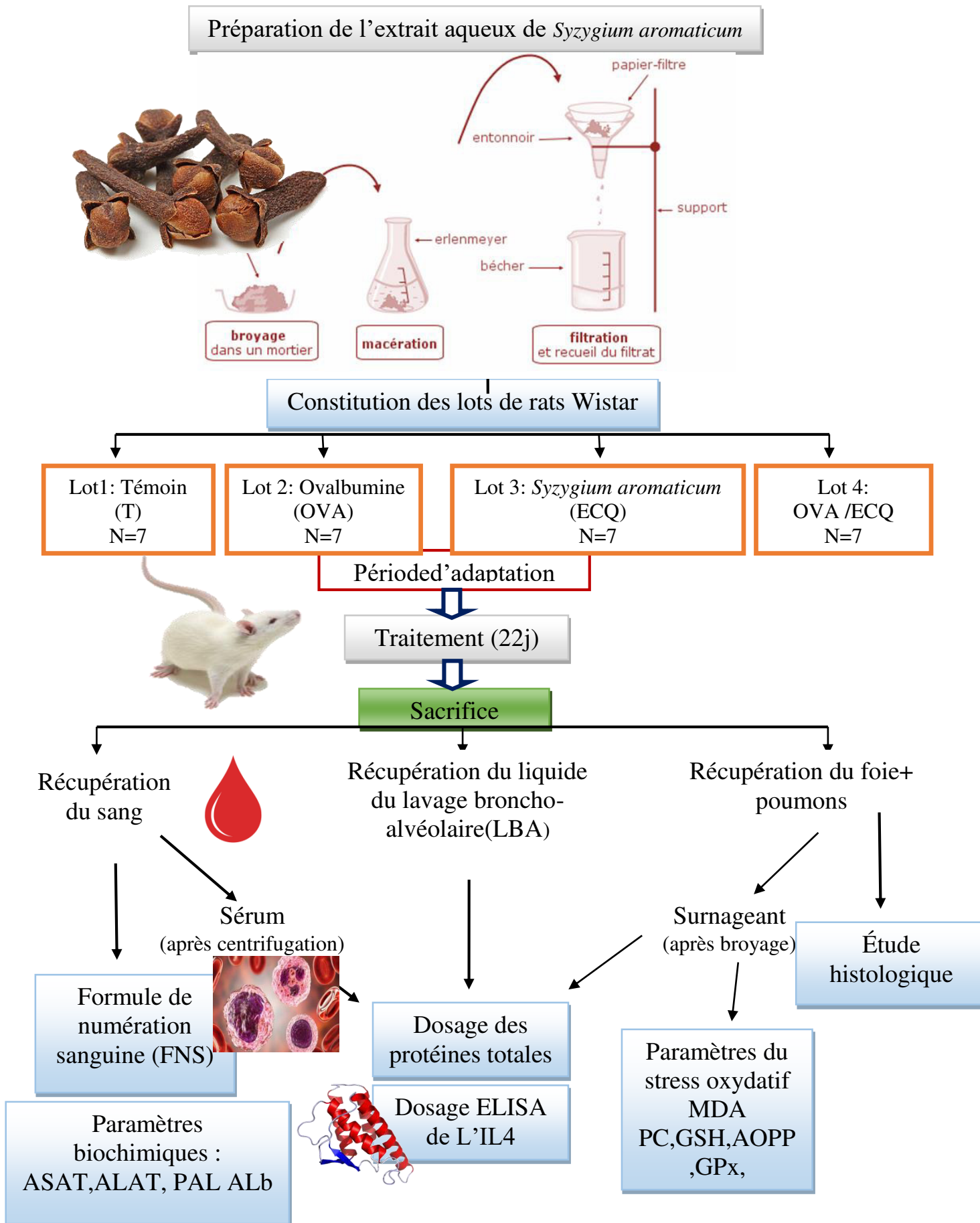


Figure 20. Schéma récapitulatif du protocole expérimental

5.2 Matériels biologiques

5.2.1 Choix du matériel végétal

La récupération des clous de girofle de *Syzygium aromaticum* a été effectuée le 7 juillet 2019 chez un herboriste situé dans la ville d'El-kala. Après avoir acheté une quantité de 100 g, ils ont été moulus manuellement par un pilon afin d'obtenir une poudre fine.

5.2.2 Préparation de l'extrait aqueux et dosage phytochimique

A partir de 20g de la poudre du clou de girofle, on a pu préparer un extrait aqueux à raison de (20g de poudre dans 40 mL d'eau distillée) (Tabheriti, 2017). Le mélange est agité magnétiquement sachant que la macération a duré 24h à l'abri de la lumière. Le lendemain, le mélange a été homogénéisé puis l'homogénat a été filtré une première fois à l'aide d'un papier filtre. Puis un volume final de 15 mL a été conservé au réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.

Calcul du rendement :

Le rendement de l'extrait a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{m}{M} \times 100$$

m : poids du filtrat résiduel

M : Poids de la matière végétale de départ.

Le poids du filtrat résiduel est évalué après détermination de la différence entre le poids du papier filtre plein (après filtration) et le poids du papier filtre vide (avant filtration).

5.3. Dosages colorimétriques des composés phénoliques

5.3.1 Dosage des phénols totaux

La concentration en phénols totaux de l'extrait aqueux, a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu (Bouaziz et al., 2005). L'équation $Y=0,005x+0,2203$ a été utilisée pour calculer le contenu (Annexe 01).

5.3.2 Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes a été mesuré par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et la soude (NaOH) (Zhishen et al., 1999). La concentration a été calculée en utilisant l'équation suivante : $Y= 0,0002+0,0073$ (Annexe 02).

5.3.3 Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (Julkunen-Tiitto, 1985). Le contenu en tannins a été calculé en utilisant l'équation : $Y=0,3125x+0,006$ (Annexe 03).

5.3.4 Dosage des flavonols

La quantification des flavanols a été effectuée par la méthode de Yermakov et al. (1987). Le contenu des flavonols a été calculé selon l'équation : $Y=3,8365x +0,122$ (Annexe 04).

5.3.5 Dosage des ortho-diphénols

Le contenu en ortho-diphénols a été déterminée selon la méthode décrite par Mateos et al. (2001). Le taux en ortho-diphénols a été déterminé à partir de l'équation : $Y= 0,0035x - 0,0225$ (Annexe 05).

5.4 chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La séparation de l'extrait aqueux du clou de girofle a été réalisée à l'aide d'une colonne AGILENT (longueur 150 mm, diamètre 4,6 mm, granulométrie 5 μ m, Agilent, CA, USA) maintenue à une température de 35°C. La phase mobile était constituée d'eau à 1 %, d'acide acétique (A) et de méthanol (B). L'élution progressive de la phase mobile a été appliquée dans cet ordre : 95%, 5% et 95% pour la phase A et 5%, 95% et 5% pour la phase B. Cette élution a été réalisée de 0 à 60 minutes. Le débit était de 1 mL/min et le volume d'injection était fixé à 20 μ L. Les longueurs d'onde ont été utilisées sont 254 nm et 280 nm. Les données obtenues ont été traitées à l'aide du logiciel YL-CLARITY (YL-clarity 4.0 software). Cette partie a été réalisée au sein du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC).

5.5 Évaluation de l'activité anti-oxydante

5.5.1 étude de l'activité anti-oxydante (Méthode DPPH)

Cette activité du pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon a été mesurée selon la méthode décrite par Bouaziz et al. (2010). Le pourcentage d'absorption est calculé :

$$PI(\%) = \frac{DO_{100\%} - DO_{Essai}}{DO_{100\%}} \times 100$$

Avec :

DO_{100%} : absorbance du "total".

DO_{Essai} : absorbance de la solution en présence d'extraits.

5.5.2. Méthode de blanchissement du β -carotène

L'activité anti-oxydante a été réalisée par la méthode de décoloration du β -carotène décrite par Pratt (1980) et modifiée par Kulisic et al. (2004).

5.5.3. Méthode d'ABTS

Cette activité anti-oxydante a été réalisé selon la méthode de Re et al. (1999). L'estimation du pouvoir antioxydant par la méthode ABTS a été exprimée en pourcentage d'inhibition (%), et la valeur IC50 a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{ABTS pourcentage d'inhibition (\%)} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{Témoins}} - \text{Abs}_{\text{Échantillon}}}{\text{Abs}_{\text{Témoins}}} \right] \times 100$$

Avec:

AbsTémoins: Absorbance du radical ABTS+ dans le méthanol.

AbsÉchantillon: Absorbance du radical ABTS avec ajout de l'échantillon (extrait).

6. Expérimentation animale

6.1. Animaux et conditions d'élevage

Au cours du protocole, 28 rats blancs mâles de la souche Wistar (*Rattus rattus*), provenant de l'Institut Pasteur d'Algérie, ont été utilisés. Ces rongeurs, âgés de 6 à 8 semaines et d'un poids vif compris entre 150 et 180g, ont été élevés dans une animalerie, et ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, sous une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ et une photopériode naturelle. Ces rats ont été placés dans des cages en polyéthylène tapissées de copeaux de bois. Le nettoyage des cages et le changement de la litière ont été opérés un jour sur deux jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris à volonté avec un concentré énergiquement équilibré provenant de l'ONAB de Bejaïa dont la composition est détaillée dans l'Annexe (Annexe 7).

6.2. Composition des lots et traitements des rats

Les rats ont été divisés équitablement en 4 lots de 7 rats chacun (Figure 20). Ils ont été sensibilisés à l'ovalbumine (OVA) et/ou traités avec l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum*. Les quatre lots sont constitués de :

Le lot 1 : rats témoins (T), qui sont soumis aux mêmes conditions que les autres lots mais recevant uniquement de l'eau physiologique.

Le lot 2 : rats sensibilisés à l'ovalbumine (OVA), et qui ont donc développés un asthme expérimental car traités à raison de $400\mu\text{g/mL}$ OVA avec $20\mu\text{g/mL}$ $\text{Al}(\text{OH})_3$ (ratio 1:1) (Ezz-Eldin et al, 2020).

Le lot 3 : rats traités par voie orale (gavage) avec l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* (ECQ) à raison de 15mg/Kg (Mishra et Singh, 2016).

Le lot 4 : rats sensibilisés à l'OVA et traités avec l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* (ECQ).

6.3. Sensibilisation des rats et provocation des animaux par l'aérosol

Les lots OVA, OVA/ECQ ont été sensibilisés à l'ovalbumine (grade II, Réf. A5253-250G, Sigma Aldrich), selon une méthode provoquant une inflammation aigüe, validée dans la littérature (Moura *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2011).

Dans ce modèle, la sensibilisation est effectuée à l'aide de petites quantités d'ovalbumine (400 µg/mL) combinées à un adjuvant d'hydroxyde d'aluminium (Al(OH₃)) (Alun, Sigma Aldrich) dissout à raison de 20µg/mL dans une solution saline à 0,9%. La sensibilisation a lieu par voie intra-péritonéale, aux trois premiers jours (J₁, J₂ et J₃) et répétée au onzième jour (J₁₁) selon le protocole schématisé dans la figure 21. Les deux autres lots ont juste reçu une injection en IP d'eau physiologique.

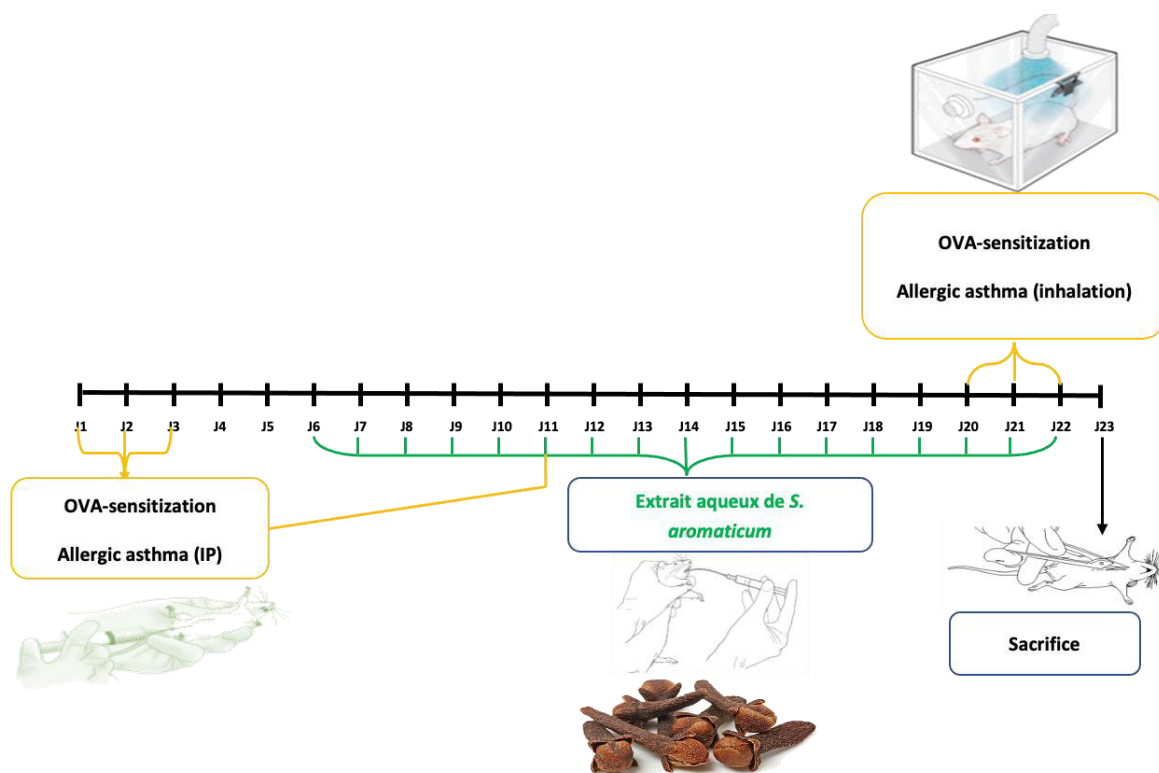


Figure 21. Le protocole expérimental global : Jours de sensibilisation en IP et par inhalation (en orange), jours du gavage par l'extrait de plante durant 17 jours (en vert).

La réaction anaphylactique a été induite par une réexposition au même allergène (injecté) et ce par inhalation intra-nasale d'ovalbumine à raison de 10 mg/mL diluée dans une solution saline à 0,9% (Moerloose *et al*, 2005) (figure 21). Ainsi, aux jours 20, 21, et 22, les animaux ont été placés dans une chambre en plexiglas qui dispose d'une ouverture permettant le libre passage du nébulisât via un nébuliseur à compression (OMRON, NE-C29-E) fonctionnant à un débit de 0,4 mL/min pendant une durée de 30 minutes. Quant aux autres, ils ont été exposés à un aérosol d'eau salinée à 0,9% pendant 30 minutes et ce aux mêmes moments que les lots précédents.

6.4 Sacrifice et prélèvements des organes

Le sacrifice, par décapitation a eu lieu au 23^{ème} jour, soit 24 heures après la dernière inhalation d'ovalbumine.

6.4.1. Prélèvement sanguin

Le sang est immédiatement recueilli dans les tubes d'EDTA et tube sec. Le tube sans anticoagulant est alors centrifugé à 3000 tours/min pendant 30 minutes. Les échantillons de sérum obtenus ont été stockés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse. Alors que les tubes à EDTA sont utilisés pour déterminer la formule de numération sanguine (FNS).

6.4.2. Prélèvement du liquide broncho-alvéolaire

La technique utilisée consiste à ouvrir la cage thoracique des animaux et y insérer un cathéter dans la trachée. Ce dernier est relié à des seringues remplies de solution saline à 0,9%. Cette solution est ensuite injectée dans le poumon, puis ré-aspirée dans la seringue (Dorion, 2005). Après 3 lavages de 2 mL chacun, le liquide du LBA recueilli est centrifugé à 1500 tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant a servi pour le dosage de l'interleukine-4 et les protéines totales.

6.4.3- Prélèvement des organes

Les animaux sacrifiés ont été éventrés pour le prélèvement des organes du foie et des poumons. Suite à cela, ces organes ont été rincés au début dans une solution de NaCl à 0,9%, puis un fragment de chaque organe sont séparément fixés dans le formol à 10% afin de réaliser les coupes histologiques. Le reste des organes sont conservés au congélateur à -20°C pour le dosage des paramètres du stress oxydatif.

6.4.3.1-Préparation de l'homogénat des tissus

Une quantité de 1g de chaque organe récupéré ont été broyés. Après homogénéisation des tissus dans 2 mL de solution du tampon phosphate (TBS), ces derniers ont été centrifugés afin de récupérer les surnageants dans des tubes eppendorf, puis congelés à -20°C jusqu'à l'analyse.

6.4.3.2- Préparation du lysat érythrocytaire

Suite au sacrifice, le sang a été immédiatement recueilli, puis centrifugés à 3000 tours/minute pendant 5 minutes. Le culot érythrocytaire a par la suite subi deux lavages :

* Le premier lavage : il a été réalisé avec 2 mL de la solution de lyse [KH_2PO_4 (10mM), NaCl (150mM), pH = 7.4]. La suspension obtenue est agitée puis centrifugée à 3000 tours/minute pendant 15 minutes à 4°C.

* Le deuxième lavage : il a été réalisé à partir du culot obtenu dans le premier lavage. Ce culot a été lavé avec 2 mL de la même solution de lyse, agité puis centrifugé à 4000 tours/minute pendant 30 minutes. Le surnageant obtenu, après centrifugation, correspond au lysat érythrocytaire.

6.5. Formule de numération sanguine (FNS)

Le nombre des cellules leucocytaires totales (WBC), celui des lymphocytes, des monocytes, des granulocytes et des globules rouges, sont mesurés par un analyseur automatique d'hématologie (Erma Coulter, Inc., model : PCE – 210N).

6.6 Dosage des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques transaminases (ASAT), lactate déshydrogénase (ALAT), phosphatase alcaline (PAL), albumine, protéines totales été effectué à l'aide d'un automate de type «*COBAS INTEGRA 400* ». L'hémogramme ou bien NFS (numération de formule sanguine) a été effectuer à l'aide de l'analyseur d'hématologie automatique le «*SMT-50 de Seamaty*»

6.7 Dosages des paramètres de stress oxydatif

Tous les dosages ont été effectués au niveau des poumons, du foie et érythrocytes grâce à des réactifs chemical co. (USA).

6.7.1 Dosage des protéines totales

Les protéines ont été déterminées selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976). La concentration des protéines a été quantifiée selon la courbe d'étalonnage établi grâce

à la BSA (Annexe 06). La concentration des protéines totales est calculée par la formule suivante :

$$\text{Protéines totales (g/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (g/dL)}$$

6.7.2 Détermination du taux de la peroxydation lipidique

Le taux de peroxydation lipidique a été évalué en mesurant le malondialdéhyde (MDA) avec le test TBARS (Thiobarbituric reactive species) selon la méthode de Buege et Aust (1978).

6.7.3 Détermination du taux des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP)

Le contenu tissulaire en AOPP a été déterminé selon la méthode de Kayali et al. (2006).

6.7.4 Détermination du taux de glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion réduit est réalisé selon la méthode d'Ellman (1959), avec quelques modifications apportées par Jollow et al. (1974) .

6.7.5 Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (E.C. 1.11.1.9)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohé et Günzler (1984).

6.7.6 Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (EC 2.5.1.18)

L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) est mesurée par la méthode de Habig et al., (1974).

6.7.7 Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6)

L'activité enzymatique de la catalase (CAT) est mesurée selon la méthode d' Aebi (1984).

6.7.8 Détermination du taux des protéines carbonylées (PCO)

Les groupes protéiques carbonyle ont été estimés par le protocole décrit par Levine et al. (1990). Cette méthode est basée sur la dérivation du groupe carbonyle avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), ce qui conduit à la formation d'un produit 2,4-dinitrophényl (DNP) hydrazone stable. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 370 nm.

6.8 Dosage ELISA de l'Interleukine-4

Le dosage de l'interleukine-4 (IL-4), effectué au niveau du sérum, du liquide du LBA et des poumons, est réalisé par la méthode ELISA sandwich, grâce au kit Invitrogen Rat Interleukin-4 (invitrogenRET: BMS 628 ; lot: 176569000). L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration d'IL-4 à doser (Figure 22).

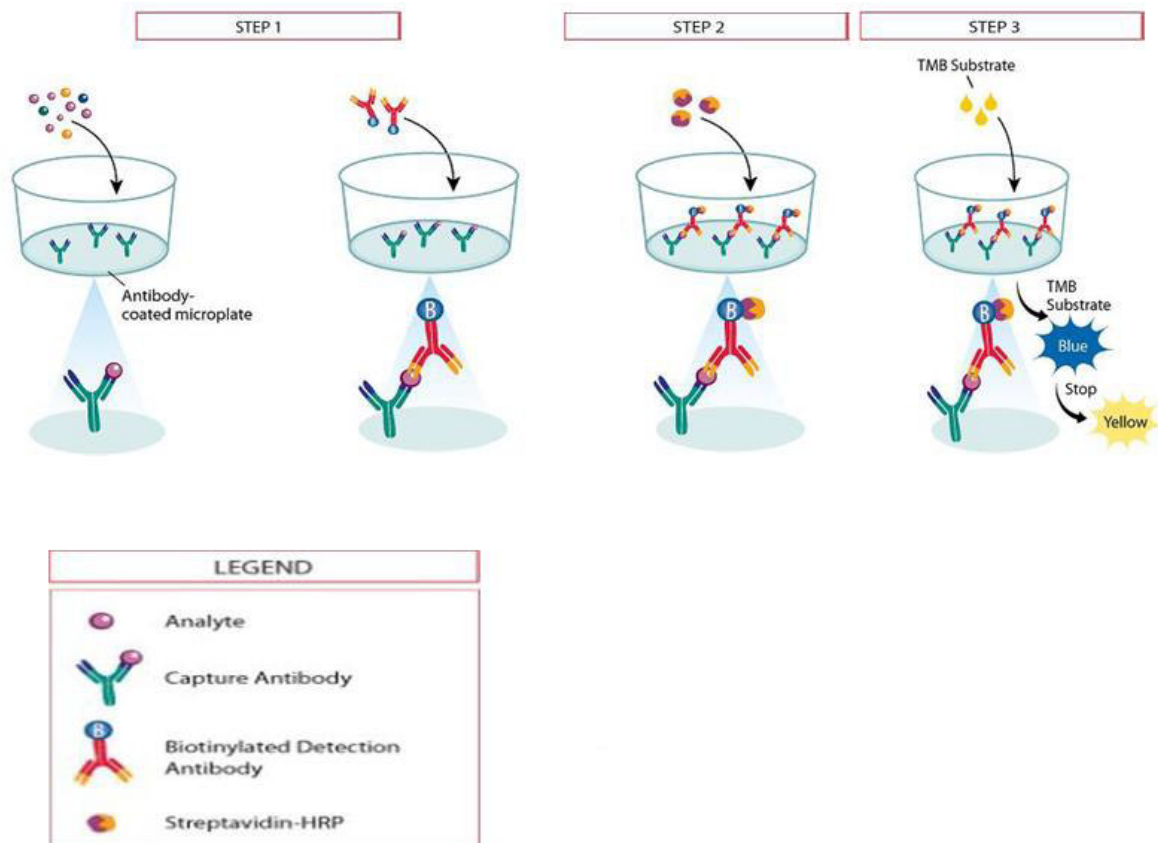


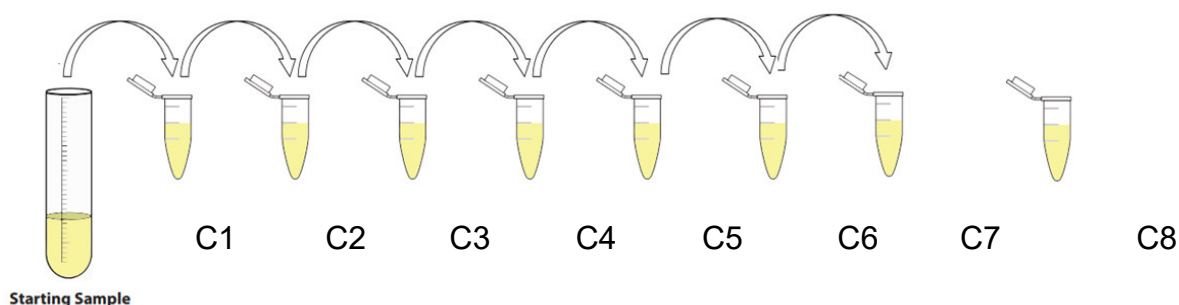
Figure 22 : Schéma du principe de la technique ELISA sandwich utilisée (Khaldi 2018, modifié).

La reconstitution des différentes solutions utilisées dans ce protocole est détaillée dans l'annexe (Annexe03).

Préparation de la gamme

Huit puits de la plaque serviront pour la réalisation de la courbe du standard à différentes concentrations.

L'étalon d'IL-4 a été reconstitué en ajoutant de l'eau distillée. Le volume de reconstitution est indiqué sur l'étiquette du flacon standard. L'étalon reconstitué a été laissé pendant 10 à 30 minutes. Suite à ça, ce dernier a été mélangé doucement pour assurer une solubilisation complète et homogène. À partir de la solution standard d'IL-4 à la concentration (200 pg/ml), une série de sept dilutions a été préparée (C1: 100 pg/mL ; C2: 50 pg/mL ; C3: 25 pg/mL ; C4: 12.5 pg/mL ; C5: 6.25 pg/mL ; C6: 3.12 pg/mL ; C7: 1.56 pg/mL). Ces dilutions sont préparées selon le schéma suivant :



1. Un volume de 110 μL de tampon de dilution du standard ont été ajouter à chacun des 8 tubes destinés pour les concentrations. Suite à ça, 110 μL de la solution standard mère ont été prélever puis déposer dans le tube C1. Ce mélange a été agiter avec le vortex pour obtenir à la fin un volume de 220 μL de la solution C1.
2. Afin d'obtenir une série de dilutions, des prélèvements ont été effectuer de façon successives afin d'obtenir une série de dilutions :

Dans un premier temps, un volume de 110 μL de C1 a été prelever et déposer dans C2, pour ensuite etre agiter avec le vortex et obtenir une solution C2 de 220 μL .

Dans un second temps, un volume de 110 μL de C2 a été prelever et déposer dans C3, afin d'etre agiter avec le vortex et d'obtenir 220 μL de solution C3. Prélever un volume de 110 μL de C3 et disposer le dans C4, bien agiter avec le vortex , afin d'obtenir 220 μL de solution C4.

Suite à ça , un volume de 110 μL de C4 a été prélever et déposer dans C5, pour etre bien agiter avec le vortex. Ici, il y a eu obtention de la solution de C5 avec un volume de 220 μL .

Dans un troisième temps, un volume de 110 μL de C5 a été prélevé et déposé dans C6. Ce puits a été agité avec le vortex, pour obtenir à la fin la solution C6 à 220 μL .

Pour finir, un volume de 110 μL de C6 a été prélevé et déposé dans C7, pour être bien agité avec le vortex. Une solution C7 a été obtenue avec un volume de 220 μL . En ce qui concerne le puits suivant C8, dans ce dernier il y a eu aucun ajout.

Les étapes du dosage ELISA

La réaction ELISA sandwich se réalise en trois temps résumé dans le tableau 6:

- Dans un 1er temps, 50 μL du Tampon diluant standard ainsi que 50 μL de chaque échantillon (sérum/LBA/poumon) sont ajoutés dans tous les puits de la plaque. Par la suite, 50 μL de la solution de l'anticorps anti IL-4 conjugué à la biotine ont été déposés dans l'ensemble des puits. Après homogénéisation, la plaque est incubée pendant 2h à température ambiante ; puis lavée trois fois par la solution de lavage.
- Dans le 2ème temps, on ajoute 100 μL de solution de Streptavidin-HRP dans chaque puits. Après homogénéisation, la plaque est incubée pendant une heure à température ambiante ; puis, lavée trois fois par la solution de lavage.
- Enfin, dans le 3ème temps, on ajoute 100 μL du chromogène stabilisé (TMB) dans tous les puits. Le mélange commencera à virer au bleu, et la plaque est alors incubée pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité. Pour finir, 100 μL de la solution d'arrêt ont été ajoutés dans tous les puits. L'ajout de cette solution dans les puits va faire changer la coloration du bleu en jaune, et la lecture de l'absorbance est alors réalisée à 450 nm (Lecteur Mindray MR-96A). L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration de l'IL-4 qui est déterminée par comparaison à la gamme étalon du standard et exprimée en pg/mL.

Les échantillons ont été dilués au 1:2 (50 μl d'échantillon + 50 μl de diluant d'échantillon), la concentration lue sur la courbe standard doit être multipliée par le facteur de dilution ($\times 2$).

Tableau 6. Étapes de dépôt et plan de distribution sur la plaque ELISA

Barrette 1 (gamme d'étalonnage)	Les autres Barrettes (échantillons)
Étape 1 : 100 µl des différentes dilutions du standard (de la concentration C1 à C8) dans les puits A1-H1	Étape 1 : 50 µl de diluant échantillons dans tous les puits correspondants aux échantillons. Ajouter 50µl d'échantillons sériques, LBA et surnageant de poumons (de 1 à 8) dans les puits A2-H2, puis A3-H3, ... etc.
-	----
Préparer la solution d'anticorps biotinylé anti-IL4 (utilisée dans les 30 minutes qui suivent sa préparation)	Préparer la solution d'anticorps biotinylé anti-IL4 (utilisée dans les 30 minutes qui suivent sa préparation)
-	----
Étape 2 : 50 µl de solution biotinylée anti-IL-4	Étape 2 : 50 µl de solution biotinylée anti-IL-4
-	----
Étape 3 : Couvrir, ensuite Incubation 2h à TA	Étape 3 : Couvrir, ensuite Incubation 2h à TA
-	----
Préparer la solution de streptavidine-HRP (utilisé dans les 30 minutes suivant la dilution)	Préparer la solution de streptavidine-HRP (utilisé dans les 30 minutes suivant la dilution)
-	----
Étape 4 : Vider et Laver 3 fois les puits, puis ajouter 100 µl de la solution de travail Streptavidin-HRP (tous les puits)	Étape 4 : Vider et Laver 3 fois les puits, puis ajouter 100 µl de la solution de travail Streptavidin-HRP (tous les puits)
-	----
Étape 5 : Recouvrir puis Incubation 1 heure à TA. Vider et Laver (3 fois)	Étape 5 : Recouvrir puis Incubation 1 heure à TA Vider et Laver (3 fois)
-	----
Étape 6 : 100 µl du chromogène (TMB) dans tous les puits	Étape 6 : 100 µl du chromogène (TMB) dans tous les puits
-	----
Étape 7 : Incubation 10' à TA et à l'obscurité	Étape 7 : Incubation 10' à TA et à l'obscurité
-	----
Étape 8 : 100 µl de la solution d'arrêt	Étape 8 : 100 µl de la solution d'arrêt

6.9. Étude histologique

Les coupes histologiques du foie et des poumons ont été réalisées à la clinique Belle vue (Annaba) -service d'anatomie pathologie- à l'aide d'un appareil automatique (**LEICA**). La technique utilisée est celle décrite par Hould (1984).

7. Analyses statistiques des résultats

Les résultats des expérimentations effectuées sont exprimés sous forme de moyennes plus ou moins l'écart-type (Moy \pm SEM). L'évaluation statistique a été effectuée en utilisant le test "t" de Student (Excel 2010). Nous avons effectué deux comparaisons :

Les groupes traités (ECQ, OVA+ECQ) par rapport au groupe témoin :

- * : Différence significative ($p \leq 0.05$) ;
- * * : Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;
- * * * : Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).

Les groupes traités (ECQ, OVA+ECQ) par rapport au groupe OVA :

- # : Différence significative ($p \leq 0.05$) ;
- # # : Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;
- # # # : Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).

Chapitre VI.
RESULTATS ET
DISCUSSION

CHAPITRE VI : Résultats et discussion

1. Composition chimique et activités anti-oxydantes de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum*

1.1 Rendement d'extraction

Les données du procédé d'extraction ainsi que le rendement d'extraction sont résumées dans le tableau 07.

Tableau 7. Données du procédé d'extraction à partir de la plante étudiée *Syzygium aromaticum*

État de l'extrait	Solvant d'extraction (eau) (mL)	Masse initiale (g)	Concentration de l'extrait (g/mL)	Rendement (%)
Pâte marron foncé	40	20	0.5	65

1.2 Dosages des composés phénoliques

D'après le tableau 8, la concentration en composés phénoliques la plus élevée est celle des Ortho-diphénols totaux déterminée en moyenne à 740,14 mg AC/g d'extrait. La quantité de flavonols et les tanins condensés étaient les moins élevés, respectivement de $2,09 \times 10^{-3}$ mg Rutine/g et 1.04×10^{-3} mg CA/g d'extrait).

Tableau 8. Concentration en composés phénoliques de l'extrait aqueux de *S. aromaticum*

Paramètres	Valeurs
polyphénols totaux (mg AG/g d'extrait)	176,02 ± 0,040
flavonoïdes totaux ((mg EQ/g d'extrait)	23,50 ± 0,002
flavonols (mg x 10 ⁻³ RU/g d'extrait)	2,09 ± 0,010
Ortho-diphénols (mg AC/g d'extrait)	740,14 ± 0,310
tanins condensés (mg CA/g d'extrait)	1.04 x10 ⁻³ ± 0,002

AG: Acide Gallique, **QE:** Quercétine, **RU:** Rutine, **AC:** Acide caféique
Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± SE

1.3 Activité anti-oxydante du clou de girofle

D'après les résultats illustrés dans le tableau 9, il semblerait que la méthode ABTS de la plante de *Syzygium aromaticum* est un pourcentage d'activité anti-radicalaire plutôt élevé d'une valeur de (38,69 %). En ce qui concerne les résultats obtenus par la méthode de DPPH (IC₅₀) et celle de blanchiment de β-carotène (tableau 9), l'extrait aqueux de la plante possède une quantité de IC₅₀ et de pourcentage d'activité anti-oxydante du β-carotène plus au moins importante (145,46

µg/mL) ; 77%). Ces résultats ont été comparé à ceux des deux standards (BHT, vit C) utilisés qui possèdent un pouvoir antioxydants puissants.

Tableau 9. Pourcentage d'activité anti-radicalaire (ABTS) et d'activité anti-oxydante de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* par les méthodes DPPH et β-carotène.

	Pourcentage d'activité anti-radicalaire (ABTS) (%)	DPPH IC ₅₀ de l'extrait (µg/mL)	Pourcentage d'activité anti-oxydante du β-carotène (%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	38,69 ± 0,031	145,46	77,00
BHT	-	62,92	29,33
Vit C	-	26,20	62,50

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± SE

1.4 Identification des composés phénoliques par HPLC

Selon les résultats présentés dans la figure 23 et le tableau 10, l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* contenait quatre principaux composés phénoliques identifiés à différents temps de rétention. Il s'agit de l'acide gallique (8,627 min), l'acide ellagique (15,627 min), l'eugénol (26,810 min), ainsi que la Quercétine (59,203 min).

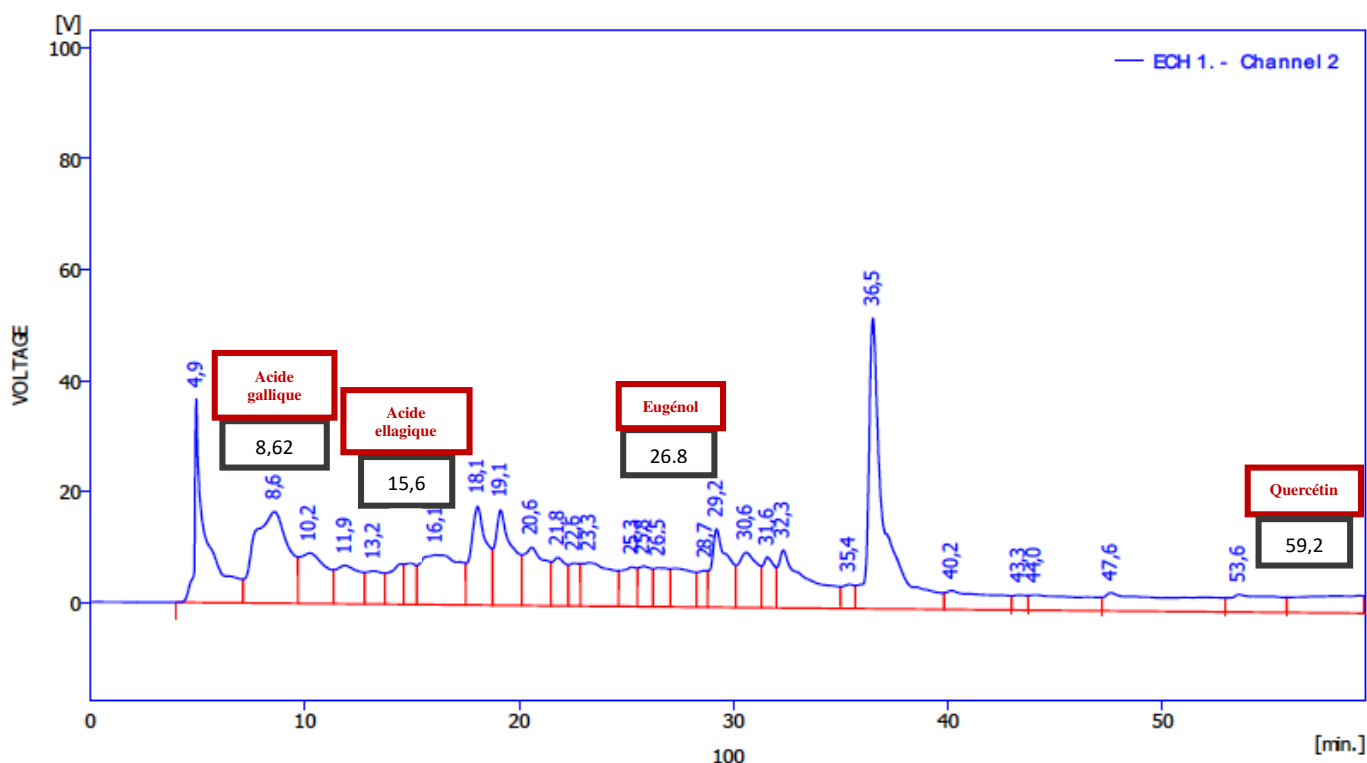


Figure 23. Chromatogramme HPLC de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum*

Tableau 10. Identification des principaux composés phénoliques de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* par HPLC.

Numéros de Pic	Temps de rétention (min)	Nom du composé
#1	08,627	Acide gallique
#2	15,627	Acide Ellagique
#3	26,810	Eugenol
#4	59,203	Quercétine

1.8. Discussion de l'expérimentation *in vitro*

Concernant les résultats du rendement de l'extrait aqueux de clou de girofle, la valeur était de 65%. Cette quantité est plus élevée que celle obtenue dans l'étude d'Abo-El Maati *et al.* (2016) qui était de 11,25 %. Dans cette étude, ils ont utilisé d'autres types de solvants : l'éthanol et l'acétate d'éthyle. Cette différence dans les rendements d'extraction de différents solvants est causée par les différences de polarité des constituants trouvés dans les matières végétales (Jayaprakasha GK *et al.* 2001). Dans une étude réalisée par El-saber Batiha *et al.*, (2020), les résultats obtenus (750,48 mg/g d'extrait (8g)) concernant les niveaux des principaux composants du clou de girofle semblent être plus au moins proches des nôtres. En effet, les résultats obtenus à partir des dosages des différents composés phénoliques de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* (Tableau 8), il apparaît que le clou de girofle contient une quantité élevée de polyphénols totaux (176,02 mg FA/g d'extrait (8g)). En effet, les clous de girofle représentent l'une des principales sources de composés phénoliques (Cortés-Rojas *et al.*, 2014). En ce qui concerne les concentrations obtenues des flavonoïdes totaux et ceux des ortho-diphénols leurs valeurs étaient respectivement de : 23,5 mg QE/g d'extrait et de 740,14 mg AC/g d'extrait. En effet, selon les études de Cortés-Rojas *et al* (2014) et Shan B *et al.*, (2005), le taux des ortho-diphénols s'est avéré faisant partie des acides phénoliques présents en forte concentration dans le clou de girofle. La valeur retrouvée chez Cortés-Rojas *et al* (2014) (783,50 mg AC/g d'extrait) se rapproche fortement de celle obtenue dans notre étude (740, 14 mg AC/g d'extrait). Pour le taux des flavonoïdes totaux (comme la quercétine), ces derniers sont présents dans les clous de girofle à une concentration plus faible (17,5 mg QE/g d'extrait) par rapport aux acides phénoliques (Abo-El Maati *et al* ;2016) comme l'acide gallique (mentionné précédemment). Cette déduction concorde avec nos résultats (23,5 mg QE/g

d'extrait). Quant aux résultats obtenus concernant les dosages des tanins condensés, l'extrait aqueux de la plante *Syzygium aromaticum* en contient une très faible concentration. En effet, cette valeur estimée à $1,04 \times 10^{-3}$ mg CA/g d'extrait (8g) est faible par rapport à celle retrouvée dans les travaux de Shan B *et al.* (2005) (14,38g/100g de DW) ainsi que Ghedira *et al.* (2010) (12 %). Comme pour les tanins condensés, selon les résultats obtenus, l'extrait aqueux de plante contient une concentration de flavonols très faible ($2,09 \times 10^{-3}$ mg de Rutine/g d'extrait) (8g). Cependant, il semble que ce faible taux est en accord avec la quantité observée dans les travaux de Shan B *et al.* (2005) dans lesquels les auteurs montrent que le clou de girofle contient une très faible quantité de flavonols, à savoir 28,4 mg/100 g.

L'ensemble de ces résultats obtenus suite aux dosages colorimétriques des composés phénoliques de *Syzygium aromaticum*, ont été validés par la technique HPLC, puisque cette technique d'identification a confirmé la présence des mêmes composés phénoliques dosés ainsi que d'autres, comme l'acide gallique, l'acide ellagique et l'eugénol. Ces résultats sont similaires à ceux de Jung-Hoon Kim *et al.* (2013). Une autre étude a également confirmé ces résultats suite à l'analyse d'un extrait de clou de girofle par la technique HPLC. Il s'agit de celle d'Anita *et al.* (2015) qui ont révélé la présence d'acide gallique, d'eugénol et de quercétine (dosage des flavonoïdes).

Concernant l'étude *in vitro*, il apparaît que cette plante possède un pouvoir anti-oxydant important. En effet, parmi les tests utilisés, l'activité anti-oxydante DPPH qui indique sa capacité à donner des atomes d'hydrogène a permis de calculer puis de comparer la valeur de la CI50 avec les deux contrôles positifs (BHT, Vit C) démontrant ainsi que l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* présente une activité anti-oxydante de 145,46g/mL, ce qui est relativement faible, toujours par rapport aux témoins. Cette valeur obtenue est également faible par rapport à celle retrouvée dans l'étude d'Abo-El Maati *et al.* (2016), où l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux de clou de girofle était entre 25,3 - 91,4%. Cependant, dans l'étude rapportée par Haro-Gonzalez *et al.* (2021), la quantité d'inhibition du DPPH de l'extrait aqueux de clou de girofle se rapprochait des valeurs obtenues à partir de notre extrait (150 g/mL). Ces valeurs augmentaient proportionnellement à la concentration de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* (Nikousaleh et Prakash, 2008). Un autre test de l'activité anti-oxydante de la plante a été réalisé à l'aide de la méthode ABTS, au cours de laquelle l'activité d'élimination du radical protoné ABTS⁺ a été mesurée. On rappelle que ce dernier a une absorbance maximale à 734 nm qui diminue avec l'extinction des radicaux protoniques (Abo-El Maati et al., 2016). D'après les résultats présentés dans le tableau 3 de l'activité d'élimination radicalaire, l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* présente une assez importante activité

anti-oxydante en référence aux valeurs du pourcentage d'activité anti-radicalaire (ABTS) (38,69%). Cette valeur est plus ou moins similaire à celle retrouvée dans l'étude d'Abo-El Maati et al. (2016), qui se situait entre 49,45 % et 99,49 %. Nous avons également recherché la capacité de blanchiment du β -carotène dans l'extrait aqueux. Nos résultats ont montré qu'il possède une grande capacité d'inhibition du blanchiment du β -carotène. Ceci démontre sa capacité à neutraliser les radicaux libres formés (hydroperoxydes conjugués) à la suite de l'oxydation de l'acide linoléique présent lors de la réaction. Cette neutralisation se traduira par l'absence d'attaque du chromophore β -carotène et donc par l'inhibition de son blanchiment comme rapporté par Ghedadba *et al.* (2015). Selon le tableau 3, cette capacité s'illustre par une valeur de 77% par rapport à celles des composés antioxydants standards de référence, BHT et vitamine C, qui étaient respectivement de 29,33 et 62,5%. Ces données sont similaires à celles obtenues (80%) dans l'étude d'Abo El-Maa *et al.*, (2016).

D'après les valeurs obtenues suite à l'étude de l'activité anti-oxydante (test DPPH, ABTS et β -carotène), ainsi que le dosage des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et ortho-diphénols) et leur identification par la technique de l'HPLC (révélant la présence de l'acide gallique, l'acide ellagique, l'eugénol et la quercétine), il semblerait que l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* possède un potentiel antioxydant important justement dû à la présence de concentrations plus ou moins importantes de composés phénoliques. Cette observation a été retrouvée dans la littérature (Shan B *et al.*, 2005 ; Cortes *et al.*, 2014 ; Jameel Kiki, 2023) où plusieurs auteurs ont mis en évidence l'énorme potentiel des clous de girofle comme piègeurs de radicaux et comme source importante de composés phénoliques. Une autre étude, de Gülçin *et al.* (2012), est également parvenue à la même conclusion, mentionnant que les polyphénols végétaux sont multifonctionnels, pouvant agir comme agents réducteurs, donneurs d'atomes d'hydrogène et même comme piègeurs d'oxygène singulet.

Variation des paramètres physiologiques, inflammatoires, hématologiques et biochimiques dans un modèle murin d'asthme expérimental

2. Variation du poids corporel

Tous les rats ont atteint un gain de poids important (Tableau 11). Le lot sensibilisé et traité à l'extrait aqueux du clou de girofle (OVA/ECQ) a marqué un gain de poids de 37,09g inférieur à celui du lot témoin (38,22g) et a atteint une valeur supérieure à celle du lot sensibilisé à l'ovalbumine (OVA) (35,68g). Le lot traité uniquement avec l'extrait de plante (ECQ) est celui qui présente le plus bas gain de poids (34,21g) comparativement avec le reste des lots. Par contre, l'analyse statistique ne montre aucune variation statistiquement significative (voir tableau 11).

Tableau 11. Variation du poids corporel chez les 4 lots.

Paramètres	Groupes expérimentaux			
	Témoins	Ecq	Ova	Ova + Ecq
Poids initial (g)	158,57±20,41	158,57±16,48	158,71±11,79	158,29±15,32
Poids finale (g)	219,17±11,87	215,14±8,88	213±2,35	217±13,27
Gains de poids(g)	38,22	34,21	35,68	37,09
PC par rapport au lot T %	-	-2,82	-1,84	-0,99
PC par rapport au lot ova %	-	-	1,00	1,88

*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 comparativement aux rats témoins;

#p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,01; ### p ≤ 0,001 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.1. Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson

Le suivi quotidien de la consommation d'aliment et de l'eau chez les rats témoins et les rats traités après 22 jours d'expérimentation ont été représentés dans le tableau 12.

Chez les rats OVA, il n'y a eu aucune différence significative enregistrée comparativement aux autres lots. Par contre dans les lots traités ECQ et OVA+ECQ, il y a eu une diminution très significative de la consommation d'aliment et de l'eau chez le groupe comparativement au groupe témoins.

Tableau 12 Variation de la consommation quotidienne chez les 4 lots.

Paramètres	Groupes expérimentaux			
	Témoins	Ecq	Ova	Ova + Ecq
Consommation d'aliment (g)	16,75±2,46	15,86±1,03 (##)	16,6 ±1,04	15,26±1,58 (**)(###)
Consommation d'Eau de boisson (ml)	34,56±3,85	34,31±4,27	35,65±0,30	35,64±0,36

*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 comparativement aux rats témoins;

#p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,01; ### p ≤ 0,001 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.2. Variation du poids absolu et relatif sur les organes prélevés

Poumons

Les variations du poids absolu (PA) et du poids relatif (PR) des poumons chez les rats témoins et les rats recevant l'ovalbumine (OVA), ou l'extrait aqueux (ECQ) ou les deux à la fois (OVA/ECQ) sont montrées dans le tableau 13. La variation du PA du poumon a montré une augmentation significative ($p \leq 0.05$) chez le lot OVA par rapport au lot témoin. On note une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du PA du poumon chez les rats du lot ECQ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine. On observe également une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du PA du poumon chez le lot OVA/ECQ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

De plus, les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) du PR du poumon chez les rats sensibilisés à l'ovalbumine (OVA) comparativement aux rats témoins, et une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du PR du poumon chez les rats du lot ECQ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine. On constate aussi une diminution du PR chez les rats sensibilisés et traités par la plante (OVA/ECQ) sans aucune variation statistiquement significative.

Foie

La variation du poids absolu (PA) et relatif (PR) du foie chez les rats témoins et les rats recevant l'ovalbumine (OVA), extrait aqueux (ECQ) et OVA/ECQ sont montrées dans le tableau 13. La variation du poids absolu du foie montre une diminution significative ($p \leq 0,05$) chez le lot ECQ et ECQ+OVA, par rapport au lot témoin. On note également une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) du PA du foie par rapport au lot sensibilisé à l'ovalbumine.

Quant à la variation du poids relatif du foie, les résultats obtenus montrent qu'il y a une diminution significative ($p \leq 0,05$) du PR du foie chez le lot traité par l'extrait aqueux (ECQ) comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine, et du PR du foie chez le lot ECQ comparativement aux rats témoins. On enregistre une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du PR du foie chez les rats traités par la combinaison OVA/ECQ comparativement aux rats témoins et aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

Tableau 13. Variation du poids absolu (PA) (g) et relatif (PR) (g/100g du PC) des poumons et du foie chez les rats témoins et traités.

Paramètres	Groupes expérimentaux			
	Témoins	Ecq	Ova	Ova + Ecq
PA des poumons (g)	1,59±0,24	1,6±0,28 (##)	1,82±0,24 (*)	1,24±0,43 (##)
PA des poumons par rapport au lot T (%)	-	2,39	26,54	1,42
PA des poumons par rapport au lot OVA (%)	-	-19,08	-	-19,85
PR des poumons (g)	0,84±0,15	0,83±0,13 (##)	0,94±0,14 (**)	0,64±0,22
PR des poumons par rapport au lot T (%)	-	0,67	25,24	-1,00
PR des poumons par rapport au lot OVA (%)	-	-19,62	-	-20,95
PA du foie (g)	7,17±0,40	6,79±0,73	7,17±0,48 (*)	5,54±1,10 (*) (##)
PA du foie par rapport au lot T (%)	-	1,00	6,68	-9,22
PA du foie par rapport au lot OVA (%)	-	-5,33	-	-14,91
PR du foie (g)	3,80±0,15	3,49±0,28 (#)	3,69±0,23 (*)	2,84±0,53 (***) (###)
PR du foie par rapport au lot T (%)	-	-0,03	6,52	-10,67
PR du foie par rapport au lot OVA (%)	-	-6,15	-	-16,14

*p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 comparativement aux rats témoins;

#p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,01; ### p ≤ 0,001 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.3 Effet sur certains paramètres biochimiques

Transaminases (ASAT), Lactate déshydrogénase (ALAT), phosphatase alcaline (PAL), et Albumine (illustrées dans le tableau 14).

2.3.1 Dosage des biomarqueurs hépatiques

***Transaminases (ASAT), Lactate déshydrogénase (ALAT) :** D'après les résultats obtenus, il y a une diminution très hautement significative des taux de l'ASAT et ALAT chez les rats sensibilisés et traités par la plante par rapport aux rats asthmatiques. Par contre, chez les rats asthmatique(OVA), il y a eu une augmentation hautement significative des taux d ASAT et ALAT comparé au lot témoins. Aussi chez les rats du lot ECQ, il y a une augmentation significatif comparé au lots témoins.

***Phosphatase alcaline (PAL) :** aucune différence significative n'est enregistrée dans nos résultats.

***Albumine :** Chez les rats asthmatiques, il y a eu une diminution de la concentration plasmatique en albumine comparativement au lot témoins. Cependant, ce taux a augmenté très significativement chez les rats asthmatique traite à l'extrait de la plante et ceux qui ont reçu uniquement l'extrait aqueux de la plante.

Tableau 14. Variations de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités.

Paramètres	Groupes expérimentaux			
	Témoins	Ecq	Ova	Ova + Ecq
ASAT (U/L)	150,17±11,50	205,60±22,30 (*) (#)	256,60±13,94 (***)	249,33±23,46 (***)
ALAT (U/L)	78,00±10,99	76,60±11,95	84,80±13,94	78,67±13,05
PAL (U/L)	317,25±35,36	386,00±41,00 (***)	337,20±32,75	326,60±9,50
Alb (g/l)	38,86±1,10	39,70±0,97 (**) (##)	37,76±0,70	39,45±0,61 (**) (##)

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparativement aux rats témoins;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.4 Effet bénéfiques et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* sur des paramètres hématologiques

Ce travail a pour objectif d'étudier *in vivo* l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* au niveau des poumons dans un modèle murin d'asthme expérimental.

2.4.1 Variation des paramètres hématologiques

Les résultats obtenus révèlent une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de la concentration en globules blancs chez les rats sensibilisés (OVA) et une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez le lot traité par la plante (ECQ) comparativement aux rats témoins (tableau 19). Cette augmentation a atteint respectivement les taux suivants 20,7% et 13,24%. On note aussi une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux des lymphocytes dans le sang chez les rats sensibilisés à l'ovalbumine comparativement aux rats témoins (19,21%). Les résultats montrent une diminution du taux des globules blancs et des lymphocytes chez le lot sensibilisé et traité par l'extrait aqueux du clou de girofle par rapport au lot seulement sensibilisé (OVA).

On note aussi une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux des monocytes dans les lots traités par la plante (ECQ) et sensibilisés (OVA) et une augmentation significative ($p \leq 0,05$) dans le lot sensibilisé à l'ovalbumine et traité par la plante (OVA/ECQ) par rapport au lot témoin et une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) dans le lot sensibilisé à l'ovalbumine et traité par l'extrait aqueux comparativement au lot seulement sensibilisé. On remarque une diminution significative ($p \leq 0,05$) du taux des globules rouges dans le lot sensibilisé à l'ovalbumine par rapport au lot témoin et aucune variation statistiquement significative du taux des granulocytes.

Tableau 15. Variation des paramètres hématologiques

Paramètres	Lots			
	Témoin	ECQ	OVA	OVA/ECQ
GB (x10 ⁹)/L	7,44 ± 0,80	8,43 ± 0,34 ^(***)	8,98 ± 1,47 ^(**)	8,20 ± 0,79
Lymphocytes (x10 ⁹)/L	3,78 ± 0,57	3,97 ± 0,49	4,50 ± 0,36 ^(**)	4,03 ± 1,58
Monocytes (x10 ⁹)/L	0,48 ± 0,13	1,10 ± 0,08 ^(***)	1,04 ± 0,11 ^(***)	0,73 ± 0,12 ^{(*)(##)}
Granulocytes (x10 ⁹)/L	2,66 ± 0,53	3,37 ± 0,39	3,78 ± 1,53	2,70 ± 0,56
GR(x10 ¹²)/L	7,24 ± 0,31	7,39 ± 0,60	7,07 ± 0,30 ^(*)	6,95 ± 0,19

*p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 comparativement aux rats témoins;

#p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,01; ### p ≤ 0,001 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.4.2 Variation des protéines totales dans le sérum et dans le liquide du LBA

Le dosage des protéines totales a été effectué aussi bien dans le sérum que dans le liquide du LBA chez les rats des différents lots expérimentaux. La figure 24 illustre les résultats obtenus.

On peut constater une augmentation des niveaux des protéines totales sériques chez les rats sensibilisés à l'ovalbumine et chez les rats sains et traités par l'extrait aqueux du clou de girofle par rapport au lot témoin et une diminution chez les rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par l'extrait aqueux du clou de girofle. L'analyse statistique ne montre aucune variation significative.

On note une augmentation significative ($p \leq 0.05$) des protéines totales dans le liquide du LBA chez les rats du lot OVA comparativement aux rats témoins.

On observe aussi une augmentation des protéines totales dans le liquide du LBA chez les rats du lot sain et traité par le clou de girofle (ECQ) par rapport au lot témoin et une diminution chez les rats du lot sain et traité par le clou de girofle (ECQ) par rapport aux rats sensibilisés à l'ovalbumine. L'analyse statistique ne montre aucune variation statistiquement significative.

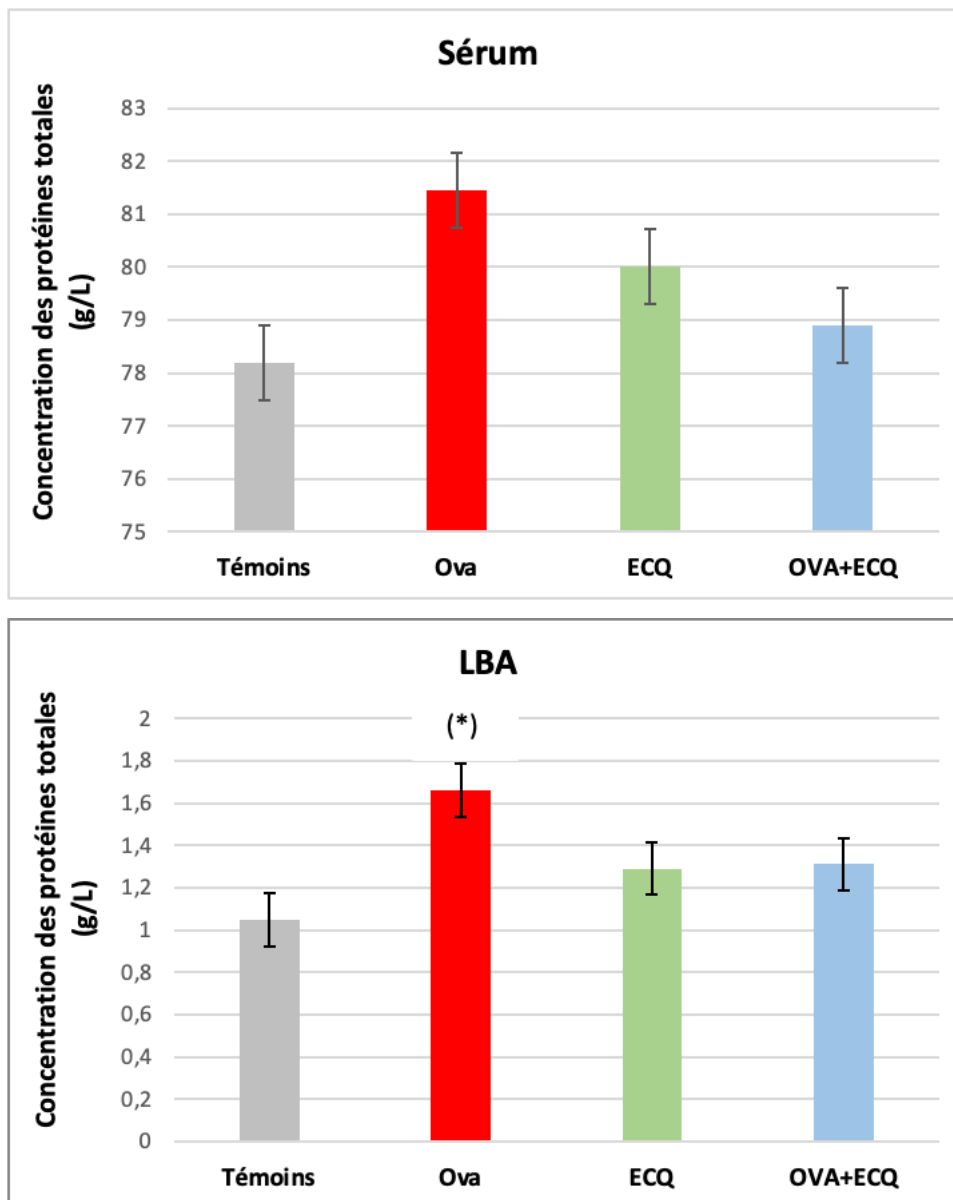


Figure 24. Variation de taux des protéines totales dans le sérum et le liquide du LBA chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparativement aux rats témoins;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.4.3 Variations des taux d'interleukine-4 (IL-4)

Les taux sériques d'IL-4 indiquent une augmentation chez les groupes sensibilisés (OVA) et traités par la plante (ECQ) par rapport au groupe témoin (figure 25). Cependant l'administration de l'extrait aqueux du clou de girofle a entraîné une amélioration dans le groupe sensibilisé à l'ovalbumine. L'analyse statistique ne montre aucune variation statistiquement significative.

Les taux d'IL-4 dans le poumon ont montré une augmentation significative ($p \leq 0.05$) dans les lots de rats traités par la plante (ECQ) et ceux sensibilisés par l'ovalbumine comparativement au lot témoin et une diminution significative ($p \leq 0.05$) chez les rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par l'extrait aqueux du clou de girofle comparativement aux rats seulement sensibilisés.

Les taux d'IL-4 dans le liquide du LBA indiquent une augmentation chez les groupes OVA et Ecq par rapport au groupe témoin et une augmentation du groupe OVA/ECQ par rapport au groupe OVA. L'analyse statistique ne montre aucune variation statistiquement significative.

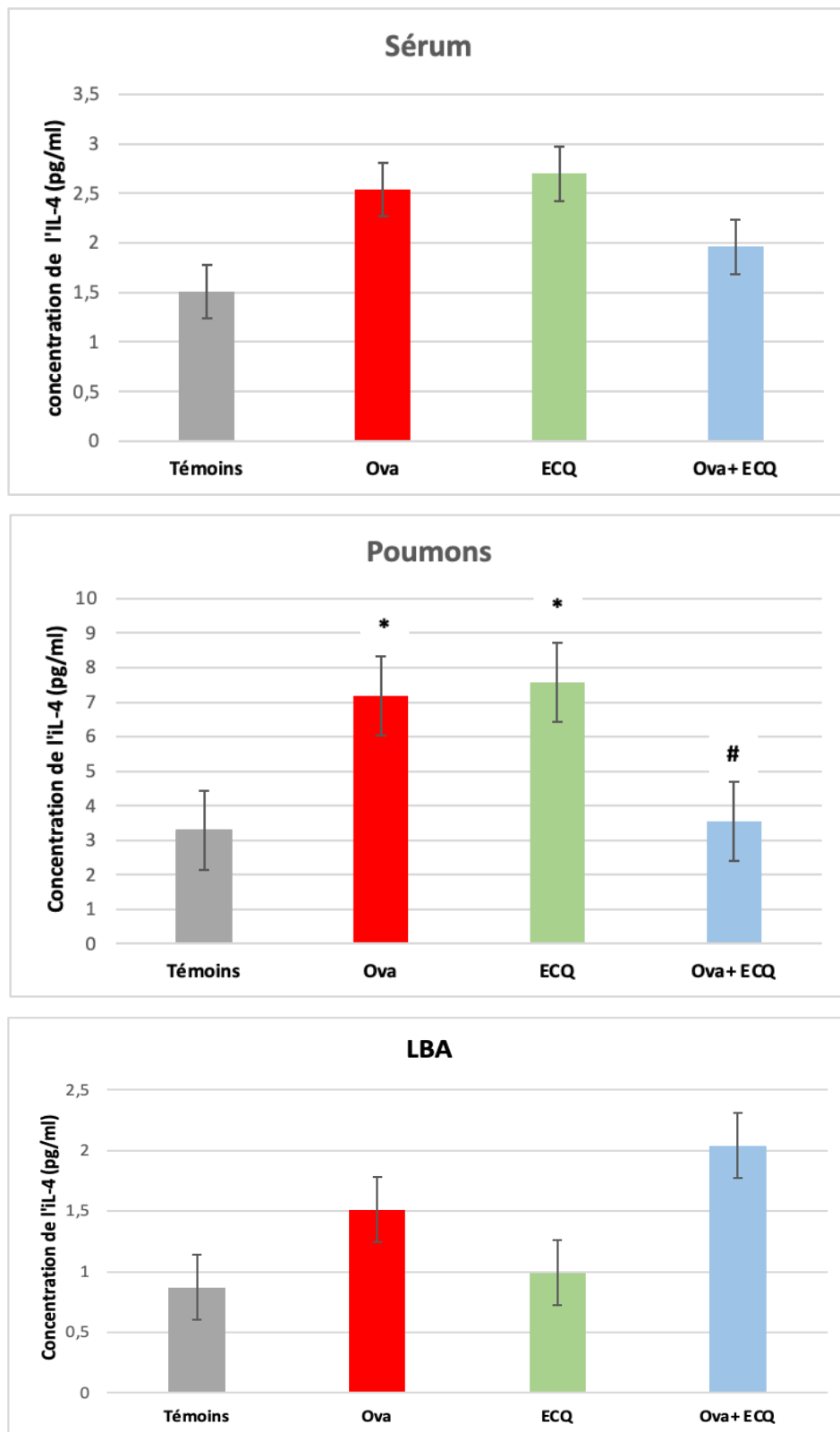


Figure 25 . Variation de taux de L'IL-4 dans le sérum, le liquide de LBA et les poumons chez les rats des 4 lots.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.5. Discussion de la partie expérimentale in vivo (paramètres physiologiques, inflammatoires, hématologiques et biochimiques)

Ainsi, comme dans toute expérimentation animale, le poids de l'animal, ainsi que le poids relatif des organes clés, sont mesurés tout au long du protocole, car la réduction de poids corporel est généralement utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat (Djeffal *et al*, 2012). En effet, les résultats obtenus montrent une diminution des poids des lots traités par la plante (ECQ) par rapport au lot témoin. Ce qui pourrai être dû au goût fort de ce condiment (clou de girofle) qui aurai réduit légèrement la consommation d'aliment et qui se répercute sur le poids final des rats. Par contre, on note une diminution du poids des lots sensibilisés par l'ovalbumine et ceci serai dû à l'état inflammatoire instauré par l'injection et/ou l'inhalation de l'allergène au cours du protocole d'asthme expérimental. En fin, on constate que le poids des lots traités par la combinaison OVA/ECQ par rapport au lot sensibilisé à l'ovalbumine est augmenté. Cette augmentation du poids corporel suggère que cette plante pourrait affecter de manière bénéfique le mécanisme de réparation de l'état inflammatoire dû à l'asthme allergique (lot OVA) et à aider à l'amélioration de la santé générale de ces rats. Ce rétablissement dans le gain de poids corporel dans le lot sensibilisé et traité par la plante (OVA+ECQ) laisse penser que la plante a eu un effet bénéfique chez ces rats par comparaison à ceux qui ont été seulement sensibilisés, rejoignant les données de la littérature concernant le girofler qui comme toutes les plantes de la famille des Myrtacées sont chargés de monoterpènes, 1,8-cinéole, caryophyllène, tanins et surtout d'eugénol, ce qui explique leur action ciblée (en aromathérapie) sur les organes respiratoires (Vermeulen et Johnston, 2011 ; Dupont et Guignard , 2012).

Par ailleurs, la sensibilisation à l'OVA, provoque une augmentation significative du poids absolu des poumons. En effet, Mauser et al (2013) ont suggéré que la provocation avec l'allergène (l'ovalbumine) induit une exsudation plasmatique accrue et des œdèmes donc un gonflement de l'organe enflammé. Dans notre étude c'est essentiellement le poumon. Quant à l'administration de la plante aux rats sensibilisés, ella a permis une diminution du PA et du PR des poumons. Cet effet de réduction du poids des poumons est dû à la diminution de la présence de l'inflammation de cet organe. En effet, l'eugénol : qui est un des composants importants de la plante du clou de girofle, joue un rôle anti-inflammatoire élevé. Ce composant permet d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, d'empêcher l'attraction des cellules responsables de l'inflammation (neutrophiles/macrophages) et d'inhiber la synthèse des prostaglandines qui contribuent au développement de plusieurs manifestations inflammatoires (Batiha *et al.* ; 2020).

D'autre part, la variation du poids relatif du foie montre qu'il y a une diminution significative ($p \leq 0,05$) du poids relatif du foie chez le lot traité par l'extrait aqueux (ECQ) et une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du poids relatif du foie chez les rats traités par la combinaison OVA/ECQ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine. On note une augmentation du poids relatif du foie chez le lot OVA comparativement aux rats témoins. Mais, une diminution très hautement significative du poids relatif du foie dans le lot OVA+ECQ comparativement au lot témoin. Le poids absolu du foie a également diminué de façon très hautement significative dans le lot OVA+ECQ comparativement au lot témoin. Ceci indique que *Syzygium aromaticum* n'a pas effectué de rôle hépato-protecteur, mais bien au contraire, ces résultats laissent penser que l'extrait aqueux du clou de girofle (du moins, à la dose utilisée) possède un effet hépatotoxique tel qu'il a été rapporté dans d'autres études. En effet, parmi les composés prépondérants dans le giroflier, c'est toujours l'eugénol, issu de la dégradation de la phénylalanine et appartenant aux phénylpropanoïdes (molécules dérivées du phénylpropane) (Werner et Von Braunschweig, 2008) qui est outre ses propriétés anti-infectieuses (bactéricides, virucides et parasitocides), et irritantes pour les muqueuses, il possède surtout un effet hépatotoxique à fortes doses et/ou à des doses répétées. D'ailleurs, Faucon (2012) préconise de l'utiliser chez l'homme sur de courtes périodes (21 jours), ou d'observer des fenêtres thérapeutiques (5 jours sur 7), en raison de son hépatotoxicité. Seulement, parmi les 3 « phénols » les plus puissants dans les huiles essentielles de plantes : le carvacrol, le thymol, et l'eugénol, ce dernier demeure le moins toxique.

Par ailleurs, la quantification biochimique des activités des enzymes hépatiques telles que l'ASAT et l'ALAT a été utilisée comme biomarqueurs des lésions hépatiques dans cette étude. En effet, comme le foie constitue le centre d'attaque de nombreuses substances toxiques présentes dans l'organisme (Adeyemi *et al* 2018), il est donc important de doser les enzymes hépatiques afin de déterminer le niveau des dégâts présents dans le foie. Un taux élevé de ces enzymes dans le sang indiquerait la présence d'une lésion dans le foie. Ces lésions vont résulter à une induction de la part des enzymes microsomaux hépatiques à une rupture plasmique des cellules du foie. Cela va aboutir à la libération de l'ALAT et l'ASAT au niveau de la circulation générale induisant ainsi leur augmentation (Burtis *et al.*, 2006). En fait, nos résultats concordent avec ceux de l'étude de Adli *et al* (2022) où il a été démontré que le composant eugénol présent dans la plante de *Syzygium aromaticum* possède la capacité de diminuer les transaminases plasmatiques. En effet, chez les rats présentant un dysfonctionnement hépatique (induit par des substances toxiques ingérées), la prise quotidienne de clous de girofle a permis d'améliorer leurs symptômes liés aux troubles et ainsi le taux des transaminases plasmatiques (Al-okbi *et al.*,

2014). Le suivi du dosage du taux de d'albumine permet de nous informer s'il y a présence d'un endommagement de l'intégrité structurale hépatique puisque cet organe est responsable de la synthèse de cette protéine. C'est pour cela que la présence de lésion au niveau du foie va avoir un impact négatif sur la synthèse de cette protéine (Khaldi *et al* 2022). Ainsi, nous avons observé une diminution de la concentration plasmatique en albumine, chez les rats asthmatiques comparativement au lot témoin. Par contre, il y a eu un rétablissement de la valeur normale de l'albumine chez les rats asthmatiques traités à l'extrait de la plante. Cela indique bien que le clou de girofle améliore le dysfonctionnement hépatique précédemment provoqué par la sensibilisation allergénique dans le modèle d'asthme expérimental chez le rat Wistar.

On rappelle que l'asthme est une maladie hétérogène comprenant divers phénotypes, environ la moitié des sujets asthmatiques développent une inflammation de type 2, caractérisée d'une part par la présence de granulocytes éosinophiles dans les voies respiratoires et d'autre part par des taux élevés d'anticorps de classe IgE (production par les plasmocytes), les cytokines de type Th2, comme l'interleukine 13, l'IL-5 et l'IL-4 (Condé *et al.*, 2021). Ces derniers déclenchent une hyperréactivité des voies respiratoires et une hypersécrétion de mucus. L'IL-4 est considérée comme une cytokine jouant un rôle clé dans l'asthme car elle est associée à la différenciation des cellules immunitaires lors d'une inflammation de type allergique (Nur Husna *et al.*,2022). Tout d'abord, parmi ces rôles importants, elle permet la régulation de l'expression de certaines molécules présentes dans la membrane des mastocytes, des basophiles, des monocytes, des macrophages et des lymphocytes B. Parmi ces molécules, on retrouve le FcεRI et le CMH classe II. Ensuite, cette cytokine permet de générer, dans les maladies allergiques, d'autres cytokines pro-allergiques comme l'IL-5 et l'IL-13 via les cellules Th2. Et enfin, l'IL-4 permet la migration des cellules Th2 et des éosinophiles vers le site enflammé (Nur Husna *et al.*,2022). Au vu de son importance, nous avons évalué le taux de cette cytokine dans plusieurs compartiments, afin de nous permettre de statuer sur son rôle et l'impact de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* sur la variation de ses taux. Ainsi, nos résultats indiquent une augmentation des taux d'IL-4 dans le groupe (ECQ) par rapport au groupe témoin. Ceci peut encore une fois être attribué à la toxicité de l'eugénol (Shih, 2014). L'eugénol serait même considéré comme un composant allergène, selon certains auteurs (Wernerm et Vonbraunschweigr, 2008) car il est connu pour ses propriétés potentiellement allergisantes, notamment dans le domaine de la parfumerie. À ce titre, il figure sur la liste des 26 substances inscrites à l'annexe III de la directive européenne 76/768/CEE1 en raison de son potentiel sensibilisant chez l'homme (AFSSAPS 2010). De plus, on constate une augmentation des taux d'IL-4 dans les trois compartiments étudiés, et ce dans le lot sensibilisé à l'OVA. Dans les

poumons, cette augmentation du taux d'IL-4 s'explique donc par l'augmentation du nombre de lymphocytes Th2 activés dans les alvéoles pulmonaires (Oberholzer & Pretorius, 2009 ; Agrawal & Shao, 2010). En effet, plusieurs études ont prouvé que les lymphocytes Th2 jouaient un rôle important dans l'apparition et la progression des maladies allergiques, dont l'asthme, en libérant de l'IL-4 (Renauld, 2001 ; Brightling et al., 2002). En revanche, le traitement de rats sensibilisés avec l'extrait aqueux a réduit la concentration d'IL-4 dans le sérum et dans les poumons. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Pan & Dong, 2015 ; Oberholzer et Pretorius, 2009), où les auteurs ont démontré à partir d'un modèle expérimental d'asthme allergique induit par l'ovalbumine (OVA) que l'administration d'eugénol inhibe l'éosinophilie induite par l'OVA dans le tissu pulmonaire, empêche l'augmentation de l'IL-4 et niveaux d'IL-5 et réduit la voie de signalisation NF- κ B. Selon ces mêmes auteurs, la réduction de la réponse inflammatoire jouerait un rôle central dans l'effet antiasthmatique de l'eugénol.

En ce qui concerne les variations de la réponse inflammatoire déclenchée par le traitement par l'OVA, il y a eu une augmentation significative du nombre total de leucocytes chez les rats sensibilisés à l'OVA. L'implication des leucocytes dans les processus inflammatoires locaux ou généraux est évidente. Il y a en effet un recrutement intense de cellules issues du sang lors du processus inflammatoire. Ce phénomène de « homing » implique l'expression de ligands à la surface des cellules endothéliales vasculaires et sur les leucocytes circulants. Ils sont alors attirés vers le foyer inflammatoire via les chimiokines et cytokines libérées au voisinage du tissu enflammé et y pénètrent par diapédèse (Langer & Chavakis, 2009 ; Stone, 2017). On constate une amélioration en diminuant le taux de globules blancs et lymphocytes par rapport au lot Ova, en effet, en considérant le seul effet anti-inflammatoire de l'eugénol, puisqu'on le rappelle il s'agit de la principale molécule bioactive du clou de girofle et comme cette dernière a été étudiée dans la migration des leucocytes en utilisant différents stimuli, tels que la N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP), leucotriène B4 (LTB4) et carraghénane. Le recrutement des cellules PolyMorphoNuclear (PMN) vers le site inflammatoire se produit en fonction d'une réponse complexe impliquant des interactions entre l'endothélium et les leucocytes (von Andrian *et al.*, 1991). Dans ce contexte, Estevão-Silva et ses collègues (2014) ont démontré que l'eugénol diminuait significativement la migration des leucocytes *in vitro* et *in vivo* en réponse à des facteurs chimiotactiques en modulant le roulement et l'adhésion aux tissus périvasculaires. Par ailleurs, dans notre présente étude, nous notons une diminution significative $p \leq 0,05$ du taux de globules rouges dans le lot sensibilisé à l'ovalbumine. Ces résultats semblent également en accord avec les travaux de Suzuki *et al.* (2015) qui ont constaté une altération du fer (ce dernier entre dans la synthèse de l'hémoglobine) dans l'inflammation

aiguë et une diminution du taux d'hémoglobine sanguine. D'autre part, sachant que l'augmentation du taux de protéines reflète celui des médiateurs de l'inflammation et est donc considérée comme un biomarqueur de l'inflammation pulmonaire provoquée par l'OVA (Salama *et al.*, 2012), ainsi, le dosage du taux de protéines totales a été réalisé au niveau du sérum et dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BAL) et nos résultats montrent que les lots traités avec l'extrait aqueux de clou de girofle ne présentaient pas de variation significative par rapport au lot T. Alors que les résultats obtenus (Figure 34), ont montré une augmentation de leur concentration dans le groupe OVA (sérum et LBA). Dans le groupe Ova/ECQ sensibilisé à l'ovalbumine et traité par l'extrait aqueux, on observe une diminution de la concentration plasmatique des protéines sériques totales et de celles du liquide de lavage broncho-alvéolaire pour atteindre des valeurs proches de celles du contrôle. Ces résultats concordent avec ceux observés dans l'étude Haro-Gonzalez *et al.*, (2021) où le clou de girofle a un effet protecteur sur les changements biochimiques. Ainsi, des études ont montré que l'eugénol peut réguler négativement l'inflammation en inhibant la libération de médiateurs inflammatoires (protéines dans la nature) par les macrophages (Yeh *et al.*, 2011).

2.6 Effets de l'extrait aqueux du *Syzygium aromaticum* sur les paramètres du stress oxydatif

2.6.1 Paramètres non-enzymatiques

2.6.1.1 Taux de malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats obtenus dans le tableau 16, au niveau du foie et des poumons, on observe une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) (+68,66, +175) du taux de MDA chez le lot sensibilisé avec l'OVA et une augmentation au niveaux des érythrocytes par rapport aux rats témoins. (+50) Par contre, on enregistre une diminution très significative ($p \leq 0,001$) du taux de MDA chez les rats traités avec ECQ ainsi que ceux traités par la combinaison (OVA + ECQ). En fin, on enregistre un léger rétablissement du taux de MDA chez les rats sensibilisés et traités par la plante.

Tableau 16. Variations du taux de MDA dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.

Les organes		Groupes expérimentaux			
		Témoins	ECQ	OVA	OVA+ECQ
Foie		0,67±0,23	1,13±0,26(***)	1,3±0,41(**)	1,07±0,21(**)
	%	/	+94,03	+68,66	+59,70
Poumons		0,2±2,0,11	0,55±0,15(**)(#)	0,59±0,08(***)	0,49±0,18(*)
	%	/	+195	+175	+145
Érythrocytes		0,04±0,03	0,06±0,02	0,07±0,03	0,05±0,02(#)
	%	/	+75	+50	+25

$p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparativement aux rats témoins;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.6.1.2 Taux des protéines carbonylées (PC)

Au niveau du foie et des poumons, les taux de protéines carbonylé (PC) indiquent une augmentation significative $p \leq 0,05$ de l'OVA et une augmentation des groupes ECQ par rapport au groupe témoin (Figure 26) Cependant, l'administration de l'extrait aqueux de clous de girofle a entraîné une amélioration dans le groupe OVA/ECQ par une diminution significative $p \leq 0,05$ par rapport au groupe OVA. Les niveaux de PC dans les poumons ont montré une diminution significative $p \leq 0,05$ dans le groupe ECQ par rapport au groupe OVA.

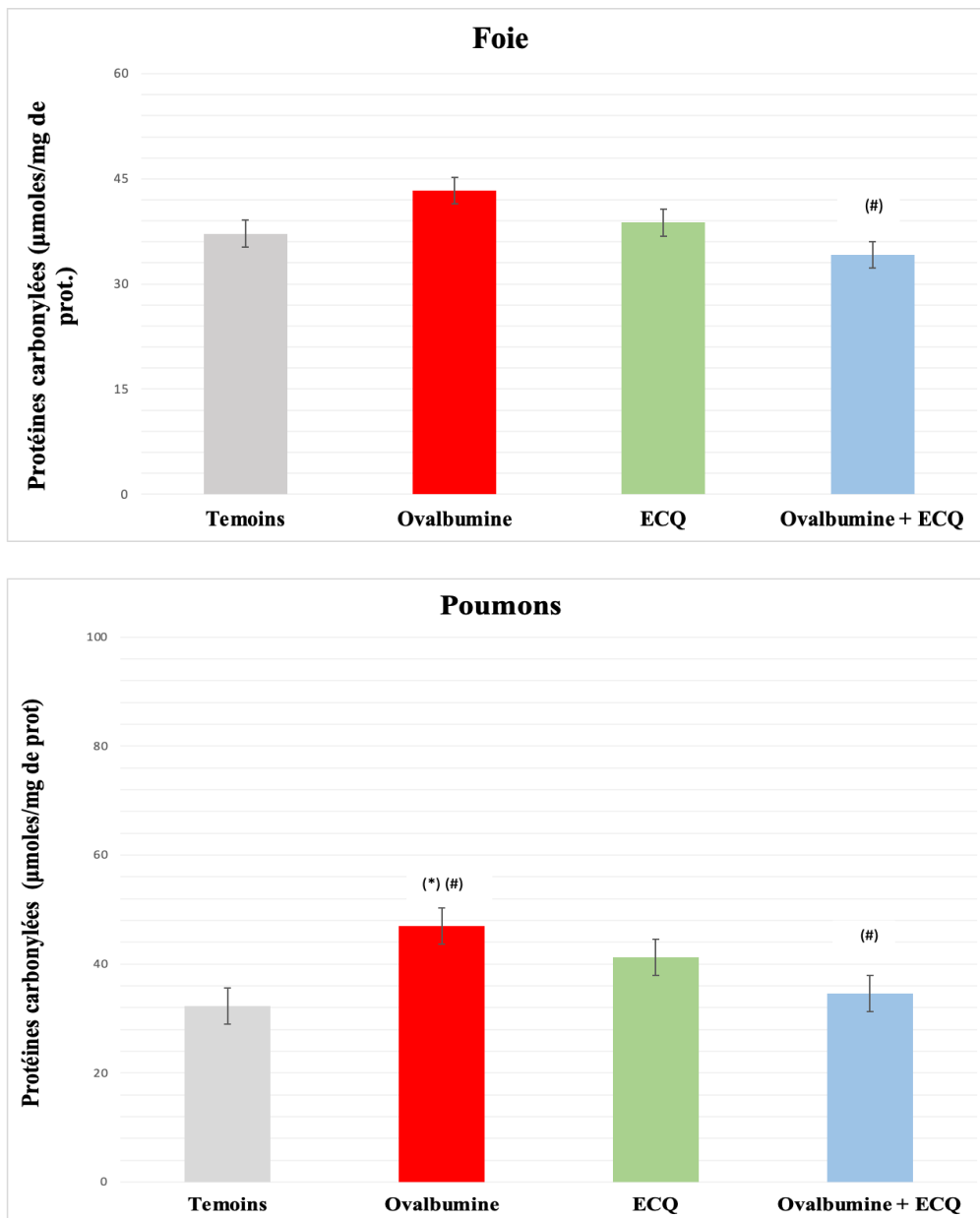


Figure 26. Variation des niveaux des protéines carbonylées (PC) dans le foie et les poumons chez les rats des 4 lots.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ par rapport aux rats témoins ;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$;### $p \leq 0,001$ par rapport aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.6.1.3 Taux du glutathion réduit (GSH)

L'activité du glutathion réduit dans le foie et les poumons montre une diminution significative ($p \leq 0,05$) dans le lot OVA (-24,00%, -38,34%) comparativement au lot témoin. Tandis qu'on enregistre un rétablissement objectif par une augmentation du taux de GSH chez le lot traité avec ECQ (-60,00%, -14,71%) et chez les rats traités par la combinaison (OVA+ECQ) (-32,00%, -23,53%) par rapport aux rats sensibilisés à l'ovalbumine (Tableau 17) et cela aux niveaux des deux organes étudiés et aux érythrocytes.

Tableau 17. Variation du taux de GSH dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.

Les organes		Groupes expérimentaux			
		Témoins	ECQ	OVA	OVA+ECQ
Foie		0,34±0,13	0,29±0,08	0,21±0,09(*)	0,26±0,15
	%	/	-60,00	-24,00	-32,00
Poumons		0,25±2,0,17	0,19±0,06(#)	0,10±0,07(*)	0,17±0,08
	%	/	-14,71	-38,24	-23,53
Érythrocytes		0,02±0,01	0,01±0,00(*)	0,01±0,01	0,03±0,03(#)
	%	/	-50,00	-50,00	+50,00

$p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparativement aux rats témoins;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.6.1.4 Taux des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP)

Au niveau du foie, le traitement des rats par l'ovalbumine entraîne une augmentation très significative ($p \leq 0,01$), comparée au lot témoin. Cependant, il y a eu une diminution significative ($p \leq 0,05$) chez les rats traités par la plante et chez les rats traités par la combinaison du l'ovalbumine et le *Syzygium aromaticum* (OVA+ECQ) comparé aux rats asthmatique (OVA). Au niveau des poumons, il y a eu une augmentation du taux en AOPPP chez les rats traités par l'ovalbumine, compare au lot témoin. Ce taux a été amélioré en revenant à la baisse chez les rats traités par le *Syzygium aromaticum* et chez les rats traités par la combinaison du l'ovalbumine et le *Syzygium aromaticum* (OVA+ECQ) comparés aux rats asthmatique (OVA) (Figure 27).

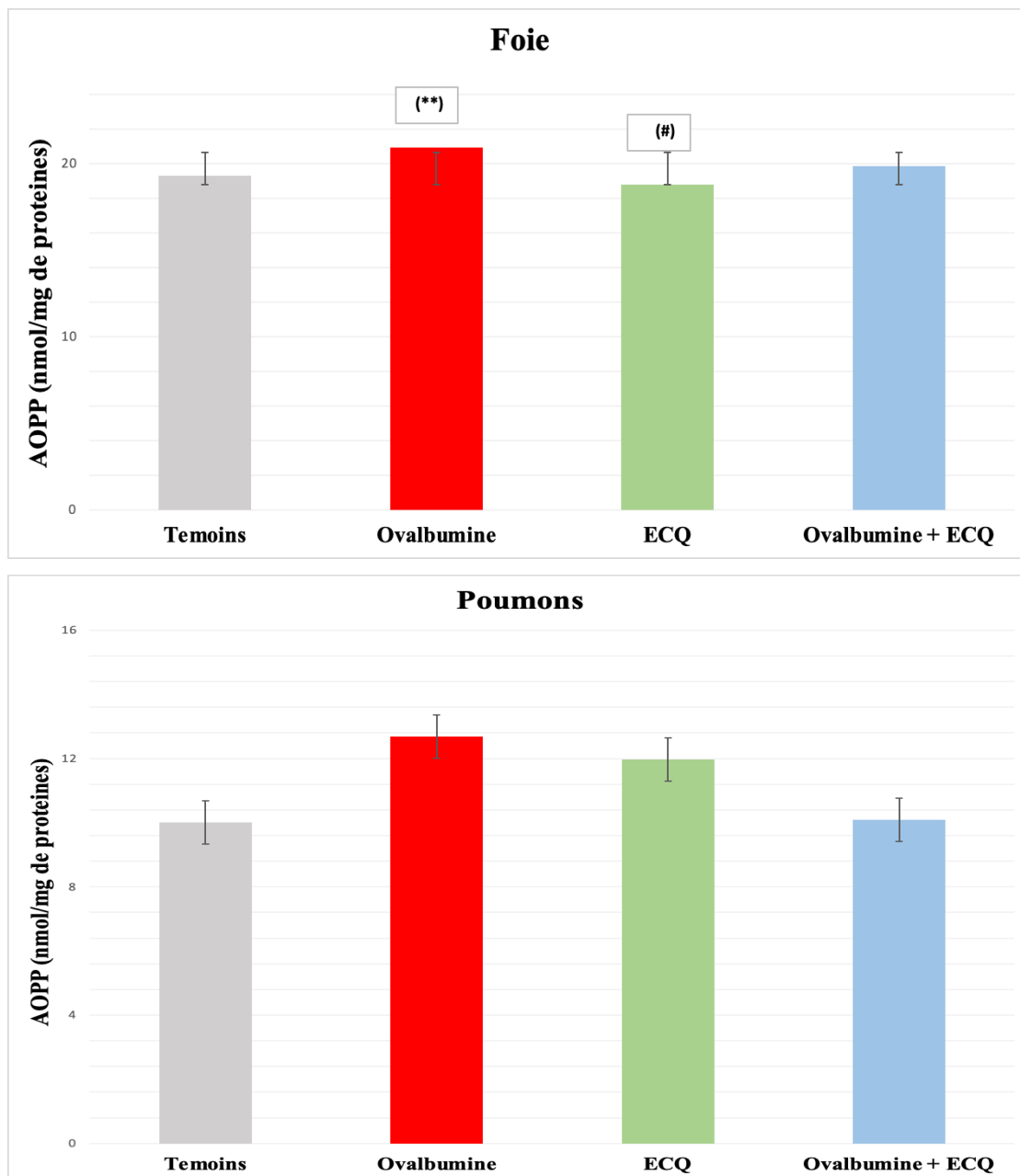


Figure 27. Variation des niveaux des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP) dans le foie et les poumons chez les rats des 4 lots.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ par rapport aux rats témoins ;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ par rapport aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.6.2. Paramètres enzymatiques

2.6.2.1 Taux du glutathion peroxydase (GPx)

Concernant la variation des taux hépatiques et pulmonaire de la glutathion peroxydase, on note une diminution significative ($p \leq 0,05$) dans le lot OVA (-37,38%, -76,60%) et le lot ECQ, (-65,43%, -14,89%) comparativement au lot témoin. Par contre, on enregistre

un rétablissement qui est représenté par une augmentation du taux de GPx chez les rats traités par la combinaison OVA+ECQ par rapport aux rats sensibilisés l'ovalbumine (Tableau 18) et cela au niveau du foie et des poumons. Au niveau des érythrocytes, il y a eu une diminution (-67,29%) du taux de GPx dans le lot sensibilisé à l'ovalbumine par rapport au lot témoin. On constate aussi, une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'activité enzymatique de la GPx dans le lot sain traité uniquement par l'ECQ comparativement aux rats du lot sensibilisé à l'ovalbumine. Le lot des rats sensibilisés à l'OVA puis traités par la plante (ECQ) montre aussi une augmentation de taux de la GPx en comparaison toujours avec le lot des rats sensibilisés à l'ovalbumine.

Tableau 18. Variation du taux de GPx dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.

Les organes		Groupes expérimentaux			
		Témoins	ECQ	OVA	OVA+ECQ
Foie		1,07±0,22	0,37±0,47(*)	0,67±0,17(*)	0,88±0,05
	%	/	-65,42	-37,38	-17,76
Poumons		0,47±0,01	0,40±0,28(#)	0,11±0,08(*)	0,21±0,17
	%	/	-14,89	-76,60	-55,32
Érythrocytes		3,21±2,83	3,78±1,51(#)	1,05±0,55	3,46±3,58
	%	/	+17,76	-67,29	+7,79

$p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparativement aux rats témoins;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.6.2.2 Taux de catalase (CAT)

Au niveau du foie et des poumons, le taux de CAT chez les rats traités par l'ovalbumine a entraîné une diminution significative ($p \leq 0,05$), comparée au lots témoins. Cependant, aux niveaux de ces 2 organes, il y a eu une augmentation significative ($p \leq 0,05$) chez les rats traités par le *Syzygium aromaticum* et chez les rats traités par la combinaison du l'ovalbumine et le *Syzygium aromaticum* (OVA+ECQ) comparé aux rats asthmatique (OVA). Au niveau des érythrocytes il y a eu une diminution de CAT chez les rats traités par l'ovalbumine, comparés au lot témoin. Ce taux a été amélioré en revenant à la hausse chez les rats traités par le *Syzygium aromaticum* et chez les rats traités par la combinaison du l'ovalbumine et le *Syzygium aromaticum* (OVA+ECQ) comparé aux rats asthmatiques (OVA) (illustrée dans la figure 28).

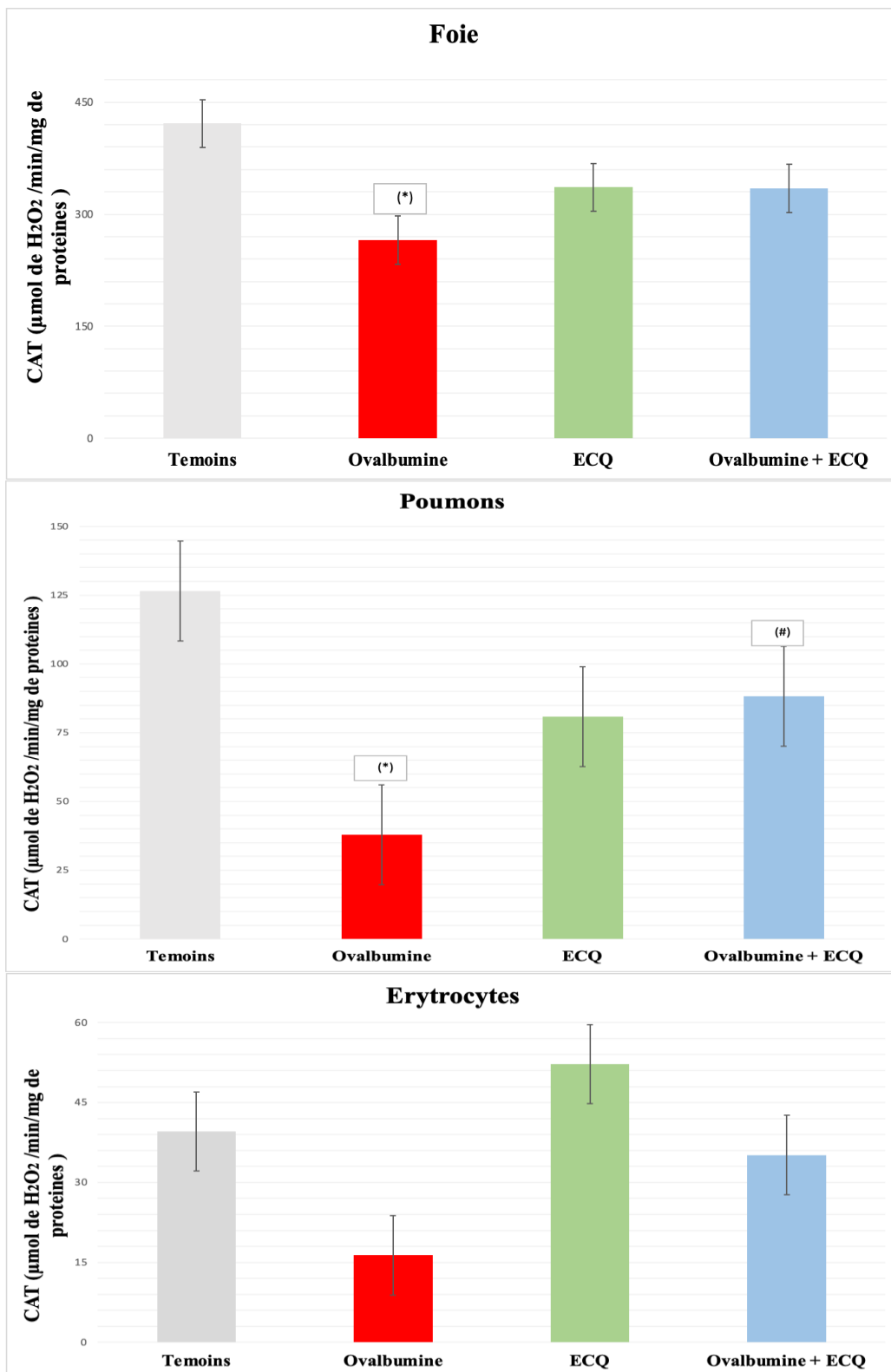


Figure 28. Variation des niveaux de CAT dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ par rapport aux rats témoins ;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ par rapport aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.6.2.3 Taux du glutathion - S- transférase (GST)

En présence d'asthme (lot OVA), cette dernière a abouti à une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase dans le foie (-31,63%), une diminution très significative $p \leq 0,01$ dans les poumons (-63,76%) et avec une diminution dans les érythrocytes (-26,87%). Cependant, on enregistre une amélioration par une augmentation de l'activité de la GST dans les organes étudiés du groupe asthmatique traité par l'extrait de la plante (OVA+ECQ) par rapport au groupe traité uniquement à l'OVA (Tableau 19).

Tableau 19. Variation de taux de GST dans le foie, les poumons et les érythrocytes chez les rats des 4 lots.

Les organes		Groupes expérimentaux			
		Témoins	ECQ	OVA	OVA+ECQ
Foie		0,98±0,38	1,26±0,36(#)	0,67±0,24	0,89±0,17
	%	/	+28,57	-31,63	-9,18
Poumons		1,49±2,0,67	0,66±0,51	0,54±0,15(*)	0,94±0,68
	%	/	-55,70	-63,76	-36,91
Érythrocytes		1,34±0,26	1,15±0,44	0,98±0,22	1,14±0,22
	%	/	-14,18	-26,87	-14,93

$p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparativement aux rats témoins;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine.

2.7. Discussion sur la partie des effets protecteurs de l'extrait aqueux du *Syzygium aromaticum* sur les paramètres du stress oxydatif chez les rats asthmatiques

Le stress oxydatif généré dans ce modèle d'asthme expérimental chez les rats wistar reflète un déséquilibre entre les systèmes biologiques défensifs et agressifs, médié par une production excessive d'O₂ réactif, d'espèces oxygénées (ROS), d'OH (radical hydroxyle) et de H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène). Dans ces conditions, l'organisme perd la capacité des mécanismes anti-oxydants à les neutraliser (Patlevič *et al.*, 2016). Cet échec entraîne des effets toxiques et des altérations de l'état redox normal, associés à des dommages cellulaires et à une peroxydation lipidique (Barboza *et al.*, 2018) et afin de contrer la dérégulation induite par le stress oxydatif, l'organisme dispose de tout un arsenal d'enzymes comme la SOD, la CAT, GST et le GPx et d'anti-oxydants endogènes (GSH) qui permettent de lutter contre cette agression (Haro-Gonzalez *et al.*, 2021). Ceux-ci sont considérés comme la première ligne de défense contre les dommages oxydatifs (Haro-Gonzalez *et al.*, 2021). Dans notre étude, l'analyse de l'impact des ROS sur les membranes biologiques a été réalisée en mesurant le taux de malondialdéhyde (MDA) par spectrophotométrie. Ce dernier constitue un biomarqueur du stress oxydatif, qui permet de déterminer le degré de peroxydation lipidique (LPO) des membranes cellulaires suite à une attaque étrangère (Giguère et al., 2003 ; Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2007). Effectivement comme le montrent nos résultats sur la quantité de MDA (Tableau n°19), dans le lot OVA, il y a eu une augmentation hautement significative $p \leq 0,01$ (foie) et très hautement significative $p \leq 0,001$ (poumons) du MDA. Cela indique que l'exposition à l'OVA peut conduire à la production excessive de MDA et ainsi au stress oxydatif par la génération non régulée des espèces réactives oxygénées (ERO) rejoignant les données de la littérature (El-Shenawy, 2009). Des résultats similaires ont été aussi observés au niveau des variations des taux d'AOPP. En ce qui concerne la teneur cellulaire en glutathion réduit (GSH), il y a eu une diminution significative ($p \leq 0,05$) tout comme il a été rapporté par d'autres études (Kamboj *et al.*, 2008 ; De Almeida *et al.*, 2017) et expliqué par ces auteurs par le fait qu'il y ait eu activation des défenses antioxydantes, probablement en raison de la production accrue de H₂O₂ présente lors d'un stress oxydatif et enclenchée dans notre cas par l'injection d'ovalbumine. Cet antioxydant non enzymatique (GSH) est mêlé dans plusieurs processus de défenses antioxydantes de nature enzymatique que ce soit intra- ou bien inter-cellulaires (De Almeida *et al.*, 2017). Parmi ces processus, il y a son implication dans la détoxification des herbicides via le système glutathion S-transférase (GST) (Dixon et Edwards ; 2010) et aussi dans la détoxification contre des composés toxiques et les ERO. Effectivement, le GSH se

comporte comme un co-substrat des enzymes anti-oxydantes telles que le GPx (Garg *et al.*, 2009) qui va catalyser la conjugaison du GSH à des substrats endogènes tels que le H₂O₂, afin de former la glutathionne disulfure oxydée (GSSG) ainsi que de l'eau (Chabory ; 2009). L'épuisement significatif des niveaux de GSH dans cette étude confirme le potentiel d'OVA à induire un stress oxydant dans le foie et les poumons.

Par ailleurs, dans le lot traité avec l'extrait aqueux de clou de girofle, il y a eu une réduction très significative $P \leq 0,01$ de MDA, une augmentation significative $P \leq 0,05$ de niveaux de GSH et une diminution au niveau d'AOPP. Ainsi, l'eugénol, pour ne citer que le composé bioactif le plus important, a réduit les dommages aux organes en diminuant les médiateurs inflammatoires et en modulant le statut redox (Abd El Motteleb *et al.*, 2014). En ce qui concerne les flavonoïdes, deuxième composant important de la plante *Syzygium aromaticum*, celui-ci appartient au système anti-oxydant non enzymatique (Chagas *et al.*, 2022) comme les acides phénoliques (ex : les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques) et des différents composés des flavonoïdes (ex: caroténoïdes :les xanthophylles, le bêta-carotène) (Bhattacharya, 2015). La teneur en protéines carbonyles est en fait l'indicateur le plus général et le marqueur le plus couramment utilisé de l'oxydation des protéines (Dalle-Donne *et al.*, 2003), et l'accumulation de ces composés a été trouvée dans plusieurs maladies humaines (comme l'inflammation des voies respiratoires, les lésions pulmonaires oxydatives), et maladie d'Alzheimer) (Khaldi *et al.*, 2018). La mesure du taux de protéines carbonyle dans les poumons et le foie a indiqué une diminution significative $p \leq 0,05$ dans le groupe OVA/ECQ (rats traités) par rapport au groupe OVA, où le taux était en augmentation significative $p \leq 0,05$ par rapport au lot témoin. Ce résultat a montré que l'extrait aqueux de clou de girofle permettait de prévenir les dommages protéiques induits par l'oxydation en diminuant la formation de protéines carbonyle et en protégeant contre la perte de groupes protéiques thiols (Suantawee *et al.*, 2014). Ces préventions prouvent que les polyphénols présents dans l'extrait aqueux de clou de girofle (qui est l'un des composants de la plante qui lui confère son pouvoir anti-oxydant) étaient capables d'inhiber la formation d'oxydation des protéines (Suantawee *et al.*, 2014). Quant aux composés bioactifs apportés par la plante, tels que l'eugénol, l'acétate d'ugényle et le β -caryophyllène, ils semblent jouer un rôle clé dans le rétablissement de l'équilibre REDOX (Haro-Gonzalez *et al.*, 2021). L'action anti-oxydante de ces composés vient de leur capacité à protéger les cellules de l'oxydation des radicaux libres. Yogalakshmi et al. (2010) ont rapporté que le clou de girofle possède une activité anti-radicalaire et inhibe la peroxydation lipidique. Dans leur étude, un prétraitement à l'eugénol chez le rat pendant 15 jours entraînait une diminution des indices de peroxydation lipidique (LPO), de l'oxydation des protéines et des

marqueurs inflammatoires (réduction de l'expression de la COX- 2, TNF- α et IL-6) et un statut anti-oxydant amélioré en maintenant des anti-oxydants tels que la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT). Ces résultats concernant l'effet anti-oxydant sont en accord avec ceux obtenus lors de notre étude. En effet, les valeurs de GPx, GST et de CAT dans le foie, les poumons et les érythrocytes du lot de rats asthmatiques traités avec la plante (OVA+ECQ) ont augmenté par rapport au lot OVA non traité. Ce qui prouve que non seulement l'administration de l'extrait aqueux de la plante a protégé les cellules contre les espèces réactives oxygénées (ERO), mais aussi il a permis d'augmenter l'activation des enzymes anti-oxydantes, tel que cela a été mentionné dans la littérature (Salehipour *et al.*, 2017). Une autre étude a également confirmé les effets anti-oxydants et anti-inflammatoires de l'eugénol suite au prétraitement réalisé sur des souris albinos (Kaur *et al.*, 2010). En fait, le prétraitement à l'eugénol est non seulement efficace pour réduire l'inflammation causée par l'exposition des poumons au LPS, mais ce composé est également capable d'améliorer les niveaux de SOD, CAT, GPx et GST. Ainsi, l'eugénol peut être utilisé comme agent anti-inflammatoire, ainsi que pour protéger contre les dommages causés par le stress oxydatif.

2.8 Étude histologique

2.8.1 Etude histologique du foie :

L'examen histopathologique représentative d'un foie normal chez les rats témoins montre une architecture lobulaire normale (flèche rouge) avec une veine centrale (flèche noir) et des cordons hépatiques irradiants (**Fig. 29-C**). Cependant, la coupe du foie des rats traitée par l'OVA , (**Fig. 29-OVA**) a montré la présence de dilatation sinusoidale (relativement épais) (flèche rouge) et la présence d'une infiltration cellulaire des cellulaires inflammatoires. Concernant les rats traite uniquement aux ECQ, aucune altération histologique n'a été observée dans le foie par rapport au témoin (**Fig 29-ECQ**). En revanche, chez les ras asthmatiques où il y a eu administration de l'extrait du clou de girofle, la dilatation sinusoidale a diminué (flèche rouge) et il y a eu amélioration de la morphologie des cellules hépatiques (flèche blanche). (**Fig 29-OVA+ECQ**). Ceux-ci indique une amélioration considérable de l'architecture du tissu hépatique par rapport au groupe OVA.

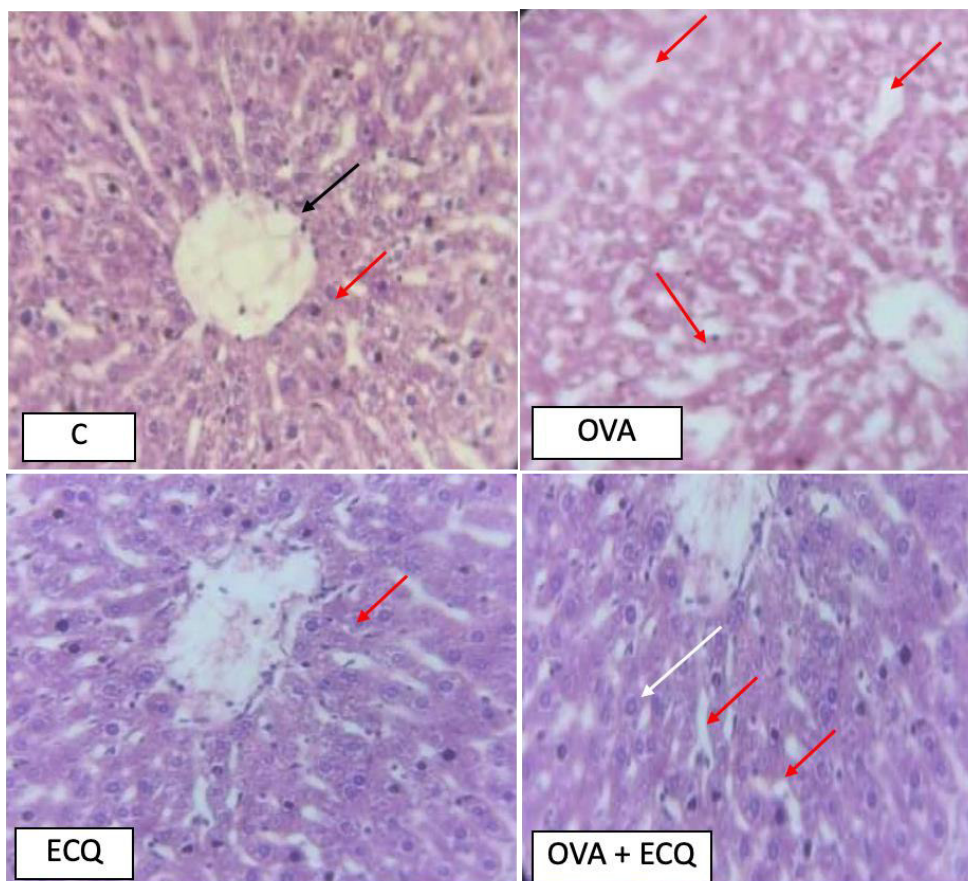


Figure 29. Coupes histologiques de du foie de rats issus de 4 lots expérimentaux. (x40) (C) Foie d'un rat témoin montrant la représentation normale; (OVA) Foie d'un rat sensibilisé à l'ovalbumine, montrant une dilatation sinusoidale ; (ECQ) Foie de rat traité à l'extrait de clou de girofle ; (OVA+ECQ) Foie de rat sensibilisé à l'ovalbumine et traité à l'extrait d'ECQ.

2.8.2 Etude histologique des poumons :

L'observation microscopique de coupes réalisées sur les poumons de rats témoins montre une architecture pulmonaire normale. D'après la figure 30-C, on constate la présence de sacs alvéolaires (flèche rouge), et les parois des bronchioles (flèche bleue) possèdent un épithélium normal. Ces mêmes résultats ont été observés sur les coupes histologiques du lot traité uniquement par ECQ. En revanche, au niveau du lot OVA, souffrant d'asthme, on constate la présence d'une infiltration cellulaire importante (flèche rouge) illustrée sur la **figure 30-OVA (A)**. De plus, on notait la présence d'œdème ainsi qu'un épithélium épais (flèche noire) avec quelques foyers hémorragiques et la présence de mucus et de cellules inflammatoires dans la lumière des bronchioles (flèche blanche) sur la **figure 30 OVA (B)**. Concernant les observations sur les coupes histologiques de rats sensibilisés à l'OVA et traités avec l'extrait aqueux (**figure 30-OVA+ECQ**), il existe des signes de correction histologique avec une infiltration minimale, une réduction ou une absence de cellules inflammatoires au niveau de la lumière des bronchioles (flèche rouge), et une réduction de l'épaisseur de l'épithélium (flèche noir).

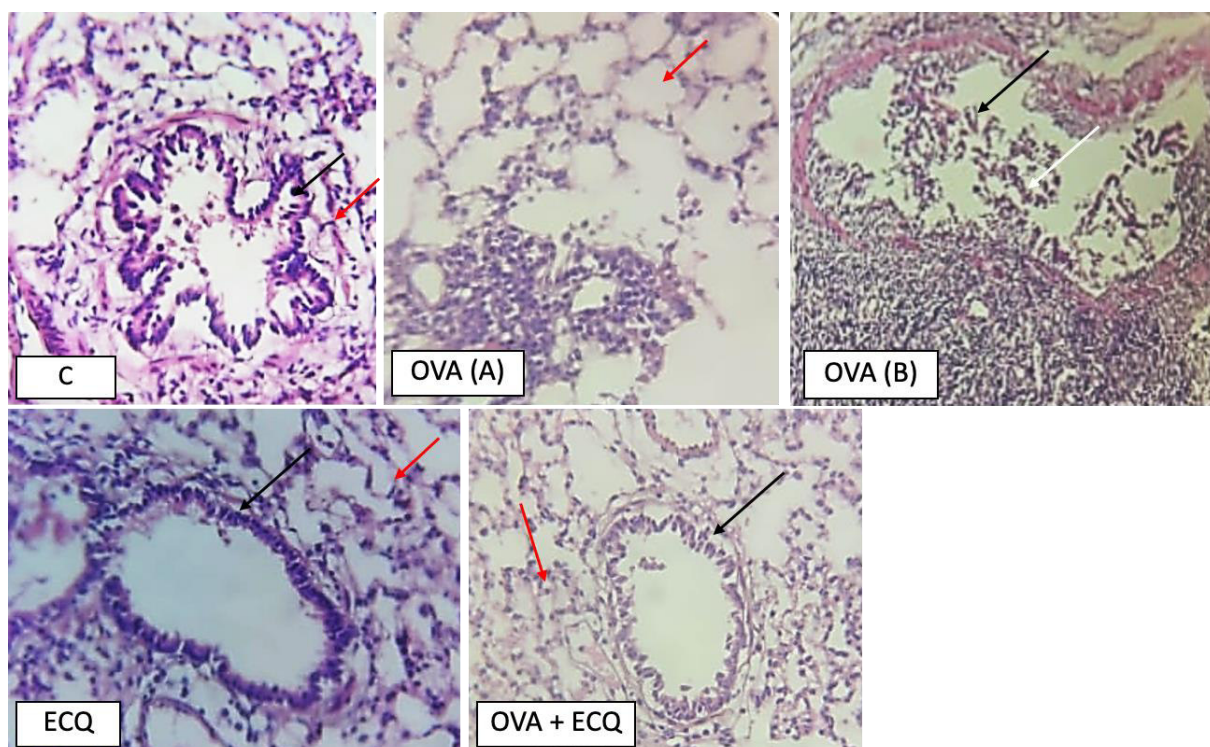


Figure 30 . Coupes histologiques de poumons de rats issus de 4 lots expérimentaux. (x40) (C) Poumon d'un rat témoin montrant la représentation normale du poumon ; (OVA) Poumon d'un rat sensibilisé à l'ovalbumine, montrant l'infiltration inflammatoire (OVA-A) qui se traduit par l'accumulation apparente d'éosinophiles et d'autres lymphocytes dans la lumière de la bronchiole (OVA-B) ; (ECQ) Poumon de rat traité à l'extrait de clou de girofle ; (OVA+ECQ) Poumon de rat sensibilisé à l'ovalbumine et traité à l'extrait d'ECQ.

2.9. Discussion de la partie des effets protecteurs de l'extrait aqueux du *Syzygium aromaticum*) au niveau histologique (foie et poumons) chez les rats asthmatiques

Tous les résultats précédents sur les effets anti-oxydants et anti-inflammatoires de la plante sont conformes à la présente étude histopathologique du foie et des poumons. En effet, concernant le tissu hépatique, l'examen histopathologique permet de déterminer qu'il y a bien eu présence d'une fibrose hépatique à cause des lésions engendrée par l'inflammation tel que cela a été rapporté dans la littérature (Abdelrahman *et al.*,2018). En effet, chez les rats asthmatiques où le stress oxydatif est élevé dû à l'exposition à l'ovalbumine, les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 29 (OVA). La coupe histologique au niveau du foie prouve qu'il y a induction d'une inflammation accompagnée d'une prolifération de fibroblastes, une infiltration cellulaire et aussi d'une fibrose. Ces lésions sont provoquées par une génération prolongée de ROS a abouti à l'éclatement des cellules hépatocytaires. En réponse aux ROS, une matrice extracellulaire se forme dans le tissu hépatique, entraînant ainsi des modifications de l'architecture hépatique, et une perte de fonction tissulaire (Ali *et al* ;2014). Cependant, cet effet néfaste au niveau tissulaire du foie a diminué suite aux traitements des rats asthmatiques avec l'extrait aqueux du clou de girofle (figure 29 OVA+ECQ). Ces améliorations sont représentées sous forme de diminution d'infiltration et d'une absence de prolifération des fibroblastes. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la plante *Syzygium aromaticum* possède une forte activité antioxydante qui permet de neutraliser les ROS grâce à l'effet protecteur de l'eugénol, (le constituant majeur du *Syzygium aromaticum*) contre les lésions hépatiques. Cette neutralisation résulte à une diminution des lésions hépatiques et au maintien normal de sa structure. Plusieurs études ont démontré l'effet de protection des composés phytochimiques présents dans les plantes médicinales tel que le clou de girofle, contre les dommages du stress oxydatif. Parmi ces études, il y a celle de Shukri *et al.* (2010) qui ont révélé que le fait d'administrer le clou de girofle permet de réduire les dommages tissulaires dans le foie. Il y a aussi une autre étude effectuée par Said (2011) qui concorde avec nos résultats. En effet dans cette dernière, l'administration de l'eugénol a pu inhiber les lésions oxydatives du tissu rénal chez les rats Sprague-Dawle. D'autre part, au niveau des poumons, plusieurs caractéristiques ont été observées, chez les rats asthmatiques (OVA), on observe la présence d'une infiltration de granulocytes, de péribronchiques sur la figure 30. La plupart de ces cellules inflammatoires sont constituées de lymphocytes et d'éosinophiles, principalement situés autour des petites bronches, des bronchioles et des vaisseaux sanguins. À l'infiltration de ces cellules s'ajoute la présence d'œdème. Cependant l'utilisation du traitement à base d'extrait aqueux de plante *Syzygium aromaticum*, a permis de réduire l'œdème alvéolaire en contribuant à soulager et

réduire l'inflammation pulmonaire et en réduisant le taux de cellules inflammatoires et leur infiltration dans la lumière des bronchioles tel que cela a été rapporté dans la littérature (Zemmouri *et al.*, 2017 ; Csikos *et al.*,2022).

CONCLUSION

Conclusion et perspectives

Le clou de girofle a longtemps été utilisé à des fins thérapeutiques et de nombreuses études démontrant sa composition riche en composés bioactifs, s'accordent à lui attribuer des vertus multiples. Ce sont ses huiles essentielles qui ont été le plus étudiées. Dans notre présente étude, nous avons choisi l'extrait aqueux des clous de girofle pour mettre en exergue sa composition et ses propriétés *in vitro* et *in vivo*, notamment dans un modèle d'asthme expérimental. Nos expérimentations ont été effectuées dans un premier temps dans le but d'établir le dosage de certains composés polyphénols de l'extrait aqueux de la plante *Syzygium Aromaticum* afin de les confirmer par screening chimique par l'intermédiaire de l'HPLC. Ensuite, il y a eu détermination des activités anti-oxydantes et antibactériennes du clou de girofle. D'après les résultats de l'analyse phénotypique de l'extrait aqueux de *Syzygium Aromaticum*, ce dernier contient des quantités plus ou moins importantes de composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et ortho-diphénols). En revanche, certains composés phénoliques étaient présents en moindre quantité comme les flavonols. Ces résultats ont été confirmés par la technique HPLC (acide gallique, acide ellagique, eugénol et quercétine). Concernant l'étude de l'activité anti-oxydante de la plante (test DPPH, ABTS et β -carotène), les valeurs de cette dernière étaient élevées, confirmant ainsi sa forte activité anti-oxydante.

Ensuite, dans un deuxième temps, le but était d'évaluer les effets de l'administration par voie orale d'un extrait aqueux de la plante *Syzygium Aromaticum*. Ce protocole a été mis en oeuvre dans le but d'évaluer l'état de l'inflammation allergique, du stress oxydant chez des rats males wistar préalablement sensibilisés à l'ovalbumine et cela au niveau de plusieurs compartiments : foie, poumons et érythrocytes. Puis, il nous a semblé important de confirmer le potentiel protecteur anti-inflammatoire et anti-oxydant de la plante par la mesure des biomarqueurs du stress oxydatif. Ainsi, notre présente étude a démontré les bienfaits anti-inflammatoires du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) contre la pathologie asthmatique. Effectivement, l'effet anti-oxydant et anti-inflammatoire de la plante a permis de protéger et d'améliorer les dommages causés par l'état du stress oxydatif et celui de l'asthme allergique chez les rats traités par OVA+ECQ. Ces améliorations se traduisent par la restauration des activités et des taux normaux des enzymes anti-oxydantes (GST, CAT et GPx), de la teneur en GSH, PC et d'AOPP, et par la régulation de la peroxydation lipidique (LPO) des membranes cellulaires qui est déterminée par le taux de MDA. Il y a eu aussi un rétablissement des paramètres hématologiques (FNS, protéines sériques et pulmonaires et IL-4), biochimiques (ASAT, ALAT, PAT et Albumine) ainsi qu'au niveau de l'architecture pulmonaire et hépatique. Ainsi,

outre les propriétés scientifiquement approuvées, par notre présente étude ainsi que par une richissime littérature, attribuant des propriétés thérapeutiques au clou de girofle, seules quelques indications dérivant de ces études ont été approuvées par l'Agence Européenne du Médicament (EMA). En effet, notre étude n'est pas la seule à rapporter un effet toxique pour le foie, qu'il convient de signaler auprès de toutes les autres vertus qu'on puisse lui attribuer. Ce constat suggère d'approfondir les recherches d'avantage avec une étude effet/dose en utilisant différents extraits de *Syzygium aromaticum*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

A

Abd El Motteleb, D. M., Selim, S. A., & Mohamed, A. M. (2014). Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. *Journal of Immunotoxicology*, 11(3), 238-245.

<https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.832444>

Abo-El Maati F A, Mahgoub S A, Labib S M, Al-Gaby A M A, Ramdan M F. (2016). Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *European Journal of Integrative Medicine*. 8(4): 494-504.

Adam-Vizi, V. (2005). Production of Reactive Oxygen Species in Brain Mitochondria : Contribution by Electron Transport Chain and Non–Electron Transport Chain Sources.

Antioxidants & Redox Signaling, 7(9-10), 1140-1149. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1140>

Adeyemi J A, Arowolo KO, Olawuyi T S , Alegbeleye D, Ogunleye A , Bamidele O S, Adedire C O. (2018). Effect of co-administration of Green Tea (*Camellia sinensis*) on Clove- (*Syzygium Aromaticum*) Induced Hepatotoxicity and Oxidative Stress in Wistar Rats. *Indian J Physiol Pharmacol* ; 62(2) : 195–201

Adouane S., (2016), Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Mémoire de Magister en science agronomiques Université Mohamed Khider - Biskra. p56

Adli D E H, Ziani k, Kourat D, Brahmi M, Souidi S A, Naar A, Kahloula K; and Sliman M. (2022). Ameliorative Effect of The Essential Oil of *Syzygium aromaticum* in Wistars Rats Exposed to Aluminum Chloride. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.*, 14(2):403-413

Al-Okbi S, Mohamed D A, Hamed T E; Edris M E. (2014) Protective Effect of Clove Oil and Eugenol Microemulsions on Fatty Liver and Dyslipidemia as Components of Metabolic Syndrome. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*.17 (7) , 764–771

Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, p. 121-126). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

Agrawal, D. K., & Shao, Z. (2010). Pathogenesis of Allergic Airway Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports*, 10(1), 39-48. <https://doi.org/10.1007/s11882-009-0081-7>

Aldakheel, F. M., Thomas, P. S., Bourke, J. E., Matheson, M. C., Dharmage, S. C., & Lowe, A. J. (2016). Relationships between adult asthma and oxidative stress markers and pH in exhaled breath condensate : A systematic review. *Allergy*, 71(6), 741-757. <https://doi.org/10.1111/all.12865>

Ali A S, Abdelaziz D.H.A. (2014). The protective effect of Phoenix dactylifera L. seeds against CCl4-induced hepatotoxicity in rats, *Journal of Ethnopharmacology*. 155(1), 736-743,

Ambade, A., & Mandrekar, P. (2012). Oxidative Stress and Inflammation : Essential Partners in Alcoholic Liver Disease. *International Journal of Hepatology*, 2012, e853175.

<https://doi.org/10.1155/2012/853175>

Anita D, Avtar S, Ritu M.(2015). Antioxidants of clove (*Syzygium Aromaticum*) prevent metal induced oxidative damage of biomolecules. *International research journal of pharmacy*. 6(4) : 273- 278.

Askari V.R. (2022). HPLC/MS characterization of *Syzygium aromaticum* L. and evaluation of its effects on peritoneal adhesion: Investigating the role of inflammatory cytokines, oxidative factors, and fibrosis and angiogenesis biomarkers. *Physiological Reports*. 11, 5584. <https://doi.org/10.14814/phy2.15584>

Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S., Khebri S., (2010). Activité Anti-oxydante et Antimicrobienne d'extraits de *Cuminum Cyminum* L., *Lebanese Science Journal*, 11 (1) : 69-79.

Auvray I. (2020). Histoire, propriétés et utilisations de l'eugénol en odontologie. *Sciences du Vivant [q-bio].hal-03298210*.

B

Barbelet, S. (2015). *Le giroflier : Historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle* (p. non renseigné) [Other, Université de Lorraine]. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732523>

Barboza, J. N., da Silva Maia Bezerra Filho, C., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R., & de Sousa, D. P. (2018). An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, e3957262. <https://doi.org/10.1155/2018/3957262>

Barnes PJ. (2011). Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol. Rev.* 242, 31–50.

Barnes PJ. (2018). Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 18(7): 454-466.

Barnes Peter J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *nature reviews immunology*, volume 8, pp: 183-192;

Belge E.K, (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/Nutrition Journal;15: 71. Doi: 10.1186 / s12937-016-0186-5.

Benaissa M., (2012). Conception et synthèse de dérivés phénolique hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologique vis-à-vis des maladies cardiovasculaire (athérosclérose). Thèse de doctorat Chimie-biologie-santé. Université Toulouse. p14.

Benhammad b Z., (2016), Contribution à l'étude phytochimique et de l'activité anti-oxydante des extraits des plantes : *Salvia officinalis*, *Mentha pulegium*, *Satureja*, Mémoire de master. Université de Telemcen, p12

Bhattacharya, S. (2015). Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. In V. Rani & U. C. S. Yadav (Éds.), *Free Radicals in Human Health and Disease* (p. 17-29). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_2

Binsan W, Benjakul S, Visessanguan W, Roytrakul S, Tanaka M, Kishimura H. (2008). Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Food Chem.106(1):185–193.

Biswas, S. K., Lopes De Faria, J. B., Biswas, S. K., & Lopes De Faria, J. B. (2007). Which comes first : Renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radical Research*, 41(2), 216-224. <https://doi.org/10.1080/10715760601059672>

Bouaziz, M., R. J. Grayer, M. S. Simmonds, M. Damak and S. Sayadi (2005). "Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar

Bouaziz, M., I. Feki, M. Ayadi, H. Jemai and S. Sayadi (2010). "Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves." *European Journal of Lipid Science and Technology* 112(8): 894-905.

Bouhaddouda N, Aouadi S, Labiod R . (2015). Evaluation of Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Methanolic Extract of *Origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* (Desf.) *Ietswaart* from Algeria . *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* . 8(1); 104-112

Bouhalouas I., (2018), Étude phytochimique, activités anti-oxydante et antimicrobienne des extraits aqueux des fruits mûrs et immatures de *Pistacia atlantica* de la station Oudjlida (Tlemcen). Mémoire de master, Université De Tlemcen. p12.

Boukhobza F, Goetz P, Quémoun AC, Lamendin H. (2018). *Phytothérapie en. odontologie*. 2e édition. Paris : Éditions CdP. 203.

Bourgoin. F. (2012). La contribution du stress oxydatif et de médiateurs inflammatoires dans les complications vasculaires, métaboliques et moléculaires induites chez le rat soumis à une alimentation riche en gras et en sucre, un modèle de résistance à l'insuline. Thèse de doctorat. Université Laval, Québec, 238 p.

Bouyahya A, Dakka N, Et-Touys A, Abrini J, Bakri Y. (2017) Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pac J Trop Med*. Aug;10(8):729-743. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.07.021. Epub 2017 Aug 19. PMID: 28942821.

Brahimi I et Terrai R., (2018), Évaluation de l'activité anti-oxydante des deux plantes *Rosmarinus officinalis* et *Curcuma longa*. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine 1.p22

Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosie, Phytochimie des Plantes Médicinales*. 3rd Edition, Revue et Augmentée, Tec & Doc, Paris.

Brightling, C. E., Symon, F. A., Birring, S. S., Bradding, P., Pavord, I. D., & Wardlaw, A. J. (2002). TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(6), 899-905. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.129698>

Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, Elsevier. 52: 302-310.

Buohashish HM, Khairy DA, Abdelsalam MM, Alsayyah A, Ahmed MM, Al-Rejaie SS. (2018). In-vivo assessment of the osteo-protective effects of eugenol in alveolar bone tissues. *Biomed Pharmacother*; 97: 1303-10.

Burtis C A, Ashwood E R, Bruns D E.(2006). *TIETZ Textbook of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics*. Elsevier Inc, 702-708.

C

Castaldo S.A., Freitas J.R., Conchinha N.V., Madureira P.A, (2016). The Tumorigenic Roles of the Cellular REDOX Regulatory Systems/Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016 ; 17 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8413032>.

Chagas, M. do S. S., Behrens, M. D., Moragas-Tellis, C. J., Penedo, G. X. M., Silva, A. R., Gonçalves-de-Albuquerque, C. F. (2022). Flavonols and Flavones as Potential anti Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, e9966750. <https://doi.org/10.1155/2022/9966750>

Chekchaki, N., Khaldi, T., Rouibah, Z., Rouag, M., Sekiou, O., Messarah, M., & Boumendjel, A. (2017). Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Two Extracts from *Pistacia lentiscus* in Liver and Erythrocytes, in an Experimental Model of Asthma. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 42(1), 77-84.

Chung K., Wong, T.Y., Wei, C., Huang, Y., Lin, Y. (1998). Tannins and human health. *Food Sci. Nutr, Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 421-464.

Cocoual M, Pascal DanthuP. (2018). « Le giroflier à Madagascar : essai d’histoire et de géographie coloniales, 1896-1958 », *Revue de géographie historique* [En ligne], 12 | .URL : <http://journals.openedition.org/geohist/1257> ; DOI : <https://doi.org/10.4000/geohist.1257>.

Comhair SA, Erzurum SC, (2010). Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 12:93–124.

Conde, E., Bertrand, R., Balbino, B., Bonnefoy, J., Stackowicz, J., Caillot, N., Colaone, F., Hamdi, S., Houmadi, R., Loste, A., Kamphuis, J. B. J., Huetz, F., Guilleminault, L., Gaudenzio, N., Mougel, A., Hardy, D., Snouwaert, J. N., Koller, B. H., Serra, V., ... Reber, L. L. (2021). Dual vaccination against IL-4 and IL-13 protects against chronic allergic asthma in mice. *Nature Communications*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22834-5>

Cortés-Rojas D, Fernandes de Souza C R, Pereira Oliveira W. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*) ; a precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed*. 4(2) : 90-96.

Csikós, E.; Csekő, K.; Kemény, Á.; Draskóczy, L.; Kereskai, L.; Kocsis, B.; Böszörményi, A. (2021); Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. *Molecules* , 26, 6387. <https://doi.org/10.3390/molecules26216387>

Csiszár J., Horváth E., Bela K., Gallé Á, (2016). Glutathione-Related Enzyme System: Glutathione Reductase (GR), Glutathione Transferases (GSTs) and Glutathione Peroxidases (GPXs)/Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses. 137-158

D

Daniel AN., CA Cuman, RK Sartoretto, SM Schimidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado. (2009). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Rev Bras Farmacogn*; 19 (1B): 212-217.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1), 23-38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)

Danthu P., Penot P, Mahafaka Ranoarison K, J, Rakotondravelo JC, Michel-Dounias I, Tiollier M, Michels T, Normand T, Azafi mamonjison G, Fawbush F, Jahiel M. (2014). The clove tree of Madagascar : a success story with an unpredictable future. *Bois et forêts des tropiques*, n° 320 (2) : 83-96.

De Almeida D A, Guirra Rosa S I, Dias da Cruz T C, Sabino Damazo E P A, Mendes Soares I, Ascêncio, S D, Macho A, s Tabajara de Oliveira Martins D. (2017). *Mandevilla longiflora* (Desf.) Pichon improves airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 200, P 51-59,

DELATTRE Jacques ; BEAUDEUX Jean-Louis ; BONNEFONT-ROUSSELOT Dominique (23 January 2007). *Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques* (broché). Lavoisier. ISBN 978-2-7430-1955-6.

Delavault M., (2013) (Page consultée le 13 Mai 2020), Séchage des clous de girofle, <https://communaute.geo.fr/photo/376671-sechage-clou-de-girofle>.

Disadila D., (2013). Etude de sensibilité de *Streptococcus mutans* aux extraits totaux de *Khaya nyasica*. Thèse de doctorat. Université de Lubumbashi (UNILU), p25.

Dorion G. (2005). Mécanismes et structures impliqués dans l'effet anti-inflammatoire et broncho-relaxant du 1,1 Diméthylphényl 1-4 Pipérazinium. Mémoire en médecine présenté à l'université Laval. Quebec.

Djaber, N., Khelef, Y., Ounaceur, L. S., Moubine, B. N., Rouag, M., Berrouague, S., Amara, H., Taibi, F., Boumendjel, M., Boumendjel, A., & Messarah, M. (2022). Oxidative stress induced by Roundup in rat liver and brain : Attenuation by zinc sulfate. *Comparative Clinical Pathology*, 31(3), 365-376. <https://doi.org/10.1007/s00580-022-03327-3>

Djaber, N., Ounaceur, L. S., Moubine, B. N., Khaldi, T., Rouag, M., Berrouague, S., Amara, H., Taibi, F., Boumendjel, M., Boumendjel, A., & Messarah, M. (2020). Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats : The ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil. *Acta Biochimica Polonica*, 67(1), Article 1. https://doi.org/10.18388/abp.2020_2898

Djemai Z., (2009). Étude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. mémoire de magister en biologie. Université -el hadj Lakhder Batna. p 8.

Djenidi H., (2019). Activité anti-oxydante anti radicalaire des aliments d'origine végétale consommés dans les régions de Biskra et Sétif, Université Ferhat Abbas Sétif 1,.

Duchaufour H., Razafimbelo T., Rakotoarisoa J., Ramamonjisoa B, Rakotondravao P. (2016), Recherche interdisciplinaire pour le développement durable et la biodiversité des espaces ruraux malgaches. Application a différentes thématiques de territoire. Actes du projet Fsp Parrure « Partenariat et Recherche dans le secteur Rural ». Antananarivo SCAC/PARRUR, Ed. MYE, 400 pages.

Droge, W. (2002).Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.

Dworski R. (2000). Oxidant stress in asthma. *Thorax.* (55) Suppl 2: S51-3.

E

Ekoumou C., (2003).Étude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat en pharmacie, université de Bamako, Mali, p47

El-Saber Batiha, Gaber, Amany Magdy Beshbishy, Amany El-Mleeh, Mohamed M. Abdel-Daim, and Hari Prasad Devkota. 2020. "Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, and Pharmacological and Toxicological Activities of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae)" *Biomolecules* 10, no. 3: 352. <https://doi.org/10.3390/biom10030352>

Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81-128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)

Estevão-Silva, C. F., Kummer, R., Fachini-Queiroz, F. C., Grespan, R., Nogueira de Melo, G. A., Baroni, S., Cuman, R. K. N., & Bersani-Amado, C. A. (2014). Anethole and eugenol reduce in vitro and in vivo leukocyte migration induced by fMLP, LTB4, and carrageenan. *Journal of Natural Medicines*, 68(3), 567-575. <https://doi.org/10.1007/s11418-014-0839-7>

Ezz-Eldin, Y. M., Aboseif, A. A., & Khalaf, M. M. (2020). Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats. *Life*

Sciences, 242, 117222. <https://doi.org/10.1016/j.jfs.2019.117222>

F

Faraja D., Gonelimali, Jiheng Lin, Wenhua Miao, Jinghu Xuan, Fedrick Charles , Meiling Chen, Shaimaa R Hatab, (2018), Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms, *Frontiers in Microbiology* 24 (9):1639 .

Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, p. 114-120). Academic Press.
[https://doi.org/10.1016/S00766879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S00766879(84)05015-1)

François E., (1936), Giroflier et girofle. *Revue de Botanique appliquée et d'Agriculture coloniale*, 16: 589-608 et 892-907.

G

Gaber SB., Alkazmi LM. , Lamiaa G. Wasef, Beshbishy AM , Eman H. Nadwa, Eman KR, (2020), *Syzygium Aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities, *Biomolecules*, 10, 1-17.

Gladwin M, Bagby M. (2018). *Clinical aspects of dental materials : theory, practice, and cases*. 5e édition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 523.

García, N., Zazueta, C., & Aguilera-Aguirre, L. (2017). Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, e5853238.
<https://doi.org/10.1155/2017/5853238>

Ghedadba N, Bousselsela L, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y. (2014). Évaluation de l'activité anti-oxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytoterapie*. 12(1) : 15-24.

Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. (2010.) *Syzygium aromaticum* (L.)Merr.&Perry(Myrtaceae)Giroflier. *Phytothérapie*. 8(1) : 37-43.

Giguère, A., Couillard, Y., Campbell, P. G. C., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B., & Pellerin, J. (2003). Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, 64(2), 185-200. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00052-3)

GINA : Global Initiative for Asthm. (2017) Global Strategy for Asthma Management and Prevention. <https://ginasthma.org/2017-gina/> Consulté (le 31 Mai 2022)

Gourgerot-Pocidalò M.A, El Benna J, Elbim C, Chollet-Martin S, Dang M.C. (2002) Régulation de l'explosion oxydative des polynucléaires neutrophiles humains par les cytokines pro- et anti-inflammatoires. *Journal de la Société de Biologie*, 196 (1), 37-46.

Guillon N. (2021). Vers un vaccin contre l'asthme allergique. *Pour la Science* N° 525 - 16.

Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. (2012.) Antioxidant activity of clove oil A powerful antioxidant source. *Arab J Chem*. 5(4):489-499.

Gruffat Xavier. (2021). Girofle Series Title: Herbal Medicine Back to the Future, DOI: [10.2174/97816810892251210501](https://doi.org/10.2174/97816810892251210501). Consulté (le 1 Mars 2022)

H

Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). "Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation." *Journal of biological Chemistry* 249(22): 7130-7139.

Hagerman Ann E. 2002. Hydrolyzable Tannin Structural Chemistry. *The Tannin Handbook*. 18.

Haioun A et Hamoudi FZ., (2015) Activité anti-oxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotectrice. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine, p 19.

Hamadou F et Touki S., (2017), Extraction, Caractérisation des huiles essentielles des épices : Girofle, Poivre Noir. Mémoire de master. Université Kasdi Merbah Ouargla, p 20.

Haji Abd Rahim Z, Begum Said Gulam Khan H. (2006). Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. Journal of Oral Science. 48(3): 117-123.

Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, et al. (2007). Le stress oxidant. Rev Med Liege, 62 (10), pp: 628-638.

Hassoun D, Moui A, Colas L, Blanc FX, Magnan A. (2019). Actualités physiopathologiques et thérapeutiques dans l'asthme sévère. Version of Record: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0248866319304412Manuscript_9e56837139cf5c551d6b1814985fb271. Consulté (le 5 Mars 2022)

Helmut Sies (22 October 2013). Oxidative Stress. Elsevier. pp. 219–222. ISBN 9781-4832-8911-3.

Haro-González J.N, Castillo-Herrera G.A , Martínez-Velázquez M,Espinosa-Andrews H. (2021). Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. Molecules. 26,6387.

Helyes, Z.; Horváth, (2022) ,G. *Pinus sylvestris* L. and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry Essential Oils Inhibit Endotoxin-Induced Airway Hyperreactivity despite Aggravated Inflammatory Mechanisms in Mice. *Molecules* 27, 3868. <https://doi.org/10.3390/molecules27123868>.

Hoffmann F, FranziskaM , I schmudde , L lewkowich , J kohl, P konig , Y laumonier. (2016). Origin Localization and Immunoregulatory Properties of Pulmonary Phagocytes in Allergic Asthma. Front Immunol, 7(107): 107.

Hould, R. (1984). "Methode de Fontana." Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Maloine, Paris.

Huang, X., Liu, Y., Lu, Y., & Ma, C. (2015). Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. *International Immunopharmacology*, 26(1), 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.026>

Huma Jafri, MohdSajjad Ahmad Khan, Iqbal Ahmad. (2019). efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*. 15;54:206-213. doi: 10.1016/j.phymed.2018.10.005. Consulté (le 5 Mars 2022)

Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation : What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, e7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>

I

Ilbert H., Hoxha V., Sahi L., Courivaud A., Chailan C. (2016.). Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. Montpellier : CIHEAM / France AgriMer, (Options Méditerranéennes, Série B : Études et Recherches, n. 73). p129

INSERM: L'institut national de la santé et de la recherche médicale. 2017. Asthme : Une inflammation chronique des bronches de mieux en mieux contrôlée. <https://www.inserm.fr/dossier/asthme>.

Institut national de la santé et de la recherche médicale. Asthme. Une inflammation chronique des bronches de mieux en mieux contrôlée. www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/asthme.

J

Jameel Kiki M. (2023). In Vitro Antiviral Potential, Antioxidant, and Chemical Composition of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil. *Molecules*.28, 2421.

Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem*;73:285–290.

Jiri S, Ryvolova M, Krystofova O, Salas P, Hubalek J, Vojtech A, Trnkova L, Havel L, Beklova M, Zehnalek J, Provaznik I and Kizek R., (2010). Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*. (15): 8618-8640.

Jollow, D., J. Mitchell, N. Zampaglione and J. Gillette (1974). "Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite." *Pharmacology* 11(3): 151-169.

Julkunen-Tiitto R (1985) Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agricult Food Chem* 33: 213–217.

K

Kabel A.M. (2014). Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition/*World Journal of Nutrition and Health*. 2 (3): 35-38. Doi: 10.12691/jnh-2-3-2.

Kamboj, S.S., Kumar, V., Kamboj, A. *et al.* (2008). Mitochondrial Oxidative Stress and Dysfunction in Rat Brain Induced by Carbofuran Exposure. *Cell Mol Neurobiol* **28**, 961–969 <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9270-5>

Karkosh A., (2012). Study of in vitro antibacterial activity of the essential oils of Cloves (*Syzygium aromaticum*) and the effect of temperature on antibacterial activity. *Euphrates Journal of Agriculture Science*, 4, 15-19.

Kaur, G., Athar, M., & Alam, M. S. (2010). Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 49(3), 290-301. <https://doi.org/10.1002/mc.20601>

Kayali, R., U. Çakatay, T. Akçay and T. Altuğ (2006). "Effect of alpha-lipoic acid supplementation on markers of protein oxidation in post-mitotic tissues of ageing rat." *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease* 24(1): 79-85.

Khalidi, T., Chekchaki, N., Boumendjel, M., Taibi, F., Abdellaoui, M., Messarah, M., & Boumendjel, A. (2018). Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. *Allergologia et Immunopathologia*, 46(5), 472-481. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.005>

Khalidi, T., Chekchaki, N., Rouibah, Z., Chouala, K., Cheniti, H., Boumendjel, M., Taibi, F., Messarah, M., & Boumendjel, A. (2022). *Protective effects of Nigella sativa Against Oxidative Stress and Cytotoxicity Induced by Smokeless Tobacco in an Allergic Asthma Model in Wistar Rats* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1473027/v1>

Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. (2021) The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*. Feb 4;10(2):165. doi: 10.3390/pathogens10020165. PMID: 33557078; PMCID: PMC7913839.

Kim H,M, Lee E,H, Hong S,H, Song H,J, Shin M,K, Kim S,H, Shin T,Y.(1997) Effect of *Syzygium Aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 60. 125-131.

Kim J,H , Seo C,S , Kim S,S, Ha, H. (2013). Simultaneous determination of gallic acid, ellagi, and eugenol in *Syzygium aromaticum* and verification of chemical antagonistic effect by the combination with *Curcuma aromatic* using regression analysis. *Journal of analytical methods in chemistry*. 1-7.

Kılıç, A., Ameli, A., Park, J.-A., Kho, A. T., Tantisira, K., Santolini, M., Cheng, F., Mitchel, J. A., McGill, M., O'Sullivan, M. J., De Marzio, M., Sharma, A., Randell, S. H., Drazen, J. M., Fredberg, J. J., & Weiss, S. T. (2020). Mechanical forces induce an asthma gene signature in healthy airway epithelial cells. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57755-8>

Kirkham P, et Rahman I. (2006). Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology and Therapeutics*, 111, pp: 476-94.

Krim M. (2014), L'importance des anti-oxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats. Thèse de doctorat Université Badji Mokhtar Annaba, p33.

Kulusic, T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85(4): 633–640.

Kurokawa M., Hozumi T, Basnet P, Nakano M, Kadota S, Namba T. (1998). Purification and characterization of eugenin as an anti-herpesvirus compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. *J Pharmacol Exp Ther*; 284(2): 728-735.

L

L'Association pulmonaire du Québec. (2022) L'asthme. <https://poumonquebec.ca/maladies/asthme/> consulté le 10 Mars 2022.

Ladhar-Chaabouni, R., Gargouri, R., & Hamza Chaffai, A. (2007). Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus* : Metallothionein quantification using two techniques. *International Journal of Environment and Pollution*, 30(3-4), 593-605.
<https://doi.org/10.1504/IJEP.2007.014831>

Lancet. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 396(10258):1204-22 – <https://www.thelancet.com/gbd/summaries>

Langer, H. F., & Chavakis, T. (2009). Leukocyte – endothelial interactions in inflammation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(7), 1211-1220. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00811.x>

Lambrecht BN, Hammad H. (2015). The immunology of asthma. *Nat Immunol.* 16(1): 45-56.

Lambrecht BN, Hammad H. (2017). The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat. Immunol.* 18, 1076–1083.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in Enzymology* (Vol. 186, p. 464-478). Academic Press.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)

Li H., Lee BK, Kim JS, Jung SJ, Oh SB. (2008). Eugenol inhibits ATP-induced P2X currents in trigeminal ganglion neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*; 12(6): 315-32.

Lim TK., (2014). *Syzygium aromaticum* Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. Springer Dordrecht Heidelberg New York London, vol 8 (460-482),

Lu C., (2012), Analyse micro électrochimique du stress oxydant à l'échelle de la cellule unique. Application aux cellules cancéreuses du sein. Thèse de doctorat physicochimique analytique. Université Pierre et marie curie. Paris, p 130.

Luzina, I. G., Keegan, A. D., Heller, N. M., Rook, G. A. W., Shea-Donohue, T., & Atamas, S. P. (2012). Regulation of inflammation by interleukin-4 : A review of “alternatives”. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(4), 753-764. <https://doi.org/10.1189/jlb.0412214>

M

Madore A-M, Laprise C. (2010). Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *Journal of Asthma and Allergy*, 3: 107-121.

Maistre J., (1964). Le clou de Girofle. In *Les plantes à épices*. G.-P. Maisonneuve & Larose Editeur, Paris. 77-124.

Mantik S, Lewis, Heitkemper M, Drisken S, Bucher L. Soins infirmiers, France (2011) Groupe de Boeck ; pp 2905.

Mandal M.A. (2012). Systèmes Anti-oxydants d'Enzymes /DM.News-Medical.net - An AZoNetwork Site.Owned and operated by AZoNetwork .

Martínez-Herrera A, Pozos-Guillén A, Ruiz-Rodríguez S, Garrocho-Rangel A, Vértiz-Hernández A, Escobar-García DM. (2016). Effect of 4-Allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene (Eugenol) on Inflammatory and Apoptosis Processes in Dental Pulp Fibroblasts. MediatorsInflamm. 9371403-9371403.

Marjana Radünz, Maria Luiza Martins da Trindade, Taiane Mota Camargo, André Luiz Radünz, Caroline Dellinghausen Borges, Eliezer Avila Gandra, Elizabete Helbig, (2019). Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil, Food Chemistry, Volume 276, Pages 180-186, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.173>.

Massoud A, Rezaei N. (2013). Immunology of Aging. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg pp: 309-321.

Mateos R, Espartero J L, Trujillo M, Rios J J, Leon-Camacho M, Alcudia F, Cert A. 2001. Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin OliveOils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. J Agric. Food Chemistry. 49(5):2185-2192.

Medfouni R, Hafsi N et Mazouz W., (2018), Contribution à l'étude phytochimique et les activités biologiques d'une plante médicinale *Syzygium aromaticum*. Mémoire de master. Université Oum El Bouaghi, p36.

Memmu F., (2015), synthèse, études cinétiques et évaluation de l'activité de dérivés de l'eugenol .composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle, Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, p12.

Merr. & L.M.Perry., (2019) the chemical and pharmacological basis of cloves (*Syzygium*

aromaticum (L.) as potential therapy for type 2 diabetes and associated diseases. 29 (4):2170-2193.

Mesaros N., P. Nordmann , P. Plésiat , M. Roussel-Delvallez , J. Van Eldere⁵ , Y. Glupczynski , Y. Van , F. Jacobs⁸ , P. Lebecque , A. Malfroot, P.M. Tulkens , F. Van Bambeke. (2007). Pseudomonas Aeruginosa : Résistance et Options Thérapeutiques à L'aube du deuxième Millénaire, Antibiotiques 126, 8 : 305-316.

Mishra, R. K., & Singh, S. K. (2016). Biphasic effect of *Syzygium aromaticum* flower bud on reproductive physiology of male mice. *Andrologia*, 48(9), 1011-1020. <https://doi.org/10.1111/and.12533>

Mitaal M, Gupta N, Parashar P, Mehra V, Khatri M. (2014). Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium Aromaticum* : a comprehensive review. Int J Pharm Sci 6(8): 67-72.

Mohamad T. Abdelrahman, Esther N. Maina, Hany A. Elshemy, (2018). Clove (*Syzygium aromaticum*) and honey extracts significantly reduce inflammatory cytokines and liver function enzymes in experimental rats fed on carbon tetrachloride (CCl₄), Journal of Radiation Research and Applied Sciences, Volume 11, Issue 4, Pages 416-422,, <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2018.08.003>.

Moradi E, Rakhshandeh H, Rahimi Baradaran V, Ghadiri M, Hasanpour M, Iranshahi M, Askari VR (2023). HPLC/MS characterization of *Syzygium aromaticum* L. and evaluation of its effects on peritoneal adhesion: Investigating the role of inflammatory cytokines, oxidative factors, and fibrosis and angiogenesis biomarkers. *Physiol Rep*. Jan;11(2):e15584. doi: 10.14814/phy2.15584

Mordor intelligence, 2023. Analyse de la taille et de la part du marché des clous de girofle - Tendances et prévisions de croissance (2023 - 2028) Source: <https://www.mordorintelligence.com/fr/industry-reports/global-clove-market>.

N

Nassan MA., Mohamed EH, Abdelhafez S, Ismail TA. (2015). Effect of clove and cinnamon extracts on experimental model of acute hematogenous pyelonephritis in albino rats: Immunopathological and antimicrobial study, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 28(1) 60–68.

Nejad SM, Özgünes H, Nursen Basaran. (2017) .Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turk J Pharm Sci.* 14(2): 201.

Nur Husna SM, Md Shukri N, Mohd Ashari NS, Wong KK (2022). IL-4/IL-13 axis as therapeutic targets in allergic rhinitis and asthma. *PeerJ.* May 30;10:e13444. doi: 10.7717/peerj.13444.

O

Oberholzer, H. M., & Pretorius, E. (2009). Investigating lung remodeling in Modul8®-treated BALB/c asthmatic animals. *Micron*, 40(8), 775-782.

<https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.07.008>

Ohkubo T., Shibata M., (1997), The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J Dent Res*; 76(4): 848-851.

Omodanisi E.I., Aboua Y.G., Oguntibeju O. (2017). Assessment of the Anti-Hyperglycaemic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Moringa Oleifera* in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats/*Molecules*. 22(4). Doi: 10.3390/molecules22040439

Ortega VE, Genese F. (2019). Asthme. Le Manuel MSD <https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/troubles-pulmonaires-et-des-voies-aeriennes/asthme/asthme>. Consulté (le 20 Février 2022) sheets/detail/asthma. (Consulté le 2 Juin 2022)

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Simons, A. (2009). Agroforestry Database : A tree reference and selection guide. Version 4. *Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide. Version 4*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20177200441>

Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R L. (2001). Development And Validation Of An Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein As The Fluorescent Probe. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. (49): 4619-4626.

Ounaceur , L. S., Bouacha , M., Taguida , O., Djaber , N., Messarah , M., & Boumendjel , A. (2023). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Aqueous Extract of *Syzygium aromaticum* (Clove) from Indonesia. *UTTAR PRADESH JOURNAL OF ZOOLOGY*, 44(21), 178–191. <https://doi.org/10.56557/upjoz/2023/v44i213686>

Ourahmane N., (2012), Contribution, l'étude de l'activité antimicrobienne de quelques extraits végétaux. Mémoire de master. Université Abou-Bakr-Belkaid Tlemcen, p33.

P

Pan, C., & Dong, Z. (2015). Antiasthmatic Effects of Eugenol in a Mouse Model of Allergic Asthma by Regulation of Vitamin D3 Upregulated Protein 1/NF-κB Pathway. *Inflammation*, 38(4), 1385-1393. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0110-8>

Paoli A et Strugala A, (2011), Rapport de phytochimie : extraction de l'eugénol dans le clou de girofle, dosage UV et CPG, Université de Strasbourg, 6 pages

Parle M, Khanna D, (2011) CLOVE: A Champion Spice, *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. 2 (1) 47-54.

Patlevič, P., Vašková, J., Švorc, P., Vaško, L., & Švorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integrative Medicine Research*, 5(4), 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.07.004>

Pourmorad F, Hosseinimehr S J, Shahabimajid N. (2006).Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 5 (11) :1142-1145.

Pratt D E. (1980) Natural antioxidants of soybean and other oil-seeds. In M.G.Simic and M.Karel (Eds.), Autoxidation in food and biological system. New York: Plenum Press: 283-292.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. Anal. Biochem. 269(2) :337-341.

Prior RL., WU X., Schaich K., (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Agric. Food Chem. (53): 4290-4302.

Prudhomme C. Mémento Pneumologie, Paris (2008). Jean-François d'Ivernois ; pp 89.
Phytothérapie, 2019 (Page consultée le 04 Juillet 2020), Plantes Naturelle d'Afrique Contre La Drépanocytose, <https://www.dawasante.net/pages/articles-scientifiques/plantes-drepanocytose.html>.

Psotova J., Lasovsky J et Vicar J, (2003). Metal chelating properties, electrochemical behavior scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. Biomed. Papers 174-153 p.

R

Rahal, K. (2008). Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Échelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 5ème édition, éd Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Algérie p 58

Rahim, Z. H. A., & Khan, H. B. S. G. (2006). Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of

<I>Streptococcus mutans</I>. *Journal of Oral Science*, 48(3), 117-123.

<https://doi.org/10.2334/josnusd.48.117>

Rahman I, MacNee W. (1999). Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 277(6): 1067.

Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981-990.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>

Razafimamonjison G. (2018). Pour l'optimisation de la qualité des produits du giroflier de Madagascar (clous et huiles essentielles): Etude des facteurs de leur variabilité.

<https://www.forets-biodiv.org>. Consulté le 5 Février 2022.

Contag CH. (2017). Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 214, 1249–1258.

Re R, Pellegrini N, Proteggenete A, Pannala A, Yang M. et Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation the colorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Renauld, J.-C. (2001). New insights into the role of cytokines in asthma. *Journal of Clinical Pathology*, 54(8), 577-589. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.8.577>

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer : How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603-1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, Abdennour C, Boumendjel A, Messarah M. (2020). Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. *African Health Sciences* .Vol 20:413-425.

Rouibah Z, Ben Mansour A, Rekik O, Boumendjel M, Taibi F, Bouaziz M, El Feki A, Messarah M, Boumendjel A. (2019). Chemical composition, antioxidant activities, in an allergic asthma model, of *Olea europaea* L. leaf extracts from Collo (Skikda, Algeria). *Drug and chemical toxicology*.1-12.

Rouibah, Z., Ben Mensour, A., Rekik, O., Boumendjel, M., Taibi, F., Bouaziz, M., El Feki, A., Messarah, M., & Boumendjel, A. (2022). Chemical composition, antioxidant activities, in an allergic asthma model, of *Olea europaea* L. leaf extracts from Collo (Skikda, Algeria).

Drug and Chemical Toxicology, 45(1), 197-208.

<https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1679827>

Bowler RP (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of asthma. *Current allergy and asthma reports*, 4, pp:116 -122.

S

Saadat, S., Mohamadian Roshan, N., Aslani, M. R., & Boskabady, M. H. (2020). Rosuvastatin suppresses cytokine production and lung inflammation in asthmatic, hyperlipidemic and asthmatic-hyperlipidemic rat models. *Cytokine*, 128, 154993.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.154993>

Said M M. (2011). The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 25(6),708-716.

Salama, Abeer & Zaki, Hala & Elshenawy, Siham & EL-Denshary, & Ismaiel, Ismaiel & Sh, Nermeen. (2012). Effects of Fish oil and Dexamethasone in Experimentally-Induced Bronchial Asthma. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 6. 497-506.

Salehipour Z, Haghmorad D, Sankian M, Rastin M, Nosratabadi R, Dallal M M S, Tabasi N, Khazae M, Nasiraii L R, Mahmoudi M. (2017). *Bifidobacterium animalis* in combination with human origin of *Lactobacillus plantarum* ameliorate neuroinflammation in experimental model of multiple sclerosis by altering CD4+ T cell subset balance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1535-1548,

Sahiner U. M, Birben E, Erzurum S, et al. (2011). Oxidative stress in asthma. WAO Journal, 4, pp: 151-158.

Sekiou O, Boumendjel M, Taibi F, Tichati L, Boumendjel A, Messarah M. (2020). Nephroprotective effect of Artemisia herba alba aqueous extract in alloxan-induced diabetic rats. Journal of Traditional and Complementary Medicine.1-9.

Servais S. (2004). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, 128 p.

Sethi S., Aparna D, B. Lal G, Saksham G (2013) Antimicrobial activity of spices against isolated food borne pathogens. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5: 260–262.

Shan B, Cai Y Z, Sun M, Corke H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. J Agric Food Chem. 53(20): 7749-7759.

Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions / *Journal of Botany*. 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>.

Site internet de l'OMS concernant l'asthme : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs206/fr/>

Shukri, R.; Mohamed, S.; Mustapha, N.M, (2010) .Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. Food Chem. 122, 1116–1121.

Sook Cho Y, et Moon H.B. (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma. Allergy Asthma Immunol Res, 2(3), pp: 183-87.

Socasau C. (2017). Les huiles essentielles référencées à l'Agence Européenne du Médicament. Sciences pharmaceutiques. dumas-01719690.

Slama K, Boumendjel M, Taibi F, Boumendjel A, Messarah M. (2018). Atriplex halimus aqueous extract abrogates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by modulating biochemical and histological changes in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*.1-12.

Sofia P., K. Prasad R, VijayVK, Srivastava, A. K. (2007). Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common food borne pathogens. *Int. J Food Sci. Technol.*, 42(8): 910-915.

Stone, M. J. (2017). Regulation of Chemokine–Receptor Interactions and Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), Article 11.

<https://doi.org/10.3390/ijms18112415>

Suantawee, T., Wesarachanon, K., Anantsuphasak, K., Daenphetploy, T., Thien-Ngern, S., Thilavech, T., Pasukamonset, P., Ngamukote, S., & Adisakwattana, S. (2014). Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1452-1>

Suzuki, A., Leland, P., Joshi, B. H., & Puri, R. K. (2015). Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine*, 75(1), 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.026>

therapeutic targets in allergic rhinitis and asthma. *PeerJ* 10:e13444
<http://doi.org/10.7717/peerj.13444>

T

Taillé C, Garcia G. (2019). Asthme de l'adulte : peut-on espérer une vie sans corticoïdes? *Presse Med*;48:252—4.

Thannickal, V. J. ; Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol.* 279 : L1005-L1028 .

Thomson D., (2004). *Healthcare T. PDR for herbal medicines*. 4th ed. Montvale: Healthcare. P 446.

V

Vergely C., Rochette L. (2003). Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire/médecine thérapeutique cardiologique. 1 (1).

Vitali, L.A., Beghelli, D., Biapa Nya, P.C. (2016). Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermum ammi*. *Arabian J Chem*, 9(6): 775-786.

Von Andrian, U. H., Chambers, J. D., McEvoy, L. M., Bargatze, R. F., Arfors, K. E., & Butcher, E. C. (1991). Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation : Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17), 7538-7542. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7538>

W

Who, (2020). Assessing national capacity for the prevention and control of non communicable diseases: report of the 2019 global survey. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO – <https://www.who.int/teams/ncds/surveillance/monitoring-capacity/ncdccc> .

X

Xue Q, Xiang Z, Wang S, Cong Z, Gao P and Liu X (2022). Recent advances in nutritional composition, phytochemistry, bioactive, and potential applications of *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae). *Frontiers in Nutrition*. 9:1002147. doi: 10.3389/fnut.2022.1002147

Y

Yermakov A I, Arasimov V V, Yarosh N P. (1987). Methods of biochemical analysis of plants. Yogalakshmi, B., Viswanathan, P., & Anuradha, C. V. (2010). Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 268(3), 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.018>

Z

Zari, A., Alfarteesh, H., Buckner, C., & Lafrenie, R. (2021). Treatment with *Uncaria tomentosa* Promotes Apoptosis in B16-BL6 Mouse Melanoma Cells and Inhibits the Growth of B16-BL6 Tumours. *Molecules*, 26(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules26041066>

Zari AT, Hakeem KR. (2021). Anticancer Properties of Eugenol: A Review. *Molecules*. 6;26(23):7407. doi: 10.3390/molecules26237407. PMID: 34885992; PMCID: PMC8659182. Consulté (le 5 Février 2022).

Zemmouri H, Ammar S, Boumendjel A, Messarah M, El Feki A, Bouaziz M.(2014) .Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L. leaf extract growing in Algeria. *Arabian Journal of Chemistry*.1-10.

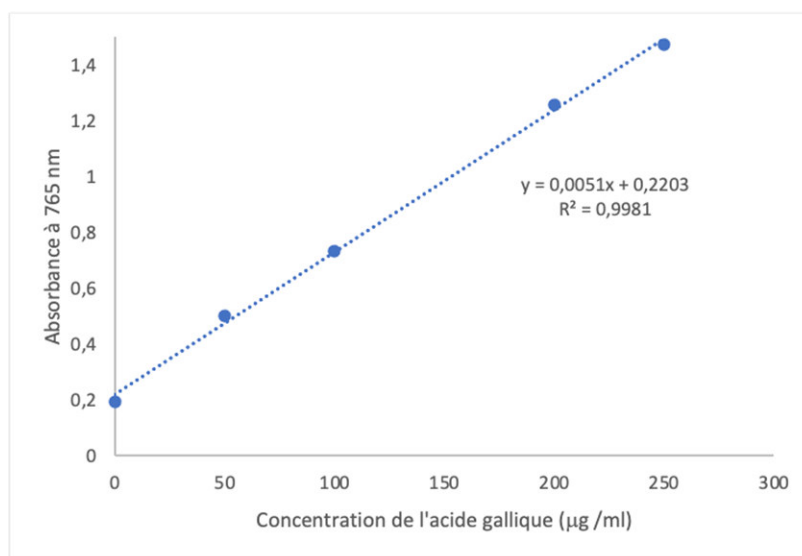
Zemmouri, H., Sekiou, O., Ammar, S., El Feki, A., Bouaziz, M., Messarah, M., & Boumendjel, A. (2017). *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1561-1568. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310905>

Zhao J.J, Shimizu Y, Dobashi K, et al. (2008). The relationship between oxidative stress and acid stress in adult patients with mild asthma. *J Investig Allergol ClinImmunol*, 18 (1), pp: 41-45.

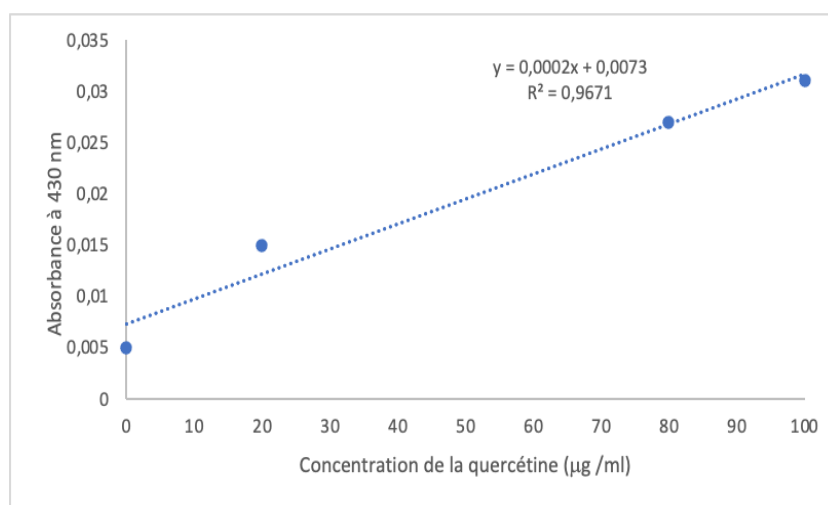
Zhishen, J., T. Mengcheng and W. Jianming (1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals." *Food chemistry* 64(4): 555-559.

ANNEXES

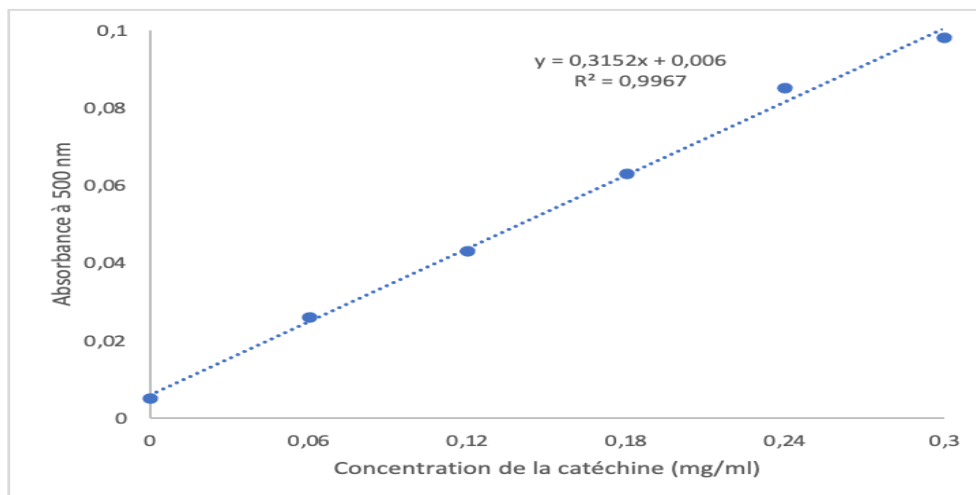
ANNEXES



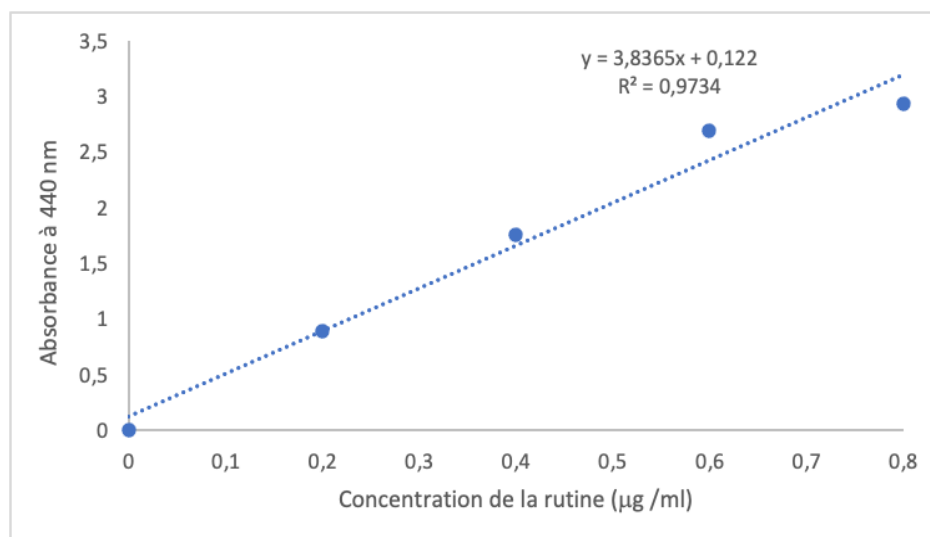
Annexe 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.



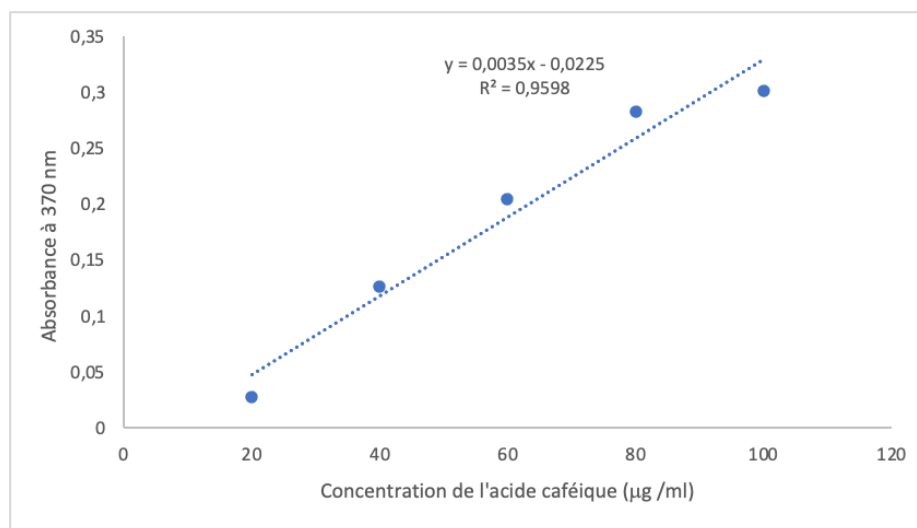
Annexe 02 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine pour le dosage des flavonoïdes.



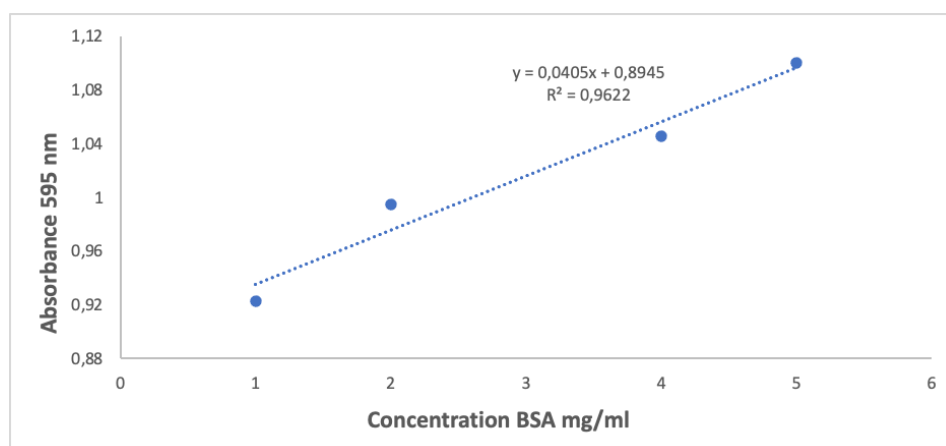
Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.



Annexe 04 : Courbe d'étalonnage de la rutine pour le dosage des flavonols



Annexe 05 : Courbe d'étalonnage de l'acide caféique pour le dosage des ortho-diphénols.



Annexe 06 : Courbe d'étalonnage de BSA pour le dosage des protéines

Annexe 07 : Composition de l'aliment pour 1 kilogramme de nourriture (ONAB, Bejaia)

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Calcaire	9	0.9
Cellulose	10	1.0
Minéraux	10	1.0
Vitamines	10	1.0

Annexe 8 : Préparation des solutions (ELISA)

Les concentrés de tampon doivent être amenés à température ambiante et doivent être dilués avant de commencer le dosage. Si des cristaux se sont formés dans les concentrés de tampon, réchauffez-les doucement jusqu'à ce qu'ils soient complètement dissous.

1/ Le tampon de lavage (1x) :

- Verser tout le contenu (50 ml) du concentré de tampon de lavage (20x) dans une éprouvette graduée propre de 1 litre.
 - Amener au volume final de 1000 ml avec de l'eau distillée.
 - Mélanger doucement pour éviter la formation de mousse.
 - Transférer dans un flacon propre (soigneusement étiqueté) et conserver entre 2° et 25°C.
- Veuillez noter que le tampon de lavage (1x) est stable pendant 30 jours.

2/ Le tampon de dosage (1x) :

- Verser la totalité du contenu (5 ml) du concentré de tampon de dosage (20x) dans une éprouvette graduée propre de 100 ml.
- Amener au volume final de 100 ml avec de l'eau distillée.
- Mélanger doucement pour éviter la formation de mousse.
- Transférer dans un flacon propre (soigneusement étiqueté) et conserver entre 2° et 8°C. Veuillez noter que le tampon de dosage (1x) est stable pendant 30 jours.

3/ Préparation de la solution d'anticorps biotinylé anti-IL4

Faire une dilution 1:100 de la solution concentrée de biotine-conjugué avec le tampon de dosage (1x) dans un tube en plastique propre selon le tableau suivant :

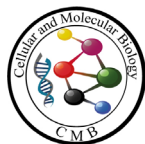
Number of Strips	Biotin-Conjugate (ml)	Assay Buffer (1x) (ml)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

4/ Préparation de la solution de streptavidine-HRP

Faites une dilution 1:200 de la solution concentrée de Streptavidine-HRP avec le tampon de dosage (1x) dans un tube en plastique propre selon le tableau suivant :

Number of Strips	Streptavidin-HRP (ml)	Assay Buffer (1x) (ml)
1 - 6	0.03	5.97
1 - 12	0.06	11.94

*ACTIVITÉS ET
PRODUCTIONS
SCIENTIFIQUES*



Original Article

In vivo determination of the anti-inflammatory and antioxidant effects of the aqueous extract of *Syzygium aromaticum* (clove) in an asthmatic rat model

Lynda Sabrina Ounaceur^{1*}, Nesrine Djaber¹, Anis Ounaceur², Latifa Atoui¹, Khadidja Belkacem Djefjel¹, Sonia Boudjil¹, Zohir Garri¹, Hanene Ghadab¹, Djihane Touaibia¹, Abdelaziz Lankar³, Mahfoud Messarah¹, Amel Boumendjel¹

¹ Biochemistry and Environmental Toxicology Laboratory, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, Algeria

² Ibn-Sina Hospital, Annaba, Algeria

³ Clinique Belle vue Elyza, Anato-pathology Department, Annaba, Algeria

Article Info

Abstract



Article history:

Received: November 14, 2023

Accepted: February 17, 2024

Published: March 31, 2024

Use your device to scan and read the article online



Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways strongly associated with interleukin-4 (IL-4), a cytokine that mediates and regulates various immune responses, including allergic reactions. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antioxidant effects of an Aqueous Extract of Clove (AEC) *Syzygium aromaticum* on the lungs and erythrocytes of an experimental asthma model in Wistar rats. For this purpose, four groups of male rats were examined: control, sensitized with ovalbumin (OVA), treated with AEC, and treated with a combination of OVA/AEC. After treatment, the antioxidant effect was determined by measuring the malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), and catalase (CAT) levels. The anti-inflammatory effect was determined by measuring IL-4 levels by performing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using serum, lung, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples. A significant reduction ($p \leq 0.05$) in the MDA levels and a significant increase ($p \leq 0.05$) in the levels of GPx and CAT were observed in the lungs of rats treated with cloves. However, no statistically significant variation was observed in GSH levels. In erythrocytes, no statistically significant differences were observed between the experimental batches. Regarding the anti-inflammatory effect, the administration of *S. aromaticum* extract to sensitized rats resulted in a recovery in the levels of total proteins and IL-4 and a decrease in the three compartments studied (lungs, serum, and bronchoalveolar liquid). These results were confirmed by microscopic examination of lung histological sections. Overall, these findings confirmed that the AEC has anti-inflammatory and antioxidant effects.

Keywords: Anti-inflammatory, Antioxidant, Catalase (CAT), Glutathione (GSH), Glutathione peroxidase (GPx), Interleukin-4 (IL-4), Malondialdehyde (MDA), *Syzygium aromaticum*.

1. Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by bronchial hyper-reactivity caused by environmental and genetic factors [1]. Air passages in the lungs become narrow due to inflammation and tightening of the muscles around the small airways. The development of inflammation following the action of mediators can lead to an imbalance between the levels of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants, resulting in oxidative stress. On the other hand, increased expression and secretion of ROS due to the activation of inflammatory cells may, in turn, lead to the further generation of inflammatory mediators that damage cells. Owing to the chronic nature of asthma and its increasing prevalence, as well as the reputed ineffectiveness of the drugs currently used to treat asthma and the fear of their known side effects, there is a pressing need to find new therapies [2]. Various spices and herbal remedies have been used in traditional medicine and healthcare for the effective prevention

of asthma [3]. These natural remedies are a rich source of bioactive compounds and have significant biomedical properties, including antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, antidiabetic, and anticancer properties, which help fight various diseases in humans [3]. Many medicinal plants exhibit interesting biological and pharmacological activities and are used as therapeutic agents. Clove is an example of such a plant, whose dried flower buds are used for therapeutic purposes. This plant, also known as *Syzygium aromaticum*, is a member of the Myrtaceae family that grows in tropical areas [4]. Clove stands out among other spices owing to its powerful therapeutic properties that are useful for pharmaceutical applications, namely, anti-inflammatory and antioxidant properties [5]. Owing to its specific properties, clove is the most commonly used spice in traditional medicine and is closely associated with the reinforcement of the immune system as it increases resistance to diseases [4]. Cloves also play an important role in inhibiting various degenerative diseases. This role is

* Corresponding author.

E-mail address: lynda.s.ounaceur@gmail.com (L. S. Ounaceur).

Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2024.70.3.5>

attributed to the presence of various chemical constituents with antioxidant activities in high concentrations [5].

In the present study, we analyzed the preventive and ameliorative effects of an aqueous extract of the plant *S. aromaticum* in a rat model of allergic asthma. The effects on the lungs and serum were studied to examine the therapeutic effects (namely, antioxidant and anti-asthmatic) of *S. aromaticum*.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials

The flower buds of cloves (*S. aromaticum*; pink in color), previously dried in the sun to a dark color (brown color), were imported from Indonesia. These cloves were purchased from an herbal shop located in the city of Annaba and powdered using an electric grinder.

2.2. Preparation of the Aqueous Extract of Clove (AEC)

The plant was initially placed in water to obtain the AEC following the method described by Rahim & Khan [6], with some modifications. The plant powder (8 g) was suspended in 50 mL of distilled water and mixed using a stirrer with a magnetic bar overnight. The next day, the homogenate was filtered through Whatman No.1 paper and stored at 4 °C for later use.

2.3. Animals

We procured 28 Wistar albino male rats from the Pasteur Institute in Algeria for the experiments. The rats were aged between 6 and 8 weeks and weighed between 150 and 180 g. All protocols used in this study were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethical Committee of the Directorate General for Scientific Research and Technological Development of the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (under number's project PRFU:D01N01UN230120200008). The animals were acclimated for 2 weeks under similar laboratory conditions, including similar photoperiod, an average relative humidity of 60 %, and a room temperature of 25 ± 2 °C. Food (standard food, supplied by National Livestock Feed Office of Bejaia, Algeria) and water were available *ad libitum*. The rats in all batches were weighed daily to evaluate variations in body weight during the experimental period.

2.4. Experimental group design

The rats were distributed into four groups of seven (n = 7) males that received the following treatments: the first group (no. 1) served as a control (T), the second group (no. 2) was sensitized to ovalbumin (OVA), the third group (no. 3; AEC) was treated with aqueous clove extract (15 mg/kg body weight/day by gavage) [7], and the fourth group (no. 4; OVA + AEC) was sensitized to OVA and treated with AEC (15 mg/kg body weight).

2.5. Sensitization and aerosol exposure

On day 1, the rat groups (no. 2 and 4) were sensitized by administering intraperitoneal injections of 200 µg/mL OVA (grade II; cat. no. A5253-250G; Sigma-Aldrich) that was adsorbed to 10 mg/mL aluminum hydroxide (Al[OH]₃) dissolved in 1 mL phosphate-buffered saline (PBS), and the sensitization was boosted on days 2, 3, and 11 [8]. On days 20, 21, and 22, after the initial sensitization, the rat

airways were exposed to OVA (2 % w/v, in 0.9 % saline solution) for 20 min using a nebulizer with an unheated compressor (Rossmax) [9]. The last aerosol exposure was performed 24 h before the end of the experiment. The control animal groups (no. 1 and 3) were sensitized and exposed to similar volumes of saline solution (0.9 %) at the same times and under the same conditions (Figure 1).

2.6. Preparation of erythrocytes and lung homogenates

The rats were sacrificed 24 h after the final aerosol challenge. The lungs were quickly removed, washed in 0.9 % NaCl solution, weighed, and then 1 g of the sample was homogenized in 2 mL of TBS (Tris, 50 mM; NaCl, 150 mM; pH 7.4) under ice-cold conditions. The homogenates were centrifuged at 3,500 × g for 35 min at 4 °C. The hemolysates and tissue supernatants were then aliquoted and stored at -20 °C for later use [10]. After centrifugation, the blood sediment contained erythrocytes, which were suspended twice in PBS (pH 7.4) and centrifuged at 3,000 × g for 15 min at 4 °C for the first washing and at 4,000 × g for 30 min at 4 °C for the second washing. The blood samples were immediately collected in ice-cold polypropylene tubes (tubes with EDTA anticoagulant and dry tubes). The dry tubes were centrifuged first at 3,000 × g for 30 min at 4 °C. At the end, these tubes contained blood sediments and erythrocytes were present in this sediment after centrifugation. These erythrocytes were suspended twice in PBS (pH 7.4) and centrifuged at 3,000 × g for 15 min at 4 °C for the first washing and at 4,000 × g for 30 min at 4 °C for the second washing. The collected serum was used for the determination of total proteins, and the sediment (containing erythrocytes) was stored at -20 °C until it could be used for the determination of oxidative stress parameters. The second tube containing an anticoagulant (EDTA), was used to determine the number of white blood cells in the samples [11].

2.7. Bronchoalveolar lavage

The tracheae were cannulated, and the airway lumina was washed with 2 mL of PBS. This procedure was repeated three times before the lavage fluid was pooled in Eppendorf tubes and centrifuged at 4,000 × g for 10 min.

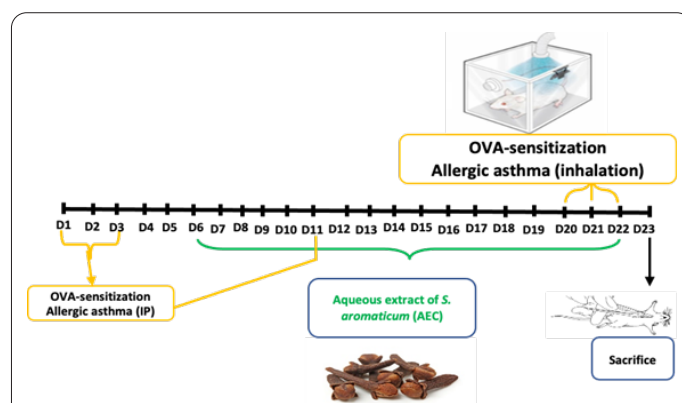


Fig. 1. Representation of the overall experimental protocol showing peritoneal injection and inhalation awareness days (in yellow) and days of force-feeding with the plant extract for 17 days (in green; aqueous plant extract, AEC). Three ovalbumin (OVA) injections (IP) were administered on days 1, 2, 3, and 11. AEC was administered from days 6 to 22 after the third injection. On days 20, 21, and 22, the animals were exposed to aerosolized OVA or saline. After 24 h, the rats were sacrificed.

The Eppendorf tubes containing bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples were stored at -20 °C prior to use for interleukin-4 (IL-4) and total protein measurements [12,13].

2.8. Protein assays

Protein concentrations in the supernatants of the lung, erythrocyte, and BALF samples were determined using the Bradford colorimetric method. Absorbance was measured spectrophotometrically at 595 nm using bovine serum albumin as a standard [12].

2.9. Estimation of lipid peroxidation levels (malondialdehyde)

This assay is based on the condensation of malondialdehyde (MDA) with hot thiobarbituric acid (TBA) in an acidic medium, according to the method described by Esterbauer *et al.* [14]. This reaction results in the formation of a colored product (pink pigment), which can be measured (quantified) by absorption spectrophotometry at 530 nm. The supernatant (375 mL) was homogenized with 150 mL of TBS and 375 μ L of trichloroacetic acid–butylhydroxytoluene (TCA-BHT) to precipitate the proteins and then centrifuged (1,000 \times g, 10 min, and 4 °C). Subsequently, 400 mL of the obtained supernatant was mixed with 80 μ L of HCl (0.6 M) and 320 mL of TBA dissolved in Tris. The mixture was then incubated at 80 °C for 10 min. The absorbance of the resulting supernatant was measured at 530 nm. Next, the amount of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) was calculated using an extinction coefficient of $1.56 \text{ \AA} \times 10^5 \text{ M/cm}$ and expressed as nmol MDA/mg of protein. This assay was performed using lung tissues and erythrocytes [15].

2.10. Reduced glutathione levels

The reduction in glutathione (GSH) content in the lung and erythrocyte homogenates was determined using a colorimetric technique described by Ellman [16] and modified by Jollow and others [17], which is based on measurement of the optical absorbance at 412 nm, as it indicates the reduction of DTNB (5,5'-dithiobis-[2-nitrobenzoic acid]) by the -SH groups of glutathione. Total GSH content was expressed as nmol GSH/mg protein [18].

2.11. Estimation of antioxidant enzymes (glutathione peroxidase and catalase) activities

The glutathione peroxidase (GPx; E.C.1.11.1.9) activity in the lung and erythrocyte samples was measured using the method described by Flohé and Günzler [19], which is based on the reduction of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the presence of reduced GSH. The absorbance of each sample was recorded at 420 nm. Specific GPx activity was

expressed as mmol GSH/mg protein [18].

The catalase (CAT; E.C.1.11.1.6) activity was measured using the Aebi method [20]. This assay is based on the ability of the enzyme to degrade hydrogen peroxide, followed by a decrease in absorbance at 240 nm that is measured using UV/visible light for 1 min. The CAT activity was expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumed/min/mg protein [18].

2.12. Determination of protein carbonyl groups

The protein carbonyl groups in the lungs were analyzed using the protocol described by Levine *et al.* [21]. This method is based on derivatization of the carbonyl group with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). This led to the formation of a stable 2,4-dinitrophenyl (DNP) hydrazone. Absorbance was measured spectrophotometrically at 370 nm.

2.13. Interleukin-4 (IL-4) measurement

The IL-4 levels in lung, serum, and BALF samples were measured using the Invitrogen Rat IL-4 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Invitrogen RET: BMS 628; lot no.:176569000) following the manufacturer's protocol. The optical density was measured at 450 nm (Lecteur Mindray MR-96A, Socimed Sarl, France). The concentration of IL-4 was determined by interpolation from a standard curve, with all data expressed in pg/mL.

2.14. Histopathological examination

The lung samples from each group were fixed in 10 % formaldehyde. They were dehydrated using a series of increasing alcohol concentrations (70–100 %; Leica TP1020 tissue processor, Leica Biosystems, United States) and embedded in paraffin. The lung tissues were cut into 5- μm -thick slices using a microtome, deparaffinized, stained with hematoxylin and eosin, and examined using a Leica DM1000 LED microscope.

2.15. Statistical analysis

The results are expressed in the form of mean plus or minus standard error (mean \pm SEM) for seven rats in each group. Statistical evaluation was performed using Student's t-test (Excel 2010), and the statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Variation in hematological parameters

Regarding white blood cell levels, the results revealed a significant increase ($p \leq 0.01$) in levels in the sensitized rats (OVA) and a highly significant increase ($p \leq 0.001$) in levels in the batch treated with the plant extract (AEC) compared to that in control rats (Table 1); the rates of in-

Table 1. Variation of hematological parameters such as white blood cells in the experimental groups.

Parameters	Control	OVA	AEC	OVA + AEC
WBC ($\times 10^9$)/L	7,44 \pm 0,80	8,98 \pm 1,47(**)	8,43 \pm 0,34(***)	8,20 \pm 0,79
Lymphocytes ($\times 10^9$)/L	3,78 \pm 0,57	4,50 \pm 0,36(**)	3,97 \pm 0,49	4,03 \pm 1,58
Monocytes ($\times 10^9$)/L	0,48 \pm 0,13	1,04 \pm 0,11(***)	1,10 \pm 0,08(***)	0,73 \pm 0,12(*)###
Granulocytes ($\times 10^9$)/L	2,66 \pm 0,53	3,78 \pm 1,53	3,37 \pm 0,39	2,70 \pm 0,56
RBC ($\times 10^{12}$)/L	7,24 \pm 0,31	7,07 \pm 0,30(*)	7,39 \pm 0,60	6,95 \pm 0,19

Values are given as means \pm standard errors (SEMs) for groups of four animals each. Significant difference: results of aqueous extract (AEC), ovalbumin (OVA), and OVA + AEC groups compared to that of the control group (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$), and that of AEC and AEC + OVA groups compared to that of the OVA group (# $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$). WBC= White blood cells. RBC = Red blood cells.

crease were 20.7 and 13.24 %, respectively. Moreover, a significant increase (19.21 %; $p \leq 0.01$) was observed in the levels of lymphocytes in the blood of rats sensitized to OVA compared to that in control rats. The results showed a reduction in the number of white blood cells and lymphocytes in the batch sensitized and treated with the AEC compared with that in the batch sensitized only with OVA. Regarding monocyte levels, we observed a highly significant increase ($p \leq 0.001$) in the batches treated with the plant extract (AEC) and sensitized (OVA), and a significant increase ($p \leq 0.05$) in the batch sensitized with OVA and treated with the plant extract (OVA/AEC) compared to that in the control batch, and a highly significant reduction ($p \leq 0.01$) in the batch sensitized with OVA and treated with the AEC compared to that the batch sensitized with OVA only. Regarding red blood cell levels, a significant decrease ($p \leq 0.05$) was observed in the batch sensitized with OVA compared to that in the control batch. No statistically significant variation in the level of granulocytes was observed among the batches.

3.2. Variation of total proteins in serum and bronchoalveolar lavage fluid

The total protein content in serum and BALF samples of the rats in different experimental groups was determined. Figure 2 shows the results obtained. Regarding total serum protein levels, an increase was observed in rats sensitized to OVA and in healthy rats treated with AEC compared with that in the control group, and a decrease was observed in rats sensitized to OVA and treated with AEC (OVA + AEC). Statistical analysis revealed no significant differences. Regarding total protein levels in BALF samples, a significant increase ($p \leq 0.05$) was observed in

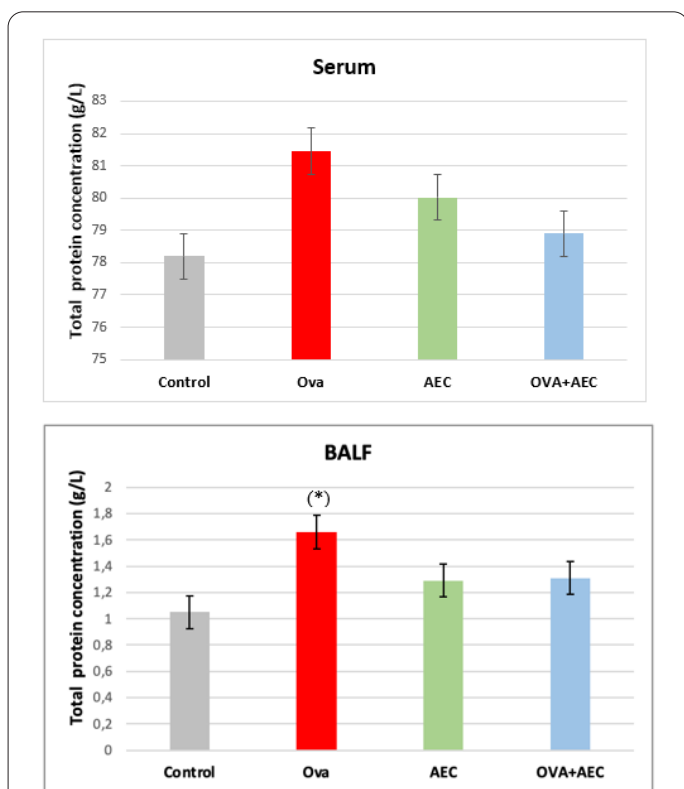


Fig. 2. Variation in total protein levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in control and OVA- or AEC-treated rats. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ compared to the results for control rats; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, and ### $p \leq 0.001$ compared to the results for ovalbumin-sensitized rats.

rats of the OVA batch compared to that in control rats; in rats from the healthy group treated with AEC, the levels were higher than that in the control group and lower than that in OVA-sensitized rats. Statistical analysis revealed no statistically significant differences.

3.3. Variation in interleukin-4 (IL-4) levels

Serum IL-4 levels were higher in the sensitized (OVA) and plant-treated (AEC) groups than those in the control group (Figure 3). However, administration of AEC led to an increase in IL-4 levels in the group sensitized to OVA. Statistical analysis revealed no statistically significant differences. The levels of IL-4 in the lungs showed a significant increase ($p \leq 0.05$) in the batches of rats treated with the plant (AEC) and those sensitized to OVA compared to that in the control batch, whereas a significant decrease ($p \leq 0.05$) in IL-4 levels was observed in rats sensitized to OVA and treated with AEC (OVA + AEC) compared with that in rats sensitized to OVA only. IL-4 levels in the BALF samples increased in the OVA and AEC groups

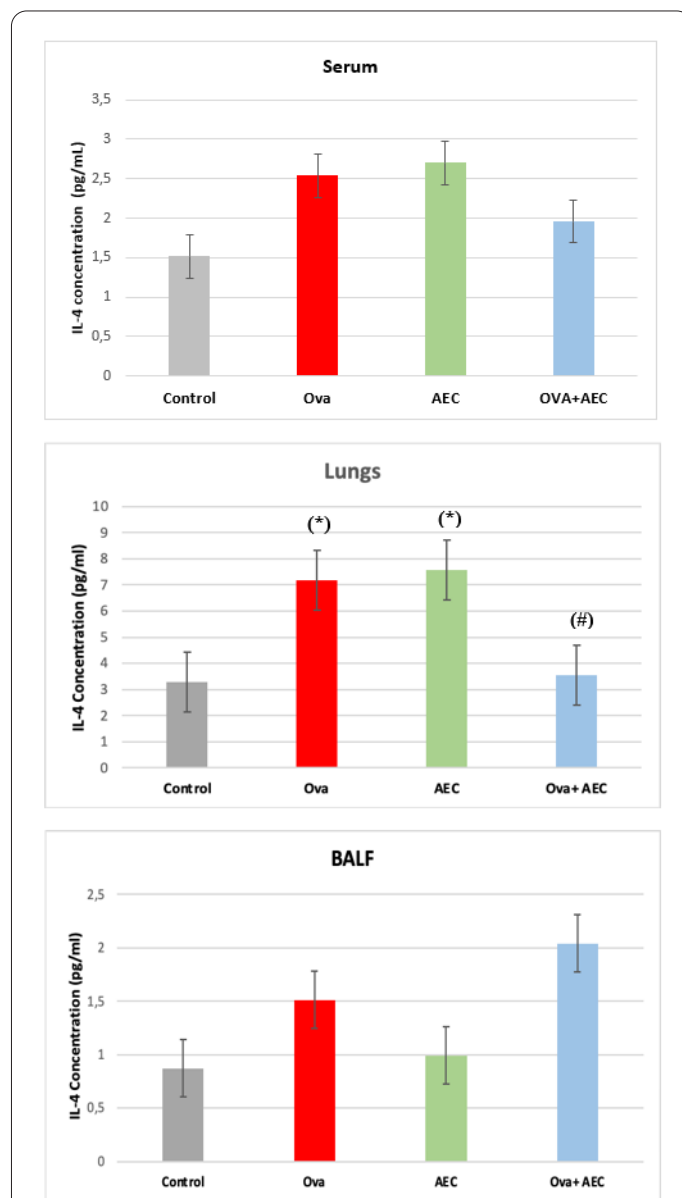


Fig. 3. Variation in interleukin-4 (IL-4) levels in serum, lung, and BALF samples from rats in the four batches. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ compared to the results for control rats; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, and ### $p \leq 0.001$ compared to the results for ovalbumin-sensitized rats.

compared to that in the control group, and the levels also increased in the OVA + AEC group compared to that in the OVA group. Statistical analysis revealed no statistically significant differences.

3.4. Variation in oxidative stress parameters of lungs

The MDA level was determined as the first parameter. A significant increase ($p \leq 0.001$) in MDA levels in the lungs was observed in rats sensitized to OVA compared to that in control rats. On the other hand, a significant reduction ($p \leq 0.05$) in MDA levels was observed in rats treated with a combination of ovalbumin plus *S. aromaticum* extract (OVA + AEC) compared to that in control rats, indicating recovery of the OVA + AEC-treated rats (Table 2). Significant and highly significant variations in MDA levels were also observed in the batch treated with *S. aromaticum* extract (AEC) compared to those in the control and OVA-sensitized rats, respectively.

Treatment of rats with OVA led to a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the cellular content of reduced glutathione (GSH) in the lungs compared to that in control rats; the GSH levels also decreased in rats treated with *S. aromaticum* extract (AEC) compared to that in control rats (Table 2). However, no statistically significant variation was observed in the GSH levels in the lungs of rats treated with the combination of ovalbumin and *S. aromaticum* extract (OVA + AEC) compared to that in rats treated with OVA alone (Table 2).

Regarding GPx activity, sensitization of rats to OVA caused a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the GPx activity in the lungs of these rats. Recovery was characterized by a statistically significant increase in the GPx activity in the lungs after treatment with *S. aromaticum* extract (AEC) (Table 2).

Regarding the CAT activity, the results obtained show that the CAT activity significantly decreased ($p \leq 0.05$) in the lungs of rats treated with OVA compared to that in control rats. No statistically significant change in CAT activity was observed in the lungs of *S. aromaticum* extract (AEC)-treated rats compared to that in control rats. On the

other hand, a significant increase ($p \leq 0.05$) in CAT activity was observed in the lungs of rats treated with the combination of ovalbumin and *S. aromaticum* extract (OVA + AEC) compared to that in the group treated with OVA alone, indicating recovery of CAT activity in OVA + AEC-treated rats.

In the lungs, protein carbonyl levels (PC) showed a significant increase ($p \leq 0.05$) in the OVA- and AEC-treated groups compared to those in the control group (Table 2). However, the administration of AEC significantly decreased ($p \leq 0.05$) the PC levels in the OVA + AEC group compared to that in the OVA group, suggesting an improvement in the OVA + AEC group. The levels of PC in the lungs showed a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the AEC group compared to that in the OVA group.

3.5. Variation of oxidative stress parameters in erythrocytes

A highly significant increase ($p \leq 0.01$) in the MDA levels was observed in the OVA + AEC-treated rats compared with that in the rats sensitized to OVA. Moreover, the MDA levels in the OVA batch were higher than those in the control batch. The AEC-treated batch produced the highest dosage of MDA compared with that produced by the other batches.

The GSH levels significantly decreased in rats sensitized to OVA and healthy rats treated with AEC only compared with that observed in the control group. Unlike in the batches of rats sensitized to OVA and then treated with AEC, a considerable increase in GSH levels was observed in the OVA+AEC group compared to that in the control group (Table 3). Regarding GPx activity in erythrocytes, the level of GPx activity decreased in the OVA-sensitized batch compared to that in the control batch (Table 3). A significant increase in the enzymatic activity of GPx was also observed in the healthy group treated only with AEC compared to that in the group sensitized to ovalbumin. The batch of rats sensitized to OVA and then treated with the plant extract (OVA + AEC) also showed an increase in the level of GPx activity compared with that in the batch of

Table 2. Effects of treatments on certain antioxidative defence status parameters of lungs, in the experimental groups.

Parameters	Control	OVA	AEC	OVA + AEC
MDA (nmol/mg prot)	0.20 ± 0.11	0.59 ± 0.08 (***)	0.55 ± 0.15 (**)(#)	0.49 ± 0.18 (*)
GSH (µmol/mg prot)	0.25 ± 0.17	0.19 ± 0.06	0.10 ± 0.07	0.17 ± 0.08
GPx (µmol GSH/mg prot)	0.47 ± 0.01	0.4 ± 0.28	0.11 ± 0.08	0.21 ± 0.17
CAT (µmol H ₂ O ₂ /mg prot)	126.60	80.83	37.84	88.29
Protein carbonyl groups (µmol/mg prot)	32.36 ± 7.96	46.99 ± 3.41 (*)	41.30 ± 0.73 (#)	34.62 ± 8.90 (#)

Values are given as mean ± SEM for groups of four animals each. Significant difference: results of AEC, OVA, and OVA + AEC groups compared to those of the control group (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$), and results of AEC and AEC + OVA groups compared to those of the OVA group (# $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$).

Table 3. Effect of treatments on certain antioxidative defence status parameters of erythrocytes, in the experimental groups.

Parameters	Control	OVA	AEC	OVA + AEC
MDA (nmol/mg prot)	0.04 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02 (##)
GSH (µmol/mg prot)	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.03
GPx (µmol GSH/mg prot)	3.21 ± 2.83	3.78 ± 1.51	1.05 ± 0.55	3.46 ± 3.58
CAT (µmol H ₂ O ₂ /mg prot)	39.55	52.20	16.33	35.14

Values are given as mean ± SEM for groups of four animals each. Significant difference: results of AEC, OVA, and OVA + AEC groups compared to those of the control group (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$), and results of AEC and AEC + OVA groups compared to those of the OVA group (# $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$).

rats sensitized to ovalbumin.

The results in Table 3 show no statistically significant differences between the results obtained for different experimental batches. Nevertheless, the most significant variations were characterized, as for the other parameters of oxidative stress, by a reduction in the levels of CAT in rats sensitized to ovalbumin compared to that in the control group. An increase in CAT levels was observed in rats sensitized to OVA and treated with the plant extract (OVA + AEC), as well as in rats treated only with AEC, compared to that in the control group.

3.6. Effect on histological changes of lungs

Microscopic observation of sections of the lung samples of control rats showed normal lung architecture. As shown in Figure 4-C, alveolar bags (red arrow) were observed, and the walls of the bronchioles (blue arrow) possessed normal epithelium. Similar results were observed using the histological sections of lungs of the batch treated with AEC only. However, in the OVA batch suffering from asthma, significant cellular infiltration (red arrow) was observed, as illustrated in Figure 4-OVA (A). In addition, edema and a thick epithelium (black arrow) with a few centers of hemorrhage were observed, and mucus and inflammatory cells were present in the lumen of bronchioles (white arrow; Figure 4-OVA (B)).

Regarding the observations of the histological sections of lungs of rats sensitized to OVA and treated with the AEC (Figure 4-OVA + AEC), we observed signs of histological correction with minimal infiltration, a reduction or absence of inflammatory cells in the lumen of the bronchioles (red arrow), and a reduction in the thickness of the epithelium (blue arrow).

4. Discussion

Asthma is a public health issue that affects more than 300 million people worldwide. Its pathophysiology is based on chronic inflammation, leading to airflow limitation and airway remodeling, resulting in specific symptoms (dyspnea, cough, and chest discomfort) [22]. It manifests as a severe airway disorder caused by various triggers (such as allergies, smoking, and air pollution). This disorder begins with airway obstruction, airway muscle spasms, inflammatory wheezing, and dyspnea [23]. In the absence of a curative treatment, the long-term objective of the therapeutic strategy for asthma is to control various symptoms. Traditional remedies serve as the basis for modern medicine because of their effectiveness, low cost, and fewer side effects than those of drugs [24].

Some compounds are capable of modulating oxidative stress and contributing to the reduction of inflammatory mediators as anti-inflammatory agents [25]. Examples of these bioactive components include the main constituents of cloves (*S. aromaticum*), namely, flavonoids, β -caryophyllene, and essential oils (eugenol) [26]. The extract of *S. aromaticum* is used in the pharmaceutical field owing to its analgesic, antimicrobial, antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic properties [26]. The highly antioxidant and antimicrobial properties of the AEC (*S. aromaticum*) were elucidated in our previous study [27], where high values were obtained for the antioxidant activity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [DPPH], 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid [ABTS], and β -carotene tests). Antimicrobial tests conducted using

the AEC have shown zones of remarkably high degree of inhibition and sensitivity for gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and gram-positive strains of bacteria (*Staphylococcus aureus*) [27].

Although asthma is a heterogeneous disease comprising various phenotypes, approximately half of the patients with asthma develop type 2 inflammation, characterized on the one hand, by the presence of eosinophilic granulocytes in the airways, and on the other hand, by high levels of immunoglobulin E (IgE) class antibodies (produced by plasma cells) and Th2-type cytokines, such as IL-13, IL-5, and IL-4 [22]. IL-4 is considered to play a key role in asthma because it is associated with the differentiation of immune cells during allergic inflammation [23]. First, among these important roles, IL-4 allows the regulation of the expression of certain molecules present in mast cells, basophils, monocytes, macrophages, and B cells. Examples of these molecules are high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI) and major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. Second, the IL-4 cytokine makes it possible to generate other pro-allergic cytokines, such as IL-5 and IL-13, via Th2 cells in patients with allergic diseases. Finally, IL-4 allows the migration of Th2 cells and eosinophils toward the inflamed site. It also allows the development of myeloid dendritic cells (mDCs) [23].

With regard to the variations in the levels of IL-4 in the different groups in our study, our results indicated an increase in the levels of IL-4 in the AEC group compared to that in the control group. This can be attributed to the toxicity of eugenol, which is widely known for its antiseptic, anti-inflammatory, and antitumor properties. However, some degree of toxicity may be present depending on the concentrations used and the histology of the organ explored [28]. Eugenol is considered as an allergenic component by some authors [29]. Eugenol is known for its allergenic properties, particularly in the field of cosmetics. As such,

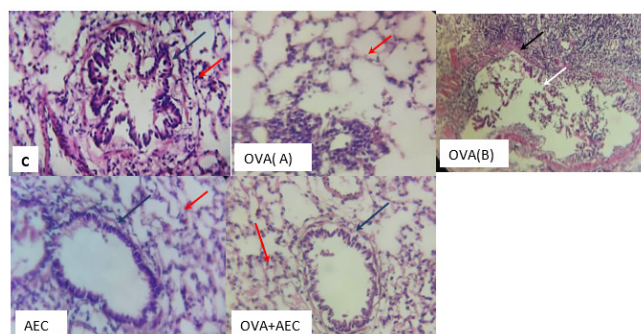


Fig. 4. Microphotographies of histological sections of lung tissue stained with hematoxylin-eosin ($\times 40$). (C) Lung of a control rat representing a normal structure of the lungs (alveolar bags : red arrow ; bronchioles : blue arrow (possessed normal epithelium)) ; (OVA) Lung of a rat sensitized to ovalbumin, showing the inflammatory infiltration in the form of significant cellular infiltration (red arrow) (OVA-A), which results in the apparent accumulation of eosinophils and other lymphocytes in the lumen of the bronchiole (black arrow) (OVA-B); (AEC) Normal lung of a rat treated with clove extract (normal alveolar bags : red arrow ; normal bronchioles : blue arrow); (OVA + AEC) Lung of a rat sensitized to ovalbumin and treated with AEC shows signs of histological correction with minimal infiltration, a reduction or absence of inflammatory cells in the lumen of the bronchioles (red arrow), and a reduction in the thickness of the epithelium (blue arrow).

it is on the list of 26 substances included in Annex III of the European Directive 76/768/EEC1 because of its sensitizing potential in humans (AFSSAPS, 2010). In addition, in this study, an increase in IL-4 levels was observed in the three compartments studied, which was also observed in the OVA-sensitized batch. In the lungs, the increase in IL-4 levels can be explained by an increase in the number of Th2 lymphocytes activated in the pulmonary alveoli [30, 31].

Several studies have shown that Th2 lymphocytes play an important role in the onset and progression of allergic diseases, including asthma, by releasing IL-4 [32, 33]. In contrast, treatment of sensitized rats with the AEC reduced the concentration of IL-4 in the serum and lungs. Our results corroborate those of the study by Pan and Dong [34], who used an experimental model of allergic asthma induced by ovalbumin (OVA) to demonstrate that the administration of eugenol inhibits eosinophilia induced by OVA in the lung tissue, prevents increases in IL-4 and IL-5 levels, and inhibits the nuclear factor kappa B (NF- κ B) signalling pathway. According to these authors, a reduction in the inflammatory response plays a central role in the anti-asthmatic effects of eugenol [30, 34].

In patients with asthma, airway inflammation develops because of the action of inflammatory mediators, which can lead to an imbalance between ROS and antioxidants, leading to oxidative stress. However, increased expression and secretion of ROS due to the activation of inflammatory cells may, in turn, lead to the further generation of inflammatory mediators, which damage epithelial cells and increase bronchial hyperreactivity [2]. Oxidative stress reflects an imbalance between defensive and aggressive biological systems mediated by the excessive production of reactive oxygen, oxygen species (ROS), hydroxyl radicals (OH), and H₂O₂ (hydrogen peroxide). Under these conditions, the organism loses its antioxidant ability, which is neutralization of the excessive production of ROS [35]. This failure results in toxic effects and alterations in the normal redox state, which are associated with cellular damage and lipid peroxidation [25]. With regard to the phenomenon of inflammation, during these processes, a large amount of ROS is produced in the damaged inflammatory tissues. In these damaged tissues, the signaling pathway for the production of inflammatory mediators, such as proinflammatory cytokines and chemokines, is stimulated, resulting in inflammatory cell migration [36]. In fact, in order to counter the dysregulation induced by oxidative stress, the body has a whole arsenal of enzymes such as superoxide dismutase (SOD), CAT, and GPx and endogenous antioxidants (GSH) that help fight against this aggression [18]. These are considered the first line of defence against oxidative damage and the compounds eugenol, eugenyl acetate, and β -caryophyllene appear to play a key role in this process [37]. The antioxidant activity of these compounds is attributed to their capacity to protect cells from free-radical oxidation. Clove possesses radical scavenging activity and inhibits lipid peroxidation. Indeed, this capacity comes from the presence of eugenol, which contains a hydroxyl group (responsible for its antioxidant activity). The presence of phenolic compounds (such as eugenol) allows the transfer of electrons or hydrogen atoms and neutralization of free radicals, resulting in blockage of the oxidative process [37].

Regarding the biochemical profile of eugenol, a pre-

vious study confirmed that its antioxidant activity is associated with its anti-inflammatory activity [25]. Another study [38] showed that pre-treatment of rats with eugenol for 15 days resulted in a decrease in the lipid peroxidation (LPO) indices, protein oxidation, and inflammatory marker levels (reduction in the expression levels of cyclooxygenase-2 [COX-2], tumor necrosis factor-alpha [TNF- α], and IL-6) and improved the antioxidant status by maintaining the levels of antioxidants such as GPx and CAT. These results concerning the antioxidant effects are consistent with those observed in our study. Indeed, the levels of GPx and CAT decreased in the lungs and erythrocytes of the batch of asthmatic rats treated with the plant extract compared with those in the untreated OVA batch. Kaur *et al.* [39] confirmed the antioxidant and anti-inflammatory effects of eugenol in albino mice after pre-treatment. In fact, eugenol pretreatment is not only effective in reducing inflammation caused by lung exposure to lipopolysaccharides (LPSs), but also enhances the levels of SOD, CAT, GPx, and GST. Eugenol can be used as an anti-inflammatory agent to protect against the damage caused by oxidative stress [40].

Oxidative damage to DNA, lipids, and proteins induced by pesticides or inflammatory diseases is a consequence of ROS production [18]. ROS are free radicals produced by mitochondria during normal aerobic metabolism [41]. However, excessive production of ROS and/or a decrease in the cellular capacity to promote an effective antioxidant leads to the initiation of oxidative stress [42]. In this study, the effect of ROS on biological membranes was analyzed by measuring the level of MDA using spectrophotometry. MDA is a biomarker of oxidative stress that can be used to determine the degree of lipid peroxidation LPO in cell membranes following a foreign attack [43,44]. Indeed, as shown by our results regarding the amounts of MDA and GSH (Table 2), in the batch treated with the AEC, we observed a significant reduction ($p \leq 0.01$) in MDA levels and a significant increase ($p \leq 0.05$) in GSH levels. These results can be explained by the potential ameliorative effects of eugenol on organ structure and function [45]. Thus, eugenol reduces organ damage by reducing the levels of inflammatory mediators and modulating the redox status [45].

Flavonoids, the second most essential component of the plant *S. aromaticum*, belong to the non-enzymatic antioxidant system because they confine ROS [46]. This process protects against oxidative injury, particularly because of the structural properties of some secondary flavonoid metabolites. Among these structural properties, plant stress tolerance is important [47].

An additional parameter used to determine the antioxidant effect of the plant is protein carbonyl group content. The protein carbonyl group is more stable in the form of oxidized proteins than lipid peroxidation products [48]. Protein carbonyl content is the most common indicator and most commonly used marker of protein oxidation [49], and the accumulation of these compounds has been found in several human diseases (such as airway inflammation, oxidative lung injury, and Alzheimer's disease) [12]. The protein carbonyl levels in the lungs showed a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the OVA + AEC group compared to that in the OVA group, whereas the levels showed a significant increase ($p \leq 0.05$) in the OVA + AEC group compared to that in the control group. This result

shows that the AEC prevented oxidation-induced protein damage by decreasing protein carbonyl formation and protecting against the loss of protein thiol groups [50]. These results prove that the polyphenols found in the AEC (one of the components of the plant that confers antioxidant ability) were capable of inhibiting protein oxidation [50]. Regarding variations in the inflammatory response triggered by OVA treatment, a significant increase in total leukocyte counts was observed in OVA-sensitized rats. Therefore, the involvement of leukocytes in the local and general inflammatory processes is confirmed. Indeed, an intense recruitment of cells from the bloodstream occurs during the inflammatory process. This “homing” phenomenon involves the expression of ligands on the surface of vascular endothelial cells and on circulating leukocytes. They are then attracted to the inflammatory site by chemokines and cytokines released in the vicinity of the inflamed tissue and enter the site by diapedesis [51, 52].

The white blood cell and lymphocyte counts in the OVA + AEC groups increased compared with those in the OVA group. The anti-inflammatory effect of eugenol, the main bioactive molecule in cloves, on the migration of leukocytes has been studied using different stimuli such as N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), leukotriene B4 (LTB4), and carrageenan. The polymorphonuclear (PMN) cell recruitment to the inflammatory site occurs as a function of a complex response involving interactions between endothelium and leukocytes [53]. Estevão-Silva and colleagues [54] demonstrated that eugenol significantly decreases leukocyte migration in vitro and in vivo in response to chemotactic factors by modulating rolling and adhesion of leukocytes to the perivascular tissue.

In the present study, a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the number of red blood cells was observed in the batch sensitized to ovalbumin. These results also seem to be in agreement with the findings of Suzuki *et al.* [55], who observed an alteration in iron levels (iron is used in the synthesis of hemoglobin) under conditions of acute inflammation and a decrease in the level of blood hemoglobin.

Biochemical analysis of the levels of total proteins in the serum and BALF showed that the batches treated with the aqueous extract of cloves did not show any significant variation in levels compared to that in the control batch. The results (Figure 2) showed an increase in the concentrations of total proteins in the serum and BALF in the OVA group. In the OVA + AEC group (sensitized to ovalbumin and treated with the aqueous extract), a decrease in the concentrations of total proteins in the serum and BALF was observed, and the values reached close to those of the control group. These results agree with those obtained in the study by Haro-Gonzalez *et al.* [37], which showed that cloves exerted a protective effect against biochemical changes in proteins.

Considering that proteins are organic compounds distributed widely in the body and function as structural and transport elements [56], the increase in total protein levels reflects the increase in levels of inflammatory mediators and is, therefore, considered a biomarker of pulmonary inflammation caused by OVA [56]. However, administration of the aqueous extract of cloves considerably reduced the levels of inflammatory mediators. This may have been due to the inhibitory effects of eugenol. Indeed, Pan and Dong [34] demonstrated that eugenol has the ability to

decrease the levels of the following proteins: IL-4, IL-5, inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (P-I κ B α), and p-NF- κ BP65. Thus, studies have shown that eugenol can negatively regulate inflammation by inhibiting the release of inflammatory mediators (proteins in nature) by macrophages [57].

All the previously obtained results corroborate those of the present histopathological study of the lungs. Indeed, in asthmatic rats (OVA batch), infiltration of granulocytes, neutrophils, and macrophages was associated with the occurrence of perivascular and peribronchial edema, as shown in Figure 4 (black, white, and red arrows) [58]. Most of these inflammatory cells are composed of lymphocytes and eosinophils and are mainly located around the small bronchi, bronchioles, and blood vessels. In addition to the infiltration of these cells, edema is also present [13]. However, treatment with the aqueous extracts of the *S. aromaticum* plant helped in reducing alveolar edema by decreasing pulmonary inflammation and reducing the concentrations of inflammatory cells and their infiltration into the lumen of the bronchioles [58]. In this regard, it is necessary to measure the effects of other medicinal plants [59-61].

5. Conclusion

Two important elements were validated through these results: the first concerns the relationship and link between allergic asthma (via ovalbumin sensitization) and the increase in the levels of IL-4 and oxidative stress parameters in lungs. The second point involved confirmation of the anti-inflammatory and antioxidant benefits of cloves (*S. aromaticum*) against asthmatic pathology.

Conflict of interest

Authors have declared that no competing interests exist.

Consent for publication

The authors read and approved the final manuscript for publication.

Ethics approval and consent to participate

No human or animals were used in the present research.

Informed consent

The authors declare that no patients were used in this study.

Availability of data and materials

All data generated during this study are included in this published article.

Author's contribution

Boumendjel Amel and Messarah Mahfoud contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Ounaceur Lynda Sabrina, Djaber Nesrine, Latifa Atoui, Khadidja Belkacem Djefjel, Sonia Boudjil, Zohir Garri, Hanene Ghadab and Djihane Touaibia. The first draft of the manuscript was written by Ounaceur Lynda Sabrina and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

None.

References

- Kılıç A, Ameli A, Park JA, Kho AT, Tantisira K, Santolini M, *et al* (2020) Mechanical forces induce an asthma gene signature in healthy airway epithelial cells. *Sci Rep* 10:966. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57755-8>
- Aldakheel FM, Thomas PS, Bourke JE, Matheson MC, Dharmage SC, Lowe AJ (2016) Relationships between adult asthma and oxidative stress markers and pH in exhaled breath condensate: A systematic review. *Allergy* 71:741-57. <https://doi.org/10.1111/all.12865>
- Xue Q, Xiang Z, Wang S, Cong Z, Gao P, Liu X (2022) Recent advances in nutritional composition, phytochemistry, bioactive, and potential applications of *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae). *Front Nutr* 9:1002147. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1002147>
- Kiki MJ (2023) In vitro antiviral potential, antioxidant, and chemical composition of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil. *Molecules* 28:2421. <https://doi.org/10.3390/molecules28062421>
- Batiha GE, Alkazmi LM, Wasef LG, Beshbishy AM, Nadwa EH, Rashwan EK (2020) *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules* 10(2):202. <https://doi.org/10.3390/biom10020202>
- Rahim ZHA, Khan HBSG (2006) Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *J Oral Sci* 48: 117-23. <https://doi.org/10.2334/josnusd.48.117>
- Mishra RK, Singh SK (2016) Biphasic effect of *Syzygium aromaticum* flower bud on reproductive physiology of male mice. *Andrologia* 48: 923-32. <https://doi.org/10.1111/and.12533>
- Ezz-Eldin YM, Aboseif AA, Khalaf MM (2020) Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats. *Life Sci* 242: 117222. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117222>
- Saadat S, Mohamadian Roshan N, Aslani MR, Boskabady MH (2020) Rosuvastatin suppresses cytokine production and lung inflammation in asthmatic, hyperlipidemic and asthmatic-hyperlipidemic rat models. *Cytokine* 128: 154993. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.154993>
- Rouibah Z, Ben Mensour A, Rekik O, Boumendjel M, Taibi F, Bouaziz M, *et al* (2022). Chemical composition, antioxidant activities, in an allergic asthma model, of *Olea europaea* L. leaf extracts from Collo (Skikda, Algeria). *Drug Chem Toxicol* 45: 197-208. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1679827>
- Chekchaki N, Khaldi T, Rouibah Z, Rouag M, Sekiou O, Messarah M, *et al* (2017) Anti-inflammatory and antioxidant effects of two extracts from *Pistacia lentiscus* in liver and erythrocytes, in an experimental model of asthma. *Int J Pharm Sci Rev Res* 42: 77-84.
- Khaldi T, Chekchaki N, Boumendjel M, Taibi F, Abdellaoui M, Messarah M, *et al* (2018) Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. *Allergol Immunopathol (Madr)* 46: 472-81. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.005>
- Zemmouri H, Sekiou O, Ammar S, El Feki A, Bouaziz M, Messarah M, *et al* (2017) *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharm Biol* 55: 1561-68. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310905>
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- Djaber N, Khelef Y, Ounaceur LS, Moubine BN, Rouag M, Berrouague S, *et al* (2022) Oxidative stress induced by Roundup in rat liver and brain: Attenuation by zinc sulfate. *Comp Clin Pathol* 31: 365-376. <https://doi.org/10.1007/s00580-022-03327-3>
- George L. Ellman (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 1: 70-77, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N. and Gillette J.R. (1974) , Bromobenzene-Induced Liver Necrosis: Protective Role of Glutathione and Evidence for 3,4-Bromobenzeneoxide as the Hepatotoxic Intermediate. *Pharmacology* 11, 151-169. <http://dx.doi.org/10.1159/000136485>.
- Djaber N, Ounaceur LS, Moubine BN, Khaldi T, Rouag M, Berrouague S, *et al* (2020) Roundup-induced biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of rats: The ameliorative effects of *Linum usitatissimum* oil. *Acta Biochim Pol*, 67: 53-64. https://doi.org/10.18388/abp.2020_2898
- Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-21. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-6. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, *et al.* (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186; 464-478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
- Conde E, Bertrand R, Balbino B, Bonnefoy J, Stackowicz J, Caillot N, *et al* (2021) Dual vaccination against IL-4 and IL-13 protects against chronic allergic asthma in mice. *Nat Comm*; 12; 2574. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22834-5>
- Nur Husna SM, Md Shukri N, Mohd Ashari NS, Wong KK (2022) IL-4/IL-13 axis as therapeutic targets in allergic rhinitis and asthma. *PeerJ* 10: e13444 <http://doi.org/10.7717/peerj.13444>
- Zari A, Alfarteesh H, Buckner C, Lafrenie R (2021) Treatment with *Uncaria tomentosa* promotes apoptosis in B16-BL6 mouse melanoma cells and inhibits the growth of B16-BL6 tumours. *Molecules*; 26: 1066. <https://doi.org/10.3390/molecules26041066>
- Barboza JN, da Silva Maia Bezerra Filho C, Silva RO, Medeiros JVR, de Sousa DP (2018) An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. *Oxid Med Cell Longev* 3957262. <https://doi.org/10.1155/2018/3957262>
- Moradi E, Rakhshandeh H, Rahimi Baradaran V, Ghadiri M, Hsanpour M, Iranshahi M, Askari VR (2023) HPLC/MS characterization of *Syzygium aromaticum* L. and evaluation of its effects on peritoneal adhesion: Investigating the role of inflammatory cytokines, oxidative factors, and fibrosis and angiogenesis biomarkers. *Physiol Rep* (2):e15584. <https://doi.org/10.14814/phy2.15584>
- Ounaceur LS, Bouacha M, Taguida O, Djaber N, Messarah M, Boumendjel A (2023) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the aqueous extract of *Syzygium aromaticum* (clove) from Indonesia. *Uttar Pradesh Journal of Zoology* 44: 178-91. <https://doi.org/10.56557/upjz/2023/v44i213686>
- Shih YH, Lin DJ, Chang KW (2014) Evaluation physical characteristics and comparison antimicrobial and antiinflammation potentials of dental root canal sealers containing in okitiol in vitro, *PLoS One* 10 ;9(6) :e94941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094941>
- Wernerm, Vonbraunschweigr (2008) L'aromathérapie : principes, indications, utilisations. Paris : Ed. Vigot 334.
- Oberholzer HM (2009) Pretorius E. Investigating lung remodeling in Modul8-treated BALB/c asthmatic animals. *Micron* 40: 775-82. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.07.008>
- Agrawal DK, Shao Z (2010) Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 10: 39-48. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)

- org/10.1007/s11882-009-0081-7
32. Renaud JC (2001) New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 54: 577-89. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.8.577>
 33. Brightling CE, Symon FA, Biring SS, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ (2002) TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 110: 899-905. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.129698>
 34. Pan C, Dong Z (2015) Antiasthmatic effects of eugenol in a mouse model of allergic asthma by regulation of vitamin D3 upregulated protein 1/NF- κ B pathway. *Inflammation* 38: 1385-1393. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0110-8>
 35. Patlevič P, Vaškovič J, Švorc P, Vaško L, Švorc P (2016) Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr Med Res* 5: 250-8. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.07.004>
 36. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N (2016) Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxid Med Cell Longev* e7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
 37. Haro-González JN, Castillo-Herrera GA, Martínez-Velázquez M, Espinosa-Andrews H (2021) Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. *Molecules*; 26: 6387. <https://doi.org/10.3390/molecules26216387>
 38. Yogalakshmi B, Viswanathan P, Anuradha CV (2010) Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology* 268: 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.12.018>
 39. Kaur G, Athar M, Alam MS (2010) Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Mol Carcinog* 49: 290-301. <https://doi.org/10.1002/mc.20601>
 40. Huang X, Liu Y, Lu Y, Ma C (2015) Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. *Int Immunopharmacol* 26: 265-71. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.026>
 41. Adam-Vizi V (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: Contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7: 1140-9. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1140>
 42. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24: 981-90. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
 43. Giguère A, Couillard Y, Campbell PGC, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, *et al* (2003) Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol* 64: 185-200. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00052-3)
 44. Ladhari-Chaabouni R, Gargouri R, Hamza Chaffai A (2007) Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Ruditapes decussatus*: Metallothionein quantification using two techniques. *Int J Environ Pollut* 30: 593-605. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2007.014831>
 45. Abd El Motteleb DM, Selim SA, Mohamed AM (2014) Differential effects of eugenol against hepatic inflammation and overall damage induced by ischemia/re-perfusion injury. *J Immunotoxicol* 11: 238-245. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.832444>
 46. Chagas MDSS, Behrens MD, Moragas-Tellis CJ, Penedo GXM, Silva AR, Gonçalves-de-Albuquerque CF (2022) Flavonols and flavones as potential anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial compounds. *Oxid Med Cell Longev* e9966750. <https://doi.org/10.1155/2022/9966750>
 47. Hodaei M, Rahimmalek M, Arzani A, Talebi M (2018) The effect of water stress on phytochemical accumulation, bioactive compounds and expression of key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Chrysanthemum morifolium* L. *Ind Crops Prod* 120: 295-304. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.073>
 48. Khaldi T, Chekchaki N, Rouibah Z, Chouala K, Cheniti H, Boumendjel M, *et al* (2022) Preventive effects of oral administration of *Nigella sativa* oil against smokeless tobacco induced toxicity and oxidative stress in the liver and kidney of allergic asthma induced rats. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 14:291-300. <https://doi.org/10.1007/s13530-022-00142-9>
 49. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
 50. Suantawee T, Wesarachanon K, Anantsuphasak K, Daenphetploy T, Thien-Ngern S, Thilavech T, *et al* (2015) Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. *J Food Sci Technol* 52: 3843-50. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1452-1>
 51. Langer HF, Chavakis T (2009) Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med* 13: 1211-20. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00811.x>
 52. Stone MJ (2017) Regulation of chemokine-receptor interactions and functions. *Int J Mol Sci* 18: 2415. <https://doi.org/10.3390/ijms18112415>
 53. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7538-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7538>
 54. Estevão-Silva CF, Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Grespan R, Nogueira de Melo GA, Baroni S, *et al* (2014) Anethole and eugenol reduce in vitro and in vivo leukocyte migration induced by fMLP, LTB4, and carrageenan. *J Nat Med* 68: 567-75. <https://doi.org/10.1007/s11418-014-0839-7>
 55. Suzuki A, Leland P, Joshi BH, Puri RK (2015) Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine* 75: 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.026>
 56. Salama A, Zaki H, El-Shenawy S, Ismaiel K, Shaffie NM (2012) Effects of fish oil and dexamethasone in experimentally-induced bronchial asthma. *Aust J Basic Appl Sci* 6: 497-506.
 57. Yeh JL, Hsu JH, Hong YS (2011) Eugenol and glycerylisoegenols suppress LPS induced iNOS expression by downregulating NF- κ B AND AP-1 through inhibition of MAPKS and AKT/I κ B α signaling pathways in macrophages. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 24, 2, 345-356. <https://doi.org/10.1177/0394632011024002>
 58. Csikós E, Csekó K, Kemény Á, Draskóczy L, Kereskai L, Kocsis B, *et al* (2022) *Pinus sylvestris* L. and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry essential oils inhibit endotoxin-induced airway hyperreactivity despite aggravated inflammatory mechanisms in mice. *Molecules* 27: 3868. <https://doi.org/10.3390/molecules27123868>
 59. Nilofer N, Singh S, Singh A, Kaur P, Siddiqui A, Kumar D, Lal R, Chanotiya C (2023) Influence of the Season on the Quantity and Chemical Composition of the Essential Oil and Synthesis of Secondary Metabolites in *Cymbopogon martini* (Roxb.) Wats. *Agrotech Ind Crops* 3(4): 170-191. doi: 10.22126/atic.2023.9496.1109
 60. Darabi, M., Mondani, F., & Amerian, M. (2023). Impact of Transplanting Date and Animal Manure Fertilizer on Yield and Yield Components of Yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Agrotech Ind*

- Crops 3(4): 192-199. doi: 10.22126/atic.2023.9487.1107
61. Looregipoor, F., Hadi, N., & Shojaeiyan, A. (2023). Study on Quantitative and Qualitative Traits Diversity in Some *Momordica charantia* L. Genotypes. Agrotech Ind Crops 3(4): 211-222. doi: 10.22126/atic.2023.9735.1118



Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Aqueous Extract of *Syzygium aromaticum* (Clove) from Indonesia

Lynda Sabrina Ounaceur ^{a*}, Mabrouka Bouacha ^a,
Oumaima Taguida ^a, Nesrine Djaber ^a, Mahfoud Messarah ^a
and Amel Boumendjel ^a

^a *Biochemistry and Environmental Toxicology Laboratory, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, Algeria.*

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Authors LSO, MB, OT, ND, MM and AB. The first draft of the manuscript was written by Author LSO and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript

Article Information

DOI: 10.56557/UPJOZ/2023/v44i213686

Editor(s):

- (1) Prof. Telat Yanik, Atatürk University, Turkey.
(2) Dr. Takashi Ikeno, National Cancer Center Hospital East, Japan.

Reviewers:

- (1) Munther Abduljaleel Muhammad-Ali, University of Basrah, Iraq.
(2) Madiha Batool, Gigg Lahore, Pakistan.

Original Research Article

Received: 27/07/2023

Accepted: 30/09/2023

Published: 06/10/2023

ABSTRACT

The clove (*Syzygium aromaticum*) is an aromatic herb that originates mainly from Central Asia and Africa. This herb has been used in many ways, especially in the medical field. Given its many therapeutic benefits, it would be interesting to identify the different phytochemicals of this plant. The

*Corresponding author: Email: lynda.s.ounaceur@gmail.com;

primary objective of this work is to measure the various phenolic compounds in the aqueous extract of the plant and to identify them, using the HPLC technique. The study of the antioxidant activity *in vitro* of this extract as well as its antimicrobial activity have been carefully carried out. According to the results of the phytochemical analysis, this plant contained, more or less, significant amounts of phenolic compounds such as total phenols (176.02 mg), flavonoids (23.5 mg) and ortho-diphenols (740,14 mg). Moreover, some phenolic compounds, in particular flavonols, were present in smaller amounts, (2.09×10^{-3} mg). The presence of certain compounds was then confirmed by the HPLC technique. The results of the study of the antioxidant activity of clove extract (DPPH, ABTS and β -carotene test), showed values that were high. As for the antibacterial activity tests, they showed remarkably high inhibition zones and sensitivity (diameter 18mm and 15mm diameter) for the Gram negative bacteria : *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia Coli*. As regards for the gram-positive strain which is *Staphylococcus aureus*, it had a high sensitivity and an inhibition diameter of (19 mm).

Keywords: *Syzygium aromaticum*; phytochemical screening; HPLC; antioxidant and antimicrobial activities.

1. INTRODUCTION

For decades, medicinal plants have been the mainstay of traditional herbal medicine, which was widely used all over the world. In recent years, researchers have been able to identify and validate several substances derived from plants with the aim of treating different diseases. Thanks to intensive research, this led to the production of several modern drugs that directly or indirectly derived from plants [1]. The Clove is among those plants used for therapeutic usage. It is obtained as a fruit from a tree. This tree is called *Syzygium aromaticum*. It belongs to the Myrtaceae family [2] and is cultivated in Central Asia in countries such as Indonesia, India, Malaysia and Sri Lanka, but also in Africa in countries such as Madagascar and Tanzania [2]. *Syzygium aromaticum* has many uses in the medical field but also in the culinary field as it enhances the flavor of a number of dishes. In its commercial form, it can be found either in dried flower buds or in ground powder. Regarding the medical field, the clove has always been traditionally used (in the form of herbal tea) as a treatment to fight against several ailments such as digestive disorders, rheumatism, dental pain (as an analgesic), inflammation of the throat as well as that of the mouth etc.... [3]. Cloves stand out among other spices, in particular thanks to their powerful therapeutic properties for pharmaceutical applications, namely anti-inflammatory ones, anti-oxidant, anti-microbial, anti-bacterial, antiseptic, anti-fungal, anti-cancerogenic, antispasmodic, antiviral ones etc.... [4]. Cloves have also been used successfully for asthma and various oral allergic disorders [5]. Cloves represent a rich source of bioactive compounds which lie at the heart of their

therapeutic properties [6]. Among these molecules are the phenolic compounds such as flavonoids, phenolic acid, gallic acid, caffeic acid, tannins and eugenol (essential oil) [4]. This compound (eugenol) is particularly used by dentists as an anesthetic since it can instantly penetrate the dental pulp tissue [7]. Given its many therapeutic benefits, it would be interesting to identify the different phytochemicals of this plant and to evaluate some of its therapeutic potentials.

This work has several objectives. The first one consists of assaying the different phenolic compounds of the aqueous extract of the plant *Syzygium aromaticum*, such as total phenols, flavonoids, flavonols and ortho-diphenols, by means of several colorimetric tests. The second objective relates to the study *in vitro* of two of its innumerable properties. On the one hand, it consists in measuring its antioxidant power, using the following tests: DPPH, ABTS, and the β -carotene bleaching test. On the other hand, it assesses its antimicrobial activity. Finally, the last objective is to identify the different phenolic compounds through the analysis of the aqueous extract via HPLC.

2. METHODOLOGY

2.1 Plant Materials and Chemicals

Syzygium aromaticum, as flower buds of clove (pink in color) previously dried in the sun to a dark color (brown), was imported from Indonesia. These cloves, purchased from a herb shop located in the city of Annaba, were powdered in an electric grinder. As for the chemical products such as ammonium molybdate, gallic acid quercetin, catechin and vanillin, they came from

Biochem, Chemopharma (Cosne Sur Loire, France). All other chemical products used in this study were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, France).

2.2 Preparation for Water Extraction

The plant was initially put into water in order to obtain a suitable aqueous extract, following the method described by Abd Rahim, and Said Gulam Khan [8], with some modifications. An amount of 8 g of the plant powder was put into 50 mL of distilled water and it was mixed in a stirrer using a magnetic agitation overnight. The day after, the homogenate was filtered through whatman No.1 paper and was stored in the fridge at 4°C for later use.

2.3 Determination of Phenolic Compounds (Colorimetric Assays)

2.3.1 Total phenols

The determination of phenols was carried out using the Folin-Ciocalteu Reagent [9]. An amount of 0.5 mL of a stock solution (concentration 1 mg / mL) was prepared in a methanol / water mixture (50:50). This blend was mixed with 5 mL of the RFC (diluted 1/10 in ultra pure water) and 4 mL of sodium carbonate Na₂CO₃ (1M). The mixture was stirred and was left for 15 min in the dark at room temperature. Optical density was measured at 765 nm using a spectrophotometer (Mecasys) and distilled water was used as a blank to adjust for zero. The total phenol contents was expressed in mg of gallic acid equivalent per gram of extract (mg EAG / g extract) [10].

2.3.2 Total flavonoids

The total flavonoids were determined according to the method described by Pourmorad et al. [9]. An amount of 0.5 mL of the aqueous extract was added to 1.5 mL of methanol, 0.1 mL of aluminum trichloride (AlCl₃, 6H₂O at 10%), 0.1 mL of 1M sodium acetate and finally 2.8 mL of ultra pure water. The mixture was left for 30 minutes in the dark. At the end of the reaction, the absorbance was read at 430 nm and the blank with distilled water. The concentration of total flavonoids was calculated on a standard curve and expressed in mg of quercetin equivalent per gram of extract (mg EQ / g extract) [11].

2.3.3 Total flavonols

The quantification of flavonols was carried out by the method of yermakov et al. [12]. An amount of

1 mL of AlCl₃ (20%) was added to 1 mL of the diluted aqueous extract followed of 3 mL of sodium acetate (50 mg / mL). The absorbance was measured at 440 nm after 2 hours of incubation in the dark. Flavonols were expressed in mg per g of dry extract in rutin equivalent and calculated on a standard curve [10].

2.3.4 Total Ortho-diphenols

The dosage of ortho-diphenols was carried out according to the method described by Mateos et al. [13]. An amount of 4 mL of the extracted solution was added to 1 mL of a solution of dehydrated sodium molybdate (5%, w/v, in 50% ethanol). The mixture was stirred vigorously and after 15 minutes, the absorbance of the solutions was measured at 370 nm and compared to a reagent blank (prepared by adding 1 mL of 50% ethanol to the extract instead of a sodium molybdate solution). Ortho-diphenols were expressed in mg of caffeic acid equivalents (CAE) / g of extract [14].

2.3.5 Condensed tannins

The determination of the condensed tannins was carried out by the vanillin method described by Julkunen-Tiitto R et al. [15]. Two sets of test tubes were prepared. A quantity of 1 mL of each extract was introduced into a tube of each of the two series. In the first series of tubes, 5 mL of the analysis reagent (1% Vanillin + 8% HCl) were added at 1 minute intervals followed by the addition of 5 mL of the HCl solution at 4% at 1 minute intervals in the second set of tubes. The tubes of the two series were placed in a water bath at 30°C for 20 minutes. The absorbance reading at 500 nm was taken with the interval of one minute. This concentration was expressed in mg of catechin equivalent per gram of extract (mg EC / g extract).

2.4 Evaluation of Antioxidant Activity

2.4.1 DPPH radical scavenging activity

This dosage was determined on the basis of the tests described by W. Binsan et al. [16]. A quantity of 1 mL of the extract sample was mixed with methanoic solution of DPPH and the samples were measured at 515 nm [17]. The estimate of the anti-free radical activity is expressed by the value of the percentage inhibition (PI%) calculated using the following formula:

$$PI(\%) = \frac{DO_{100\%} - DO_{Essai}}{DO_{100\%}} \times 100$$

OD 100%: absorbance of the "total".

DO Essai : absorbance of the solution in the presence of extracts.

2.4.2 β -Carotene bleaching method

This antioxidant activity was achieved by using the method described by Pratt [18] and modified by Kulisic et al. [19]. Ten (10) mg of β -carotene were dissolved in 100 mL of chloroform and only 1 mL of this solution was placed in a flask containing 20 mg of linoleic acid and 100 mg of Tween 40. The chloroform was removed by a rotavap at 50°C for 5 min. Then, 50 mL of hydrogen peroxide was added gradually to obtain emulsion A. Following this, 200 mL of the sample of the aqueous extract was mixed into 5 mL of the emulsion (A). The negative control consisted of 200 mL of ethanol and 5 mL of emulsion (A); and the blank contained 200 mL of ethanol and 5 mL of emulsion (B) (20 mg of linoleic acid, 100 mg of tween 40 and 50 mL of hydrogen peroxide). The tubes were placed in a water bath at 50°C for 120 minutes and the absorbance was measured at 470 nm. The antioxidant activity was expressed as a percentage and calculated using the following formula:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{[1 - (\text{Abs}_{\text{sample}}^0 - \text{Abs}_{\text{sample}}^{120}) / (\text{Abs}_{\text{control}}^0 - \text{Abs}_{\text{control}}^{120})] \times 100}{\text{Abs}_{\text{sample}}^{120}}$$

With:

Abs_{sample}⁰: absorbance of sample at zero time (extract).

Abs_{sample}¹²⁰: absorbance of sample after 120 min (extract).

Abs_{control}⁰: absorbance of control at zero time.

Abs_{control}¹²⁰: absorbance of control after 120 min.

2.4.3 ABTS method

This assay was carried out according to the method of Re et al. [20]. Preparation of the radical cation of ABTS:

A solution of ABTS with a concentration of 7mM was prepared by dissolving 36 mg of ABTS in 10 mL of distilled water. The cation radical (ABTS^{•+}) was prepared by adding 88 μ L of a solution of K₂S₂O₈ (2.456 mM) to 5 mL of the ABTS solution. The ABTS^{•+} solution was stored in the dark for 12-16 hours. This ABTS^{•+} solution was diluted before use with methanol so as to obtain an absorbance of 0.7 \pm 0.02 at 734 nm.

Reaction medium: Five (5) dilutions were made for each of the samples (0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1 mM) in order to draw a standard curve of trolox. This curve was obtained by adding 20 μ L of methanolic solution of trolox to 2 ml of diluted ABTS^{•+} Solution. The absorbance at 734 nm was determined 6 minutes after the start of the reaction. The same procedure was followed for 3 different concentrations of ethanolic solutions of the extracts to be tested. A blank containing 1 mL of ethanol was incubated under the same conditions as the sample [21]. The estimate of the antioxidant power by the ABTS method was expressed as an inhibition percentage (%), and the IC₅₀ value was calculated using the following formula:

$$\text{ABTS radical-scavenging activity (\%)} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100}{\text{Abs}_{\text{control}}}$$

With:

Abs_{control}: absorbance of the ABTS^{•+} radical in methanol.

Abs_{sample}: absorbance of the ABTS radical with the addition of the sample (extract).

2.5 Quantification of Phenolic Compounds in Aqueous Clove Extracts by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The separation of the aqueous extract was carried out using an AGILENT column (length 150 mm, diameter 4.6 mm, particle size 5 μ m) kept at temperature 35°C. The mobile phase consisted of water at 1% and acetic acid (A), and methanol (B). The gradual elution of the mobile phase was applied in this order: 95%, 5% and 95% for phase A, 5%, 95% and 5% for phase B. This elution was carried out from 0 to 60 minutes. The flow rate consisted of 1 mL / min and the injection volume was set to 20 μ L. The wavelengths were used for 254 nm and 280 nm. The data obtained were processed using the YL-CLARITY software.

2.6 Evaluation of Antimicrobial Activity

2.6.1 Choice of strains

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were used during this study. These 3 strains of bacteria were isolated from clinical samples from patients that is to say: stool culture, urine, abscess, pus, wound blood culture...etc.

2.6.2 Preparation of culture media and the inoculum

Mueller-Hinton (M.H) agar was used to perform the antibiogram test and the arommatogram technique. The inoculum from an isolated pure culture was used to inoculate 10 mL of M.H culture broth and was then incubated at 37°C after 18-24 h. The tube of the bacterial suspension was standardized according to the Mc Farland standard [22,23].

2.6.3 Methods of antibacterial evaluation

Disc Broadcast Method: Discs of 6 mm in diameter filter paper were used and impregnated with different volumes of the aqueous extract (80, 100, 200 µL). M-H gelose boxes were inoculated with each of the 3 bacteria strains and incubated in an oven at 37°C for 24 h [24].

Well Diffusion Method: The agar has been pierced in the form of 6 mm in diameter wells using a sterile tip. 50 µL and 100 µL of the aqueous extract of clove, [25] were placed in these wells. The incubation of these petri dishes was carried out for 24 hours at 37°C. All the experiments were performed in duplicate. Antimicrobial activity was determined by measuring areas of inhibition.

2.6.4 Study of antibacterial activity in liquid medium

Determination of Minimum Inhibitory concentration (MIC) on a liquid medium: A 96-well plate was used to determine the MIC of the plant extracts compared to the strains. 200 µL of each sample (bacterial suspensions, sterile distilled water, aqueous extract of the plant) were introduced. Then a serial dilution according to the ½ dilution factor was carried out. At the end, 100 µL of the bacterial inoculum were redistributed in the remaining wells in order to test the sensitivity of the strains towards the plant extract. The incubation of this covered microplate was carried out in an oven at 37°C for 24 hours. The reading was carried out using a plate reader of the MR-96A Microplate Reader type [24].

Determination of the minimum bactericidal concentration (MBC): 1 drop of each extract from the wells representing the MIC was taken to determine the MBC. Inoculation on solid culture media (GN) was carried out and then incubated at 37°C for 24 h. The day after, the MBC was determined using this culture [24].

2.7 Statistical Analysis

Three replicates of each sample were used for statistical analysis. Data were expressed as mean ± standard error (SE). In all experiments, data were subjected to correlation coefficient in Excel 2007.

3. RESULTS

3.1 Chemical Compounds Isolated from Cloves

The different aqueous extracts of the *Syzygium aromaticum* plant gave more or less high yields which is 21% (Table 1). According to Table 2, the concentration of total polyphenols in the aqueous extract of *Syzygium aromaticum* was determined as 176.02 mg FA / g, the amount of total flavonoids was in the form of 23.5 mg QE / g and the concentration of condensed tannins was estimated at 1.04×10^{-3} mg CA / g of extract. Finally, the values obtained for flavonols and ortho-diphenols were respectively 2.09×10^{-3} mg Rutin / g and 740.14 mg AC / g (Table 2).

3.2 Antioxidant Activity of Cloves

According to the results shown in Table 3, the ABTS method of the *Syzygium aromaticum* plant contained 38.69%. Regarding the values obtained by the method of DPPH IC 50 and β-carotene bleaching (Table 3), the latter contained 145.46 µg / ml and 77%.

3.3 Identification of Phenolic Compounds by HPLC

According to the results shown in Fig. 1 and Table 4, the aqueous extract of *Syzygium aromaticum* contained some of the phenolic compounds identified in this study. Among these compounds, there was the presence of certain compounds such as gallic acid (8.627 min), ellagic acid (15.627 min) and finally eugenol (26.810 min).

3.4 Antimicrobial Activity

3.4.1 Distribution on paper

This technique allowed us to demonstrate the antibacterial power of the plant extract used against three bacterial strains. The results are read by measuring the zones of inhibition, which are represented by a clear halo formed around

each disc. The results obtained are shown in Table 5, Figs. 2, 3 and 4.

3.4.2 Well diffusion

The inhibitory action of the extract studied is manifested by the formation of a halo around the wells. The results are read by measuring the diameters of the inhibition zone. The results obtained are shown in Table 6 and Fig. 5.

3.4.3 Assessment of antibacterial activity in liquid medium

MIC: After 24 hours of incubation of the 96-well microplate, we noticed the occurrence of a clear appearance in some wells, in others we observed a cloudiness indicating bacterial growth, these were seen in wells 4,5 and 8. The results obtained are shown in Table 7.

MBI: After incubating the dishes at 37°C for 24 hours, we observed the appearance of a few colonies in well 5 of the *P. aeruginosa* strain with an absence of growth of the other two strains, *E. coli* and *S. aureus*. The results obtained are shown in Fig. 6.

4. DISCUSSION

Regarding the results of the yield of the aqueous extract of clove, the value was 21%. This amount is higher than in another extract obtained in the other study [6] by using another solvent. The solvents used were ethanol and ethyl-Acetate. This difference in the extraction yields from different solvents is caused to the differences in the polarity of constituents found in plant materials [26]. In a study carried out by El-saber Batiha et al., [7] the results obtained concerning the levels of the main components of clove seem to be close to our results. Indeed, regarding the results obtained from the assays of the various phenolic compounds of the aqueous extract of the *Syzygium aromaticum* plant, it appears that cloves contain different varieties of these compounds. Indeed, this herb contains a high amount of total polyphenols (176.02 mg FA / g of extract (8 g) (Table 2). Indeed, cloves represent one of the main sources of phenolic compounds (Cortés-Rojas *and al.*, 2014). With regard to the concentrations obtained of total flavonoids (23.5 mg QE / g of extract) and those of ortho-diphenols (740, 14 mg AC / g of extract) .The values obtained were high and agree with those observed in the study of Abo-El Maati et al. [6] where it was mentioned that flavonoids such as

quercetin are present in cloves at a lower concentration (17.5 mg QE / g extract) compared to phenolic acids such as gallic acid (mentioned before). Concerning the level of ortho-diphenols, this can be explained by the fact that among these components (such as caffeic acid), the latter is one of the phenolic acids present in high concentration (366.5 mg/100 g) in the clove plant [27]. As for the results of the condensed tannin dosages obtained, the aqueous extract of the *Syzygium aromaticum* plant contains a very low concentration. However, this value obtained estimated at 1.04×10^{-3} mg CA / g of extract (8 g) is low compared to that found in the work of Shan B et al. [27] (14.38 g / 100 g of DW) as well as Ghedira et al. [28] (12%). This difference can be explained by handling errors occurring during the assay. As with the condensed tannins, according to the results obtained, the aqueous extract of the herb contains a concentration of flavonols in very low quantities (2.09×10^{-3} mg Rutin / g of extract) (8 g). However, in general, the clove contains an increasingly smaller quantity of flavonols (28.4 mg / 100 g), since the latter constitute one of the main phenolic compounds [27]. These results obtained following the colorimetric assays of certain phenolic compounds of *Syzygium aromaticum*, were validated by the HPLC technique. Indeed, this identification technique confirmed the presence of certain phenolic compounds assayed below, such as gallic acid (assay of total phenols), ellagic acid and eugenol (which is the essential oil of the nail of cloves). These results are similar to those of Jung-Hoon Kim et al. [29]. Another study also ascertained these results following the analysis of a clove extract using the HPLC technique. This study by Anita et al. [30] revealed the presence of gallic acid, eugenol and quercetin (flavonoid assay). Regarding the *in vitro* study of one of the innumerable properties of cloves, which consists of measuring the antioxidant power of its aqueous extract, it appears that this herb has a significant antioxidant power. Indeed, among the tests used, there is the antioxidant activity DPPH which indicates its ability to shed hydrogen atoms. The comparison of the IC50 against the two positive controls shows that the aqueous extract of *Syzygium aromaticum* has the lowest antioxidant activity (145.46 g / ml). However, this value obtained is low compared to that found in the study of Abo-El Maati et al. [6], where the anti-free radical activity of the extract of cloves was high in the aqueous extract (between 25.3 - 91.4%). However, in the study reported by Haro-Gonzalez et al., [2], the amount of DPPH

inhibition of the aqueous extract of cloves approached the values obtained from our extract (150 g/ml). These values increased in proportion to the concentration of the aqueous extract of *Syzygium aromaticum* (Nikousaleh and Prakash, 2008). Another study of the antioxidant activity of the *Syzygium aromaticum* plant was determined using the ABTS method. In the latter, the removal activity of the protonated radical ABTS. + was measured. It has a maximum absorbance at 734 nm which decreases with the extinction of proton radicals [6]. According to the results shown in Table 3 of the radical elimination activity, the aqueous extract of the *Syzygium aromaticum* plant has a more or less important antioxidant activity with reference to the values of the percentage of anti-free radical activity (ABTS) (38.69%). This value is more or less similar to that found in the study of Abo-El Maati et al. [6] which was between 49.45% to 99.49%. Regarding the result of the β -carotene bleaching test shown in Table 3, the aqueous extract of *Syzygium aromaticum* possesses a high capacity of inhibiting β -carotene bleaching. Indeed, this capacity is illustrated as a value of 77% compared to those of the reference standard antioxidant compounds (BHT and vitamin C) which were respectively 29.33 and 62.5%. This high value proves that the *Syzygium aromaticum* plant has an important antioxidant activity. These data are similar to those 80% obtained in the study of Abo El-Maa et al., [6]. In this study, authors suggested that the aqueous extract of the clove plant was able to neutralize the free radicals that were formed (conjugated hydroperoxides) as a result of the oxidation of the linoleic acid present during the reaction. This neutralization will result in the absence of attack of the β -carotene chromophore and thus in the inhibition of its bleaching as reported by Ghedadba et al. [31]. According to the rather high values obtained following the study of the antioxidant activity of *Syzygium aromaticum* (DPPH, ABTS and β -carotene test), and the dosage of certain phenolic compounds, it would seem that this plant has a significant antioxidant potential (anti-radical). Indeed, this potential is probably due to the presence of more or less significant concentrations of phenolic compounds [4]. This observation was confirmed by the study that was carried out by Shan B et al. [27] which highlighted the enormous potential of cloves as a scavenger of radicals and as an important source of phenolic compounds. Another study also reached the same conclusion, mentioning that plant polyphenols are multifunctional, that they can act as reducing agents, donors of hydrogen

atoms and even singlet oxygen scavengers [32]. According to the results obtained in this study of the antioxidant activity of the clove, the latter agree with the fact that the strong antioxidant value of clove is connected to the phenolic compounds found in it [33]. The antioxidant power of this plant can be explained by the fact that the latter has the ability to minimize oxidation reactions and reduce the number of free radicals, resulting in resistant against the damages caused by the oxidative stress [33].

As for the antibacterial activity, the clove extract has shown remarkable effectiveness observed in our results. The antibacterial mechanism of this plant is due to the meta and ortho positions of the -OH groups found in its main chemical composition [2]. These functional groups have the ability to interact with the cytoplasmic membrane of microbial cells and thus penetrate their cell membranes [2]. This penetration capacity is due to the possession of lipophilic properties of the -OH functional groups and the interaction with polysaccharides, fatty acids and phospholipids. The latter will cause a leak of cellular contents, thus leading to cell death [2]. Indeed, these plants present remarkably high zones of inhibition (up to 23 mm in diameter), in the three bacterial strains studied: *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. These zones of inhibition were present around the discs impregnated with volumes of 80, 100 and 200 μ L of aqueous extract of cloves. Our results were comparable to those of the work of Nassan et al. [25] who showed that the antibacterial effect of the aqueous extract of cloves applied to the bacteria *S. aureus* and *E. coli* gave a better result than the extract of cinnamon, and that the extract of cloves showed a maximum zone of inhibition of 10 to 20 mm with *S. aureus* while the minimum was 9 mm with *E. coli*. According to Cortés-Rojas et al. [4] who confirmed the work of Sofia et al. [34], the only sample which showed a complete bactericidal effect was the aqueous extract of clove at 3% and this against all foodborne pathogens tested, namely: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Knowing that the concentration of 1% of clove extract had also shown a good inhibitory action, according to the same authors. For the second method of diffusion on agar and for the volumes of 50 μ L and 100 μ L of aqueous extract deposited in the 6 mm wells on Mueller Hinton medium, a strong antimicrobial activity was observed where the zones of inhibition were for a minimum of 12 mm in diameter and for a maximum of 20 mm. By comparison to the

results obtained, it was shown that there was a remarkable sensitivity with Gram-negative bacteria (*E. coli*, and *P. aeruginosa*) with inhibitor diameters ranging from 15 and 18 mm in the case where the value of aqueous extract is 100 µL. The other gram-positive strain which is *S. aureus* had a high sensitivity and an inhibition diameter of 19 mm. Through these investigations, we were able to find with the strain *Pseudomonas aeruginosa* and by using the two methods (disc and well) a very remarkable sensitivity with diameters of inhibition of 12.5, 15 and 18 mm. As reported in the work of Faraja et al. [35], *Pseudomonas aeruginosa* represents a robust Gram-negative bacterium, naturally very resistant to antibiotics and quickly adapting to drug attacks. Indeed, it has a capacity to resist either natively (by the

constitutive expression of β-lactamases and / or efflux pumps, or due to a low permeability of the outer membrane), or following the exposure to antibiotics (acquisition of genes encoding enzymes that destroy antibiotics). These mechanisms can often be present simultaneously, conferring a multi-resistance phenotype [26]. From the results obtained, we could deduce, the *S. aureus* strain was found to be the most sensitive strain with an MIC of 64 µg / mL. By comparison of these results with those of Nassan et al. [25] and Sethi et al. [37] who proved that the minimum inhibitory concentrations for extracts of clove and cinnamon bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) showed that the highest dilution of extract of clove which inhibited the growth of *S. aureus* was 2 µg / mL and the MBI

Table 1. Percentage of extraction yield

Plant	Extraction solvent	Initial mass (g)	Yield (%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Distilled water	5	21

Table 2. Concentration of phenolic compounds of the aqueous extract of the *Syzygium aromaticum* plant

Parameters	Values
Total phenols (mg GA/g of clove)	176,02 ± 0,040
Total flavonoids (mg QE/g of clove)	23,50 ± 0,002
Total flavonol content (mg x 10 ⁻³ RU/g of clove)	2,09 ± 0,010
Total Ortho-diphenols content (mg CA/g of clove)	740,14 ± 0,310
Condensed tannins (mg CA/g of extract)	1.04 x10 ⁻³ ±0,002

GA: Gallic Acid, QE: Quercetin, RU: Rutin, CA: Cateic Acid
 Values are mean ± SE of three replicates for each estimation

Table 3. Percentage of anti-free radical activity (ABTS) and antioxidant activity of the aqueous extract of *Syzygium aromaticum* by the DPPH and β-carotene methods

	Values of IC ₅₀ of extract (µg/mL)	Percentage of antioxidant activity of β-carotene (%)	Percentage of anti-free radical activity (ABTS) (%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	145,46	77,00	38,69 ± 0,031
BHT	62,92	29,33	-
Vit C	26,20	62,50	-

Values are mean ± SE of three replicates for each estimation

Table 4. Identification of certain phenolic compounds of water extracts of *Syzygium aromaticum* by HPLC instruments

Pic number	Retention time (min)	Compound name
#1	08,627	Gallic acid
#2	15,627	Ellagic acid
#3	26,810	Eugenol
#4	59,203	Quercetin

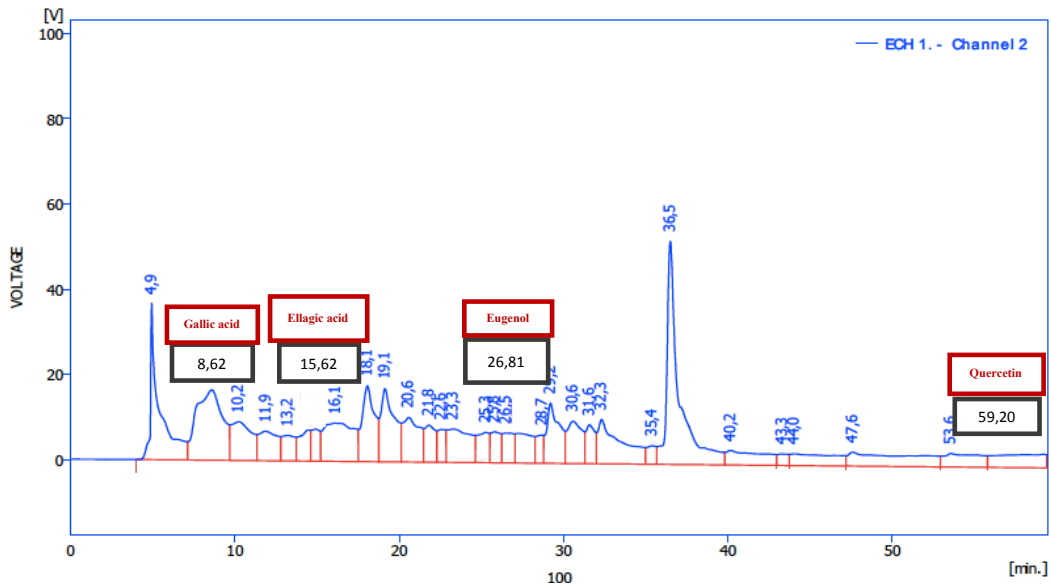


Fig. 1. HPLC chromatogram of aqueous extract of *Syzygium aromaticum*

was 2.5 µg / mL with no activity on *E. coli*. It can be concluded that the extract of *Syzygium aromaticum* (clove) showed excellent antimicrobial activity against these microorganisms.

The recourse to natural resources in general and to medicinal plants in particular then becomes one of the most important and interesting avenues to be explored in the search for new, more effective antibacterial products.

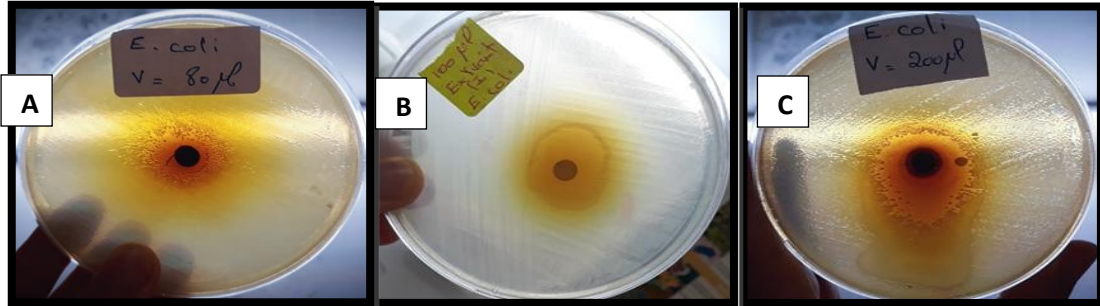


Fig. 2. Observation of the inhibition zone and comparison between three different concentrations of the aqueous extract: 80 µL (A), 100 µL (B) and 200 µL (C) in the *E. coli* strain

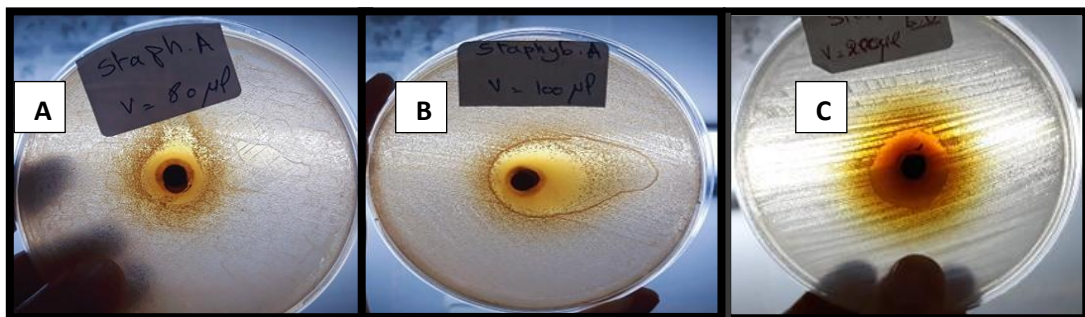


Fig. 3. Observation of the inhibition zone and comparison between three different concentrations of the aqueous extract: 80 µL (A), 100 µL (B) and 200 µL (C) in the *S. aureus* strain

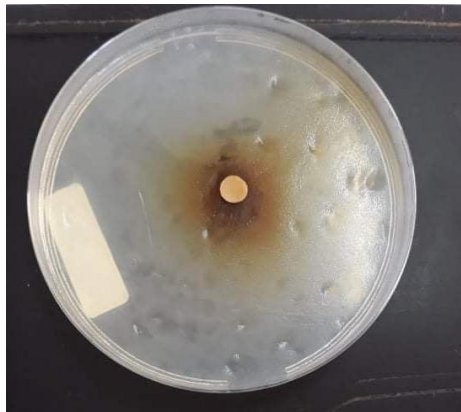


Fig. 4. Observation of the inhibition zone with a concentration of 100 µL in the *P. aeruginosa* strain

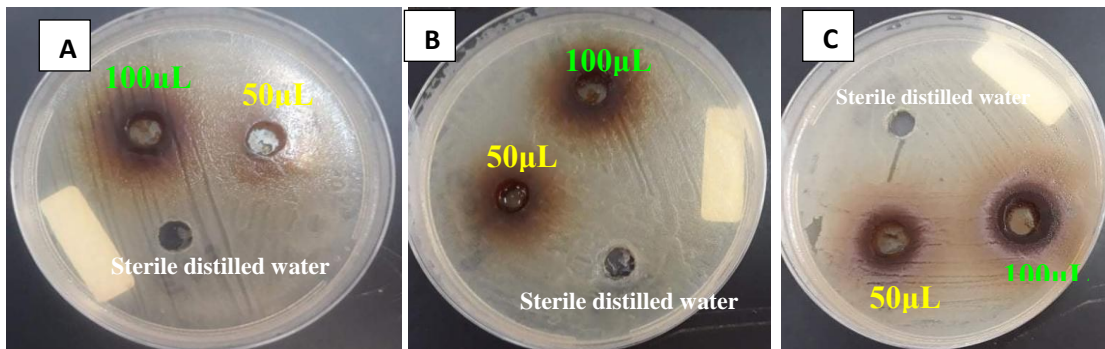


Fig. 5. Observation of the inhibition zone and comparison between two different concentrations (50 and 100µL) in the *E. Coli* (A), *S. aureus* (B), *P. aeruginosa* (C) strain

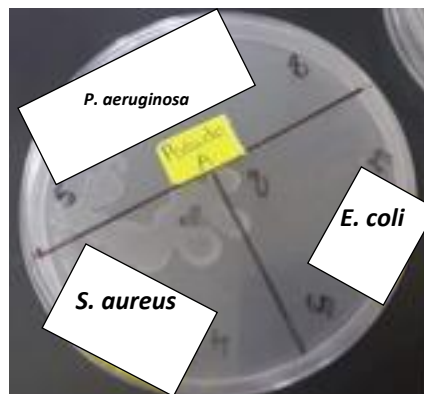


Fig. 6. Observation of the bacteriostatic and bactericidal effect of the aqueous extract with respect to the three strains: *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*

Table 5. Zones of inhibition diameter by impregnated paper of *S. aromaticum* aqueous extract on different bacterial species. Measurements of the inhibition diameter by impregnated paper

Strains studied	Volume deposited (µL)	Inhibition diameter (mm)	Sensitivity / Resistance
<i>Escherichia coli</i>	80	10	+
	100	15	++
	200	22	+++

Strains studied	Volume deposited (µL)	Inhibition diameter (mm)	Sensitivity / Resistance
<i>Staphylococcus aureus</i>	80	12	+
	100	19	++
	200	23	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80	/	/
	100	18	++
	200	/	/

According to the zone of inhibition around the discs, the bacteria tested were classified according to their degree of sensitivity to the antibacterial agent

Resistant (-), Sensitive: (+), Quite sensitive: (++) , Very sensitive: (+++)

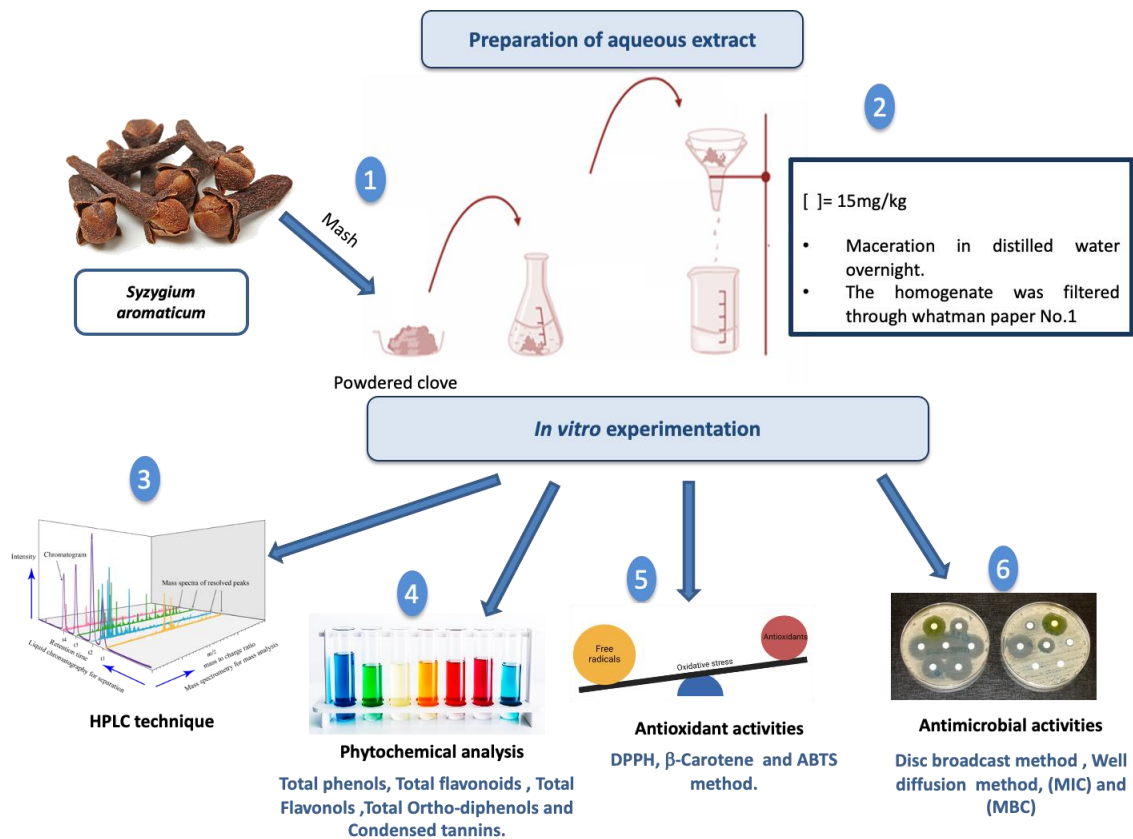


Fig. 7. Graphical abstract of the present study about the dosage of phenolic compounds, and determination of the antioxidant and antimicrobial activities of the aqueous extract of Syzygium Aromaticum

Table 6. Measurements of the inhibition zones diameters by diffusion on wells

Strains studied	Volume deposited (µL)	Inhibition diameter (mm)	Sensitivity / Resistance
<i>Escherichia coli</i>	50	14.5	+
	100	18	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	12	+
	100	20	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	12.5	+
	100	15	++

According to the inhibition zone around the wells, bacteria are classified according to their degree of sensitivity
Resistant (-), Sensitive: (+), Quite sensitive: (++) , Very sensitive: (+++)

Table 7. MIC values of bacteria tested by the aqueous extract of the plant *Syzygium aromaticum*

Strains	MIC (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	512
<i>Staphylococcus aureus</i>	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1024

5. CONCLUSION

According to the results of the phenotypic analysis of the aqueous extract of *Syzygium aromaticum*, the latter contains more or less significant amounts of phenolic compounds (total phenols, flavonoids and ortho-diphenols). On the other hand, some of phenolic compounds were present in less quantity such as flavonols. These results were confirmed by the HPLC technique as a retention time (8,627min Gallic acid, 15,627min Ellagic acid, 26,810min Eugenol and 59,203 min Quercetin). Regarding the study of the antioxidant activity of the plant (DPPH, ABTS and β -carotene test), the values of the latter were high, thus confirming its strong antioxidant activity. As for the antibacterial activity of *Syzygium Aromaticum*, our results showed that the aqueous extract inhibited nosocomial pathogenic bacteria resistant to antibiotics such as *Pseudomonas aeruginosa*. This indicates that this plant has an important antioxidant (anti-radical) potential and antimicrobial activity which is probably due to the presence of powerful phenolic compounds. To conclude, this study made it possible to highlight the strong antimicrobial and antioxidant properties of the clove.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the CRAPC (Scientific and Technical Research Center In Physical and Chemical Analyses) and the staff of Bouzid Amer Hospital in El Kala (Algeria) for the support of this research work.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Mitaal M, Gupta N, Parashar P, Mehra V, Khatri M. Phytochemical evaluation and pharmacological activity of *Syzygium Aromaticum*: A comprehensive review. Int J Pharm Sci. 2014;6(8):67-72.
- Haro-González JN, Castillo-Herrera GA, Martínez-Velázquez M, Espinosa-Andrews H. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. Molecules. 2021;26:6387.
- Pan C, Dong Z. Antiasthmatic effect of eugenol in a mouse of allergic asthma by regulation of vitamin D3 upregulated protein 1/NF- κ B pathway. Inflammation. 2015;38(4):1385-1393.
- Cortés-Rojas D, Fernandes de Souza C R, Pereira Oliveira W. Clove (*Syzygium aromaticum*); a precious spice. Asian Pac J Trop Biomed. 2014;4(2):90-96.
- Kim HM, Lee EH, Hong SH, Song HJ, Shin MK, Kim SH, Shin TY. Effect of *Syzygium Aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. Journal of Ethnopharmacology. 1997;60:125-131.
- Abo-El Maati F A, Mahgoub S A, Labib S M, Al-Gaby A M A, Ramdan M F. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. European Journal of Integrative Medicine. 2016;8(4):494-504.
- El-Saber Batiha G, Alkazmi LM, Wasef LG, Beshbishy AM, Nadwa E, Rashwan EG. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. Biomolecules. 2020;10:202.
- Haji Abd Rahim Z, Begum Said Gulam Khan H. Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. Journal of Oral Science. 2006;48(3):117-123.
- Pourmorad F, Hosseinimehr S J, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 2006;5(11): 1142-1145.
- Zemmouri H, Ammar S, Boumendjel A, Messarah M, El Feki A, Bouaziz M.

- Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L. leaf extract growing in Algeria. *Arabian Journal of Chemistry*. 2014;1-10.
11. Slama K, Boumendjel M, Taibi F, Boumendjel A, Messarah M. Atriplex halimus aqueous extract abrogates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by modulating biochemical and histological changes in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2018;1-12.
 12. Yermakov A I, Arasimov V V, Yarosh N P. *Methods of biochemical analysis of plants*; 1987.
 13. Mateos R, Espartero J L, Trujillo M, Rios J J, Leon-Camacho M, Alcludia F, Cert A. Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin OliveOils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *J Agric. Food Chemistry*. 2001;49(5):2185-2192.
 14. Rouibah Z, Ben Mansour A, Reik O, Boumendjel M, Taibi F, Bouaziz M, et al. Chemical composition, antioxidant activities, in an allergic asthma model, of *Olea europaea* L. leaf extracts from Collo (Skikda, Algeria). *Drug and Chemical Toxicology*. 2019;1-12.
 15. Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agricult Food Chem*. 1985;33:213–217.
 16. Binsan W, Benjakul S, Visessanguan W, Roytrakul S, Tanaka M, Kishimura H. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) *Food Chem*. 2008;106(1):185–193.
 17. Sekiou O, Boumendjel M, Taibi F, Tichati L, Boumendjel A, Messarah M. Nephroprotective effect of Artemisia herba alba aqueous extract in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2020;1-9.
 18. Pratt D E. Natural antioxidants of soybean and other oil-seeds. In M.G. Simic and M.Karel (Eds.), *Autoxidation in food and biological system*. New York: Plenum Press. 1980;283-292.
 19. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*. 2004;85(4):633–640.
 20. Re R, Pellegrini N, Proteggenete A, Pannala A, Yang M et Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation the colorization assay. *Free Radical Biology and Medecine*. 1999; 26:1231-1237.
 21. Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, et al. Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. *African Health Sciences*. 2020; 20:413-425.
 22. Rahal K. Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Échelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 5ème édition, éd Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Algérie. 2008;58.
 23. Vitali LA, Beghelli D, Biapa Nya PC. Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermum ammi*. *Arabian J Chem*. 2016;9(6):775-786.
 24. Bouhaddouda N, Aouadi S, Labiod R. Evaluation of Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Methanolic Extract of *Origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* (Desf.) *letsvaart* from Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2015;8(1):104-112.
 25. Nassan MA, Mohamed EH, Abdelhafez S, Ismail TA. Effect of clove and cinnamon extracts on experimental model of acute hematogenous pyelonephritis in albino rats: Immunopathological and antimicrobial study, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2015;28(1)60–68.
 26. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem* 2001;73:285–290.
 27. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(20):7749-7759.
 28. Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie*. 2010 ;8(1):37-43.
 29. Kim JH, Seo CS, Kim SS, Ha H. Simultaneous determination of gallic acid, ellagi, and eugenol in *Syzygium aromaticum* and verification of chemical antagonistic effect by the combination with *Curcuma aromatic* using regression

- analysis. Journal of analytical methods in chemistry. 2013;2013:1-7.
30. Anita D, Avtar S, Ritu M. Antioxidants of clove (*Syzygium Aromaticum*) prevent metal induced oxidative damage of biomolecules. International Research Journal of Pharmacy. 2015;6(4):273-278.
 31. Ghedadba N, Bousselsela L, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. Phtothérapie. 2014; 12(1):15-24.
 32. Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Antioxidant activity of clove oil A powerful antioxidant source. Arab J Chem. 2012; 5(4):489-499.
 33. Jameel Kiki M. *In Vitro* Antiviral Potential, Antioxidant, and Chemical Composition of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil. Molecules. 2023;28:2421.
 34. Sofia P, K. Prasad R, VijayVK, Srivastava AK. Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common food borne pathogens. Int. J Food Sci. Technol. 2007;42(8):910-915.
 35. Faraja D, Gonelimali, Jiheng Lin, Wenhua Miao, Jinghu Xuan, Fedrick Charles, Meiling Chen, Shaimaa R Hatab. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms, Frontiers in Microbiology. 2018;24(9):1639 .
 36. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. Pseudomonas Aeruginosa: Résistance et Options Thérapeutiques à L'aube du deuxième Millénaire, Antibiotiques. 2007;126(8):305-316.
 37. Sethi S., Aparna D, B. Lal G, Saksham G. Antimicrobial activity of spices against isolated food borne pathogens. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013;5:260–262.

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
École Normale Supérieure d'Enseignement Technologique de Skikda
Département des Sciences Naturelles



Attestation de participation

N°: B. CA. 52.

Le comité scientifique du 1^{er} Séminaire National des Plantes Aromatiques et Médicinales de l'Est Algérien (SNPAMEA-1), organisé les 14 et 15 Septembre 2021, atteste que:

Mlle. OUNACEUR Lynda Sabrina.

a présenté une communication par affiche.

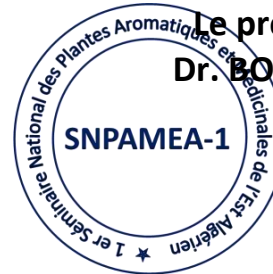
Titre: Détermination de l'activité anti-bactérienne de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* (Clou de girofle).

Co-auteur(s): TAGHIDA Oumaima, MESSARAH Mahfoud et BOUMENDJEL Amel.

Le directeur adjoint
Dr. OUMELAZ Fayçal



Le président du séminaire
Dr. BOUGHENDJIOUA Hicham



Certificat de Participation



Ce certificat est attribué à

Ounaceur Lynda Sabrina

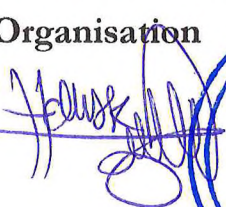
Pour avoir participé(e) aux Journées Nationales de l'Agro-Eco-Biotechnologie (JNAEB 2021), Organisé par le Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales (LBPV), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Blida 1), le 15 et 16 Octobre 2021 avec une communication par Affiche intitulée:

Evaluation of the antioxidant and the antimicrobial activities of the aqueous extract of clove (*syzygium aromaticum*)

Auteurs : Ounaceur Lynda Sabrina , taguida oumama, Messarah mahfoud et boumendjel Amel

Le Président du Comité
d'Organisation

Dr. Hoceme DEGAICHIA
Président du Comité
d'Organisation
* JNAEB 2021 *



03 NOV. 2021



Le Directeur du Laboratoire de
recherche

DIRECTEUR DU LABORATOIRE
DE BIOTECHNOLOGIE DES
PRODUCTIONS VÉGÉTALES

Pr. SNOUSSI Sid-Ahmed



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Centre universitaire Abdelhafid Boussouf Mila
Département de la Sciences et de la Vie
Laboratoire : Sciences de la Nature et des Matériaux (LSNM)



Attestation de participation

Cette attestation est délivrée à Mr/ Mme : **OUNACEUR Lynda Sabrina**, Université : **Badji Mokhtar d'Annaba**

Pour leur participation au 1^{er} Séminaire National sur les Substances Naturelles, Biotechnologie et Innovation (SNBI 2021), organisé en ligne via Google Meet le 26 et le 27 Octobre 2021 au Centre universitaire BOUSSOUF Abdelhafid Mila avec une présentation orale intitulée:

Effets de l'extrait aqueux de *Syzygium aromaticum* sur certains paramètres du stress oxydatif au niveau des érythrocytes dans un modèle murin d'asthme expérimental

Co-auteurs : MESSARAH Mahfoud., BOUMENDJEL Amel



Directeur de l'institut



Directeur du laboratoire (LSNM)

Présidente du séminaire

أبيسة الملتقى
د. بوقريسة صباح
SNBI 2021



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
International Journal of Human Settlements
<https://www.aneau.org/ijhs/>
ISSN : 2588-1779



ATTESTATION

Cette attestation est délivrée à :

Lynda Sabrina Ounaceur, doctorants, Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba.

Nesrine Djaber, doctorants, Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba.

Mostapha Hichem Zadam, doctorants, Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba.

Mahieddine Boumendjel, MCA, Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba.

Faiza Taibi, MCA, Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba.

Mahfoud Messarah, Professeur, Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba.

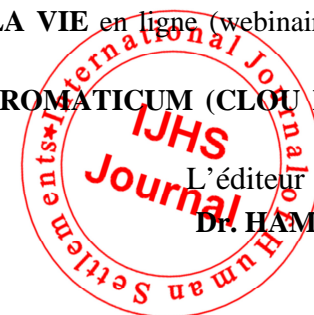
Amel Boumendjel, Professeur, Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale, Département de Biochimie, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba.

Pour leur participation au **SÉMINAIRE INTERNATIONAL SUR LES SCIENCES NATURELLES ET DE LA VIE** en ligne (webinaire), organisé par **International Journal of Human Settlements** le 19 et 20 Février 2021, avec un **poster** intitulé:

DÉTERMINATION DE L'EFFET HEPATOPROTECEUR DE L'EXTRAIT AQUEUX DE SYZYGIVM AROMATICUM (CLOU DE GIROFLE) DANS UN MODELE D'ASTHME EXPERIMENTAL.

Oran, Algerie

20/02/2021





République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
International Journal of Human Settlements
<https://www.aneau.org/ijhs/>
ISSN : 2588-1779



ATTESTATION

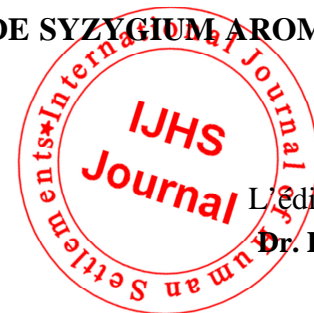
Cette attestation est délivrée à :

Lynda Sabrina Ounaceur Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar d'Annaba
Nesrine Djaber Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar d'Annaba
Mostapha Hichem Zadam Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar d'Annaba
Mahieddine Boumendjel Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar d'Annaba
Faiza Taibi Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar d'Annaba
Mahfoud Messarah Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar d'Annaba
Amel Boumendjel Laboratoire de biochimie et de toxicologie environnementale. Faculté des sciences. Université Badji Mokhtar d'Annaba

Pour leur participation au **SÉMINAIRE INTERNATIONAL SUR LES SCIENCES NATURELLES ET DE LA VIE** en ligne (webinaire), organisé par **International Journal of Human Settlements** le 19 et 20 Février 2021, avec un **poster** intitulé:

DÉTERMINATION DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE SYZYGIUM AROMATICUM (CLOU DE GIROFLE) DANS UN MODELE D'ASTHME EXPERIMENTAL.

Oran, Algerie
20/02/2021



L'éditeur

Dr. HAMMA Walid



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 20 Aout 1955 Skikda

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



ATTESTATION DE PARTICIPATION

Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale et Ecotoxicologie Environnementale
Skikda le 30_31 octobre 2019

Le Président du Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale et Ecotoxicologie Environnementale, atteste que:

Mme.: **LYNDA SABRINA OUNACEUR**

A présentée une communication *Affichée* intitulée

DOSAGES DES PRINCIPAUX COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DE L'EXTRAIT AQUEUX DE *SYZYGIUM AROMATICUM* (CLOU DE GIROFLE) EN PROVENANCE D'INDONÉSIE.

Co-auteurs : OUMAIMA TAGUIDA, NESRINE DJABER, MAHFOUD MESSARAH et AMEL BOUMENDJEL

Université 20 Aout-1955-Skikda-
Faculté des sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Président du SNBBMEE
Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale
Et Ecotoxicologie Environnementale
SNBBMEE-2019

Dr: LAIB MESSARAH



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mohamed Boudiaf de M'sila
Faculté des Sciences



Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Laboratoire de la biodiversité et techniques biotechnologiques de la valorisation
des ressources végétales (BTB-VRV)

**International Seminar on Biodiversity, Valorization and
Conservation of Urban and Forest Ecosystems:
(In support of sustainable development)**

28.29-.04.2021

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité scientifique du Séminaire atteste que :
Melle/Mme/Mr : **OUNACEUR Lynda Sabrina**
A présenté une **Communication affichée**

Intitulée : **Traditional uses of the clove (*Syzygium aromaticum*) in Algeria and measurements of the antioxidant power of its aqueous extract**

Co-auteurs : TAGUIDA Oumaima , DJABER Nesrine , MESSARAH Mahfoud et BOUMENDJEL Amel

Le Président du Séminaire
Dr. Rabah BOUNAR

Univ. M. B. M'Sila
Faculté des Sciences / SNV
28.29-.04.2021

عميد كلية العلوم
بن ساسي الطيب

Le Doyen de la Faculté des Sciences
Pr. Ettayib BENSACI



CERTIFICATE

Herewith we confirm that

LYNDA SABRINA OUNACEUR

attended the

3rd YTRB Network International Symposium,

20-22 May 2021, and participated

with a poster presentation entitled:

“Beneficial effects of aqueous extract of *syzygium aromaticum* (clove) concerning renal in an experimental asthma model”



Organizing committee