

UNIVERSITE –SAAD DAHLAB, BLIDA 1-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département De Biologie

THESE DE DOCTORAT

En Biotechnologie Végétale

**Etude phytochimique et pharmaco-toxicologique des
extraits de *Salvia chudaei* Batt et Trab : espèce endémique
du Sahara central.**

Par

Sabrina DIF

Devant le jury composé de :

F. SAIDI	Professeur, USD Blida 1	Présidente
D.CHABANE	Professeur, USTHB	Examinatrice
S. CHEMAT	Directeur de recherche, CRAPC	Examineur
F.NABI	MCA, Université de Medea	Examinatrice
A. ROUIBI	Professeur, USD Blida 1	Examineur
M.KHALI	Professeur, USD Blida 1	Rapporteur

Blida, 2024

RESUME

Ce travail représente une contribution à la valorisation des plantes médicinales du Sahara central algérien, mettant le point sur les activités biologiques des extraits de *Salvia chudaei* Batt et Trab, une espèce endémique récoltée à Tamanrasset.

Le screening phytochimique a révélé la présence de divers métabolites secondaires dans la plante, tels que les polyphénols, tanins, saponosides, anthraquinones, hétérosides, flavonoïdes et coumarines. Les dosages spectrophotométriques ont permis de quantifier les teneurs en polyphénols totaux (TPC), en flavonoïdes (TFC) et en tanins dans les différents extraits de *Salvia chudeai*.

L'analyse chromatographique par HPLC/UV-VIS des extraits (éthanolique et aqueux) a identifié plusieurs composés phénoliques, notamment des acides phénoliques dérivés de l'acide hydroxycinnamique tels que l'acide caféique, l'acide dihydroxy caféique.

L'huile essentielle des parties aériennes de la plante, obtenue par hydrodistillation, a été analysée par chromatographie en phase gazeuse seule et couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Cette analyse a révélé la présence de 26 composés, dont le bornyl acétate (34.09%) et l'alpha-pinène (24.22%) en tant que composés majoritaires.

L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée contre une gamme étendue de microorganismes (12 souches bactériennes, deux levures et quatre souches fongiques phytopathogènes). Les extraits de *Salvia chudaei* ont démontré une activité plus prononcée sur les bactéries Gram+ par rapport au Gram-, avec une sensibilité marquée de la souche *Sarcinea lutea* à l'huile essentielle ($\varnothing = 38,25 \pm 1,52$ mm).

L'extrait éthanolique a présenté l'effet antifongique le plus important, avec des taux d'inhibition de croissance mycélienne dépassant les 90% pour toutes les souches fongiques testées.

Le potentiel antioxydant des extraits évalué par quatre méthodes différentes : test de Phosphomolybdate, test de piégeage du radical diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), test de blanchiment de la β -carotène et pouvoir réducteur du Fer (FRAP), démontre une capacité remarquable à réduire différents types de radicaux libres, chacun avec une intensité variable.

L'administration orale à des souris des différents extraits (dose de 500 mg/kg) a significativement inhibé l'induction de contorsions abdominales par l'acide acétique. L'huile essentielle a affiché une protection notable de 94,48%, l'extrait éthanolique a atteint 64,82%, et l'extrait aqueux a montré un pourcentage de protection de 20,34%. Aucun signe de toxicité n'a été observé dans les tests d'innocuité, avec des DL50 supérieurs à 5g/Kg.

L'évaluation du pouvoir anti-inflammatoire, réalisée par la méthode d'induction d'œdème dans la patte de souris avec la carragénine, a révélé des pourcentages d'inhibition de l'inflammation de 66.79%, 51.43%, et 20.14% respectivement pour l'huile essentielle, l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux.

Mots clés : *Salvia chudaei* ; Screening phytochimique; Huiles essentielles ; Composés phénoliques ; Potentiel antioxydant ; Activités biologiques.

ABSTRACT

This study represents a contribution to the valorization of medicinal plants in the central Algerian Sahara, focusing on the biological activities of extracts from *Salvia chudaei* Batt and Trab, an endemic species of the Tamanrasset region.

Phytochemical screening revealed the presence of various secondary metabolites in the plant, such as polyphenols, tannins, saponins, anthraquinones, heterosides, flavonoids, and coumarins. Spectrophotometric assays quantified total polyphenol content (TPC), flavonoids (TFC), and tannins in different *Salvia chudeai* extracts.

HPLC/UV-VIS chromatographic analysis of the extracts (ethanolic and aqueous) identified several phenolic compounds, including hydroxycinnamic acid-derived phenolic acids such as caffeic acid and dihydroxy caffeic acid.

The essential oil from the aerial parts of the plant, obtained through hydrodistillation, was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). This analysis revealed the presence of 26 compounds, with bornyl acetate (34.09%) and alpha- pinene (24.22%) as major components.

Antimicrobial activity was assessed against a wide range of microorganisms (12 bacterial strains, two yeasts, and four phytopathogenic fungal strains). *Salvia chudaei* extracts exhibited stronger activity against Gram-positive bacteria compared to Gram-negative, with marked sensitivity of the *Sarcinea lutea* strain to the essential oil ($\emptyset = 38.25 \pm 1.52$ mm). The ethanolic extract showed the most significant antifungal effect, with mycelial growth inhibition rates exceeding 90% for all tested fungal strains.

The antioxidant potential of the extracts evaluated using four different methods: Phosphomolybdate test, diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test, β -carotene bleaching test and Ferric Reducing Power (FRAP) assay, demonstrate remarkable capacity to reduce various types of free radicals, with varying levels.

Oral administration to mice of different extracts (500 mg/kg dose) significantly inhibited the induction of abdominal contortions by acetic acid. The essential oil exhibited notable protection of 94.48%, the ethanolic extract reached 64.82%, and the aqueous extract showed a protection percentage of 20.34%. No signs of toxicity were been observed in safety tests, with LD50 values exceeding 5g/kg.

Evaluation of anti-inflammatory activity, using the carrageenan-induced paw edema method in mice, revealed inflammation inhibition percentages of 66.79%, 51.43%, and 20.14%, respectively, for the essential oil, ethanolic extract, and aqueous extract.

Keywords : *Salvia chudaei* ; Phytochemical screening; Essential oils; Phenolic compounds; Antioxidant potential; Biological activity.

ملخص

يمثل هذا البحث مساهمة في دراسة النباتات الطبية من وسط الصحراء الجزائرية، مع التركيز على الأنشطة البيولوجية لمستخلصات نبات سالفيا شوداي بات وتراب، وهو نوع ينبت في منطقة تمنراست.

كشف الفحص الكيميائي النباتي عن وجود العديد من المكونات الثانوية في النبات، بما في ذلك البوليفينول والعفص والسابونوسيدات والأنثراكينونات والمركبات غير المتجانسة والفلافونويدات والكومارين. استُخدمت مقاييس الطيف الضوئي لقياس مستويات البوليفينول الكلي والفلافونويدات والعفص في مستخلصات نبات سالفيا تشوداي المختلفة.

وحدد التحليل الكروماتوغرافي بالأشعة فوق البنفسجية المرئية وفوق البنفسجية (HPLC/UV-VIS) للمستخلصات (الإيثانولية والمائية) العديد من المركبات الفينولية، ولا سيما الأحماض الفينولية المشتقة من حمض الهيدروكسي سيناميك، مثل حمض الكافيين وحمض ثنائي هيدروكسي كافيك.

تم تحليل الزيت العطري من الأجزاء الهوائية للنبات، الذي تم الحصول عليه عن طريق التقطير المائي، بواسطة كروماتوغرافيا الغاز المقترنة بقياس الطيف الكتلي (GC-MS). كشف هذا التحليل عن وجود 26 مركباً، بما في ذلك أسيتات البورنيل (34.09%) وألفا-بينين (24.22%) كمركبات رئيسية. تُدرس النشاط المضاد للميكروبات ضد مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة (12 سلالة بكتيرية، وخمائر اثنتان وأربع سلالات فطرية ممرضة للنباتات). أظهرت مستخلصات سالفيا تشوداي نشاطاً أكثر وضوحاً ضد البكتيريا + جرام أكثر من البكتيريا + جرام، مع حساسية ملحوظة لسلالة سارسينيا لوتيا للزيت العطري (38.25 ± 1.52) (Ø) ملم.

أظهر المستخلص الإيثانولي أكبر تأثير مضاد للفطريات، مع معدلات تثبيط لنمو الفطريات تزيد عن 90% لجميع السلالات الفطرية التي تم اختبارها.

أظهرت إمكانات المستخلصات المضادة للأكسدة، التي تم تقييمها بأربع طرق مختلفة: اختبار فوسفوموليدات واختبار مسح الجذور ثنائي الفينيل بيكريليهيرازيل (DPPH) واختبار تبييض بيتا كاروتين واختبار قوة اختزال الحديد (FRAP)، قدرة ملحوظة على تقليل أنواع مختلفة من الجذور الحرة، كل منها بكثافة متفاوتة.

وقد أدى إعطاء المستخلصات المختلفة عن طريق الفم للفئران (جرعة 500 مجم/كجم) إلى تثبيط تحريض تشوهات البطن بواسطة حمض الأسيتيك بشكل ملحوظ. أظهر الزيت العطري حماية كبيرة بنسبة 94.48%، والمستخلص الإيثانولي 64.82%، والمستخلص المائي 20.34%.

لم تلاحظ أي علامات على السمية في اختبارات السلامة، مع وجود قيم للجرعة المميتة 50 تزيد عن 5 جم/كجم.

كشف تقييم القوة المضادة للالتهابات، باستخدام طريقة تحريض الودمة في مخالب الفئران باستخدام الكاراجينان، عن نسب تثبيط الالتهاب بنسبة 66.79% و 51.43% و 20.14% على التوالي للزيت العطري والمستخلص الإيثانولي والمستخلص المائي.

الكلمات المفتاحية: سالفيا تشوداي؛ فحص كيميائي نباتي؛ زيوت عطرية؛ مركبات الفينول؛ مضادات الأكسدة؛ نشاط بيولوجي.

REMERCIEMENTS

Je remercie très sincèrement Monsieur M. KHALI, Professeur à l'Université de Blida 1, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer cette thèse, ses conseils, son soutien et son encouragement. Je tiens également à le remercier de toute la patience dont il a su faire preuve au cours de la réalisation de ce travail, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et de mon profond respect.

Je remercie également Madame F. SAÏDI, Professeur à l'Université de Blida 1, d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse. Veuillez croire en l'expression de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Madame D.CHABANE, Professeur à l'USTHB, Monsieur S. CHEMAT, Directeur de recherche (CRAPC), Madame F. NABI, Maître de conférence A à l'Université de Médéa, ainsi que Monsieur A. ROUIBI, Professeur à l'Université de Blida 1, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et surtout pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Aussi, je voudrai exprimer ma reconnaissance à toute l'équipe de la Filiale Antibiotical SAIDAL de Médéa et les ingénieurs des laboratoires pédagogiques de l'Université Yahia Fares de Médéa, qui m'ont aidé à avancer dans ce travail.

Je tiens également à remercier sincèrement Mr Salim H. AISaidi du Département Chimie de l'Université Sultan Quabos - Oman, pour son aide dans l'analyse des huiles essentielles par CG/MS. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

A la fin je voudrais remercier toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

TABLE DE MATIERES

RESUME
ABSTRACT

ملخص

REMERCEMENTS
TABLE DE MATIERES
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES
INTRODUCTION

1

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : PRESENTATION DE LA PLANTE

I.1. Famille des Lamiaceae	4
I.2. Genre Salvia	5
I.2.1. Répartition géographique	5
I.2.2. Composition chimique	6
I.2.3. Propriétés pharmacologique	10
I.3. Espèce <i>Salvia chudaei</i> Battendier et Trabut	15
I.3.1. Nomenclature	15
I.3.2. Position systématique	15
I.3.3. Description botanique	15
I.3.4. Répartition géographique	16
I.3.5. Propriétés et usages	17

CHAPITRE II : METABOLITES SECONDAIRES

II.1. Composés phénoliques	18
II.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques	18
II.1.2. Classification des composés phénoliques	21
II.1.2.1. Les acides phénoliques	21
II.1.2.2. Flavonoïdes	21
II.1.2.3. Tanins	24
II.2. Les huiles essentielles	26
II.2.1. Composition chimique	26
II.2.1.1. Terpènes	27
II.2.1.2. Alcools	27
II.2.1.3. Aldéhydes	27
II.2.1.4. Acides	27
II.2.1.5. Esters	27
II.2.1.6. Cétones	28
II.2.1.7. Lactones	28

CHAPITRE III : ACTIVITES BIOLOGIQUES

III. Activités biologiques	29
III.1. Activité antimicrobienne	30
III.2. Activité antioxydante	32
III.3. Activité anti-inflammatoire	33
III.4. Autres activités	35

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	41
I.1. Matériel végétal	41
I.2. Souches bactériennes	42
I.2. Souches fongiques	44
I.4. Animaux d'expérimentation	44
II. Méthodes	44
II.1. Etude phytochimique de la plante	46
II.1.1. Screening phytochimique	46
II.1.1.1. Recherche des alcaloïdes	46
II.1.1.2. Recherche des tanins	46
II.1.1.3. Recherche des flavonoïdes	47
II.1.1.4. Recherche des leucoanthocyanes	47
II.1.1.5. Recherche des anthocyanes	47
II.1.1.6. Recherche des dérivés anthracéniques	47
II.1.1.7. Recherche des saponosides	48
II.1.1.8. Recherche des composés réducteurs	48
II.1.1.9. Recherche des coumarines	48
II.1.1.10. Recherche du mucilage	48
II.1.2. Préparation des extraits	48
II.1.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique par macération	48
II.1.2.2. Préparation de l'extrait éthanolique par Soxhlet	49
II.1.2.3. Préparation de l'extrait éthanolique par ultrasons	49
II.1.2.4. Préparation de l'extrait aqueux	50
II.1.2.5. Calcul du rendement	50
II.1.3. Détermination de la teneur en Polyphenols totaux (TPC)	51
II.1.4. Détermination de la teneur en Flavonoïdes(TFC)	51
II.1.5. Détermination de la teneur en Tanins	52
II.1.6. Analyse des extraits par HPLC /UV-VIS	52
II.1.7. Extraction de l'huile essentielle	53
II.1.7.1. Calcul du rendement	54
II.1.7.2. Analyse de l'huile essentielle par CG/MS	54
II.2. Etude des activités biologique	57
II.2.1. Activité antibactérienne	57
II.2.1.1. La méthode de diffusion sur milieu solide	57
II.2.1.2. La détermination de la concentration minimale inhibitrice	58
II.2.2. Activité antifongique	59
II.2.3. Activité antioxydante	60
II.2.3.1. Capacité antioxydante totale	61
II.2.3.2. Test du piégeage des radicaux libre DPPH	61
II.2.3.3. Test de blanchiment du β -carotène	62
II.2.3.4. Pouvoir réducteur du Fer (FRAP)	63
II.2.4. Toxicité aigue	63
II.2.5. Activité analgésique	64

II.2.6. Activité anti-inflammatoire	65
II.2.7. Analyse statistique	66

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats de l'étude phytochimique	67
I.1. Screening phytochimique	67
I.2. Préparation des extraits	69
I.3. Quantification de composés phénoliques	70
I.4. Analyse chromatographique par HPLC/UV-VIS	74
I.5. Extraction de l'huile essentielle	80
I.6. Analyse de l'huile essentielle par CG/MS	80
II. Résultats de l'étude des activités biologiques des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	85
II.1. Activité antibactérienne	85
II.2. Activité antifongique	90
II.2.1. Evaluation de l'effet fongicide ou fongistatique des extraits	93
II.3. Evaluation de l'activité antioxydante	96
II.3.1. Capacité antioxydante totale	98
II.3.2. Test du DPPH	98
II.3.3. Test du blanchiment du β carotène	100
II.3.4. test FRAP	102
II.4. Toxicité aigue	105
II.5. activité analgésique et anti-inflammatoire	106
CONCLUSION	116

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

APPENDICES

A. APPAREILLAGE

B. ANALYSE DES EXTRAITS PAR HPLC-UV/VIS

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1.1	Répartition géographique du genre <i>Salvia</i> dans le monde	6
Tableau 1.I	Composition chimique des huiles essentielles des espèces <i>Salvia</i>	8
Tableau 1.II	Utilisations des espèces <i>Salvia</i> en médecine traditionnelle	11
Figure 1.2	Répartition géographique de <i>Salvia chudaei</i> Batt et Trab	17
Figure 1.3	Voies de biosynthèse des composés phénoliques	20
Figure 1.4	Structure de base des flavonoïdes	21
Figure 1.5	Classification des flavonoïdes	22
Figure 1.6	Structure de base des flavones	23
Figure 1.7	Structure de base des flavonols	23
Figure 1.8	Structure de base des chalcones	24
Figure 1.9	Structure de base des anthocyanidines	24
Figure 1.10	Structure de base de tanin hydrolysable et tanin condensé	25
Tableau 1.III	Activités pharmacologiques de quelques espèces <i>Salvia</i>	36
Figure 2.1	Présentation de la zone d'échantillonnage	41
Tableau 2.I	Gamme des souches microbiennes testées	43
Figure 2. 2	Représentation de la première partie : Etude phytochimique de la plante	46
Tableau 2.II	Conditions opératoires de HPLC/UV-VIS	53
Tableau 2.III	Conditions opératoires de CG/MS	55
Figure 2.3	Rerésentation de la deuxième partie : Etude des activités biologiques de la plante	56
Tableau 2.IV	Résultats du screening phytochimique	68
Tableau 2.V	Rendements des extractions	70
Tableau 2.VI	Teneurs en composés phénoliques	71
Figure 2.4	Teneurs en polyphénols totaux (TPC), flavonoïdes(TFC) et tanins par différents procédés d'extraction	72
Figure 2.5	Profil chromatographique par HPLC-UV/VIS de l'extrait éthanolique de <i>salvia chudaei</i>	75
Figure 2.6	Profil chromatographique par HPLC-UV/VIS de l'extrait aqueux de <i>salvia chudaei</i>	76
Tableau 2.VII	Identification et quantification des composés phénoliques des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	78
Tableau 2.VIII	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia chudaei</i>	81
Figure 2.7	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia chudaei</i>	82
Tableau 2.VIII	Résultats de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	86
Figure 2.8	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium redolens</i> sous l'effet des différentes doses des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	91
Figure 2.9	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium solani</i> sous l'effet des différentes doses des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	92

Figure 2.10	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> sous l'effet des différentes doses des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	92
Figure 2.11	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium equisti</i> sous l'effet des différentes doses des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	93
Tableau 2.X	Effet fongicide ou fongistatique des extraits	94
Figure 2.12	Activité antifongique des extraits sur les souches testées	95
Tableau 2.XI	Activités antioxydante des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	97
Figure 2.13	Pourcentage de réduction du DPPH par les différents extraits de <i>Salvia chudaei</i>	99
Figure 2.14	Activité antipéroxydase des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	101
Figure 2.15	Pouvoir réducteur du Fer des différents extraits de <i>Salvia chudaei</i> et les standards	102
Figure 2.16	Réduction du nombre de contractions entre le lot témoin et les lots traités	107
Figure 2.17	Pourcentage de protection des différents extraits testés	108
Figure 2.18	Activité antiinflammatoire des extraits de <i>Salvia chudaei</i>	109
Figure 2.19	Evolution de l'œdème chez le lot témoin et les lots traités par les différents extraits et le Diclofenac (50mg/Kg)	110
Figure 2.20	Pourcentage d'inhibition de l'inflammation INH% des différents extraits	111

INTRODUCTION

Les plantes médicinales occupent une place essentielle dans le monde, tant sur le plan historique que contemporain. Depuis des millénaires, les civilisations du monde entier utilisent les ressources naturelles pour traiter une variété de maux, allant des simples affections aux maladies chroniques [2]. Leur importance transcende les frontières culturelles et géographiques, car de nombreuses communautés dépendent encore largement de ces remèdes pour leur bien-être. De plus, avec l'intérêt croissant pour les médecines alternatives et complémentaires, les plantes médicinales connaissent une renaissance dans de nombreux pays industrialisés. Leur valeur va au-delà de leur efficacité thérapeutique, englobant également des aspects culturels, économiques et écologiques, car leur utilisation durable peut contribuer à la préservation de la biodiversité et au soutien des communautés locales [3].

De par sa position biogéographique, l'Algérie offre une très grande diversité écologique et floristique, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique [4]. L'étude phytochimique et pharmacologique de ces espèces endémiques, revêt une importance capitale dans la préservation de la biodiversité, le développement de nouvelles thérapies médicales et l'innovation dans divers secteurs industriels. Les espèces végétales endémiques, qui ne se trouvent que dans des régions géographiques spécifiques, sont souvent riches en composés chimiques uniques, adaptés à leur environnement particulier. Leur exploration offre ainsi un potentiel considérable pour la découverte de nouvelles molécules aux propriétés thérapeutiques remarquables. [5].

En Algérie, l'industrie pharmaceutique en général, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi que les principes actifs sont étudiés depuis plusieurs années [6]. Les ressources végétales spontanées du Sahara constituent une flore d'environ 500 espèces de plantes supérieures, dont une partie est utilisée par

les populations comme plantes médicinales. L'étude de ces plantes permet de comprendre les mécanismes d'action de ces remèdes traditionnels et d'identifier les principes actifs responsables de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine[7].

Outre leur importance médicinale, les plantes endémiques jouent un rôle crucial dans la préservation de la biodiversité. Leur exploitation raisonnée et durable est essentielle pour préserver ces écosystèmes fragiles et maintenir l'équilibre écologique.

Pour contribuer à la sauvegarde du patrimoine national lié à l'utilisation des plantes spontanées en médecine traditionnelle, nous nous sommes fixé comme objectif de valoriser une plante endémique du Sahara Central Algérien : *Salvia chudaei* Batt. & Trab, (Lamiaceae) à travers l'étude de sa composition chimique et l'étude de certaines activités biologiques de ses extraits.

Cette étude se focalise sur l'analyse phytochimique de la plante, cherchant à identifier et caractériser les composés chimiques responsables de ses propriétés thérapeutiques. Des techniques performantes d'analyse, telles que HPLC/UV-VIS et CG/MS, seront employées pour déterminer la présence et la concentration de divers composés, tels que les poly phénoliques, les flavonoïdes, les terpènes, et autres métabolites d'intérêt. Cette approche permettra d'obtenir un profil phytochimique détaillé de la plante, jetant ainsi les bases d'une compréhension approfondie de sa composition chimique.

Parallèlement, l'analyse pharmaco-toxicologique se concentrera sur des approches telles que des études *in vitro* et *in vivo* pourraient être employées afin d'évaluer les effets pharmacologiques de la plante, comprenant des investigations sur son activité antimicrobienne, son activité antioxydante, son activité analgésique, son activité anti-inflammatoire, ainsi que l'évaluation de sa toxicité.

Le développement de cette étude se déroulera en deux grandes parties distinctes. La première partie consistera en une synthèse bibliographique approfondie, composée de trois chapitres distincts. Le premier chapitre sera dédié à la présentation de la plante étudiée. Le deuxième chapitre se concentrera sur les métabolites secondaires, détaillant leur nature, leur composition chimique. Enfin, le troisième chapitre abordera les activités biologiques associées à la plante.

La deuxième partie, quant à elle, sera consacrée à la partie expérimentale de l'étude. Elle englobera une description détaillée du matériel utilisé dans les différentes manipulations, ainsi qu'une présentation des méthodes employées pour mener à bien les expérimentations. L'analyse et l'interprétation des résultats obtenus seront également incluses dans cette section, offrant une compréhension approfondie des données recueillies au cours de l'étude.

Enfin, une conclusion générale sera présentée pour synthétiser l'ensemble de l'étude. Cette conclusion mettra en lumière les résultats les plus marquants et significatifs obtenus au cours de la recherche. Elle offrira également des perspectives futures possibles, ouvrant la voie à de potentielles extensions de cette étude et suggérant des pistes pour des recherches ultérieures.

CHAPITRE I

PRESENTATION DE LA PLANTE

I.1.Famille des Lamiaceae

La famille des Lamiaceae, également connue sous le nom de labiées, tire son nom du mot latin "labia", signifiant "lèvre", en référence à la forme caractéristique à deux lèvres de ses fleurs. Cette famille comprend environ 6970 espèces réparties en 240 genres. Elle a été l'une des premières à être distinguée par les botanistes en raison de ses caractères particuliers. Ces plantes sont généralement herbacées, odorantes, avec des tiges quadrangulaires et des feuilles opposées sans stipules. Les fleurs, le plus souvent hermaphrodites et pentamères [8], sont regroupées en cymes axillaires plus ou moins contractées, ressemblant souvent à des verticilles, ou condensées en épis fruitiers constitués de 4 akènes plus ou moins soudés par leur face interne [9].

Les caractéristiques distinctives de cette famille sont les suivantes :

- Une corolle gamopétale irrégulière à deux lèvres, avec deux pétales formant la lèvre supérieure et trois formant la lèvre inférieure.
- Quatre étamines, dont deux sont plus longues que les autres.
- Un ovaire composé de deux carpelles séparés par une cloison, formant ainsi quatre loges contenant chacune une graine (tétrachaine).
- Des feuilles opposées et souvent une tige de section carrée.

Ces caractéristiques varient selon les genres : certaines ont une corolle presque régulière (comme *Mentha*) tandis que d'autres ont une corolle uni labiée (comme *Teucrium*) [10] ; [11].

Les plantes de la famille des Lamiaceae sont principalement méditerranéennes [12], se rencontrant principalement dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar, à l'exception de trois espèces plus répandues, *Marrubium deserti*, *Salvia*

chudaei et *Teucrium polium* [11]. Cette famille est très représentée dans la flore algérienne, bien que certains genres soient difficiles à déterminer en raison de l'extrême variabilité des espèces [10].

I.2. Genre Salvia

Le mot "Salvia" provient du latin "Salvare", signifiant "guérir" ou "sauver". Cette plante est considérée comme une plante magique qui peut sauver des vies humaines [13]. Le genre *Salvia*, également connu sous le nom de Sauge, fait partie des genres les plus importants de la famille des Lamiacées, comptant près de 900 espèces réparties dans le monde entier. En Algérie, on dénombre 23 espèces du genre *Salvia* [10]. Ces plantes se présentent sous la forme d'arbustes ou de plantes herbacées, avec un calice bilabié présentant des lèvres supérieures tridentées et des lèvres inférieures bidentées. La corolle est également bilabiée, avec deux étamines munies d'un filet court surmonté d'un long connectif comportant deux branches inégales. L'une des branches porte une loge d'anthère et l'autre, plus courte, se termine en pointe ou en écaille [10].

I.2.1. Répartition géographique

Les espèces de *Salvia* sont largement réparties dans les régions tempérées, subtropicales et tropicales du monde entier, à la fois dans l'Ancien Monde et dans le Nouveau Monde : en Amérique centrale et du Sud (plus de 500 espèces), en Asie centrale et en Méditerranée (plus de 250 espèces) et en Asie de l'Est (plus de 90 espèces) [14].

Certaines espèces sont cultivées dans le monde entier, tandis que d'autres poussent uniquement dans des endroits spécifiques en tant qu'endémismes. Par exemple, *S. fruticosa* Mill. est un endémisme du bassin méditerranéen oriental et *S. canariensis* L. est une plante endémique des îles Canaries [15]. Cinquante-huit espèces du genre *Salvia* existent en Iran, dont dix-sept sont endémiques de cette région [16].

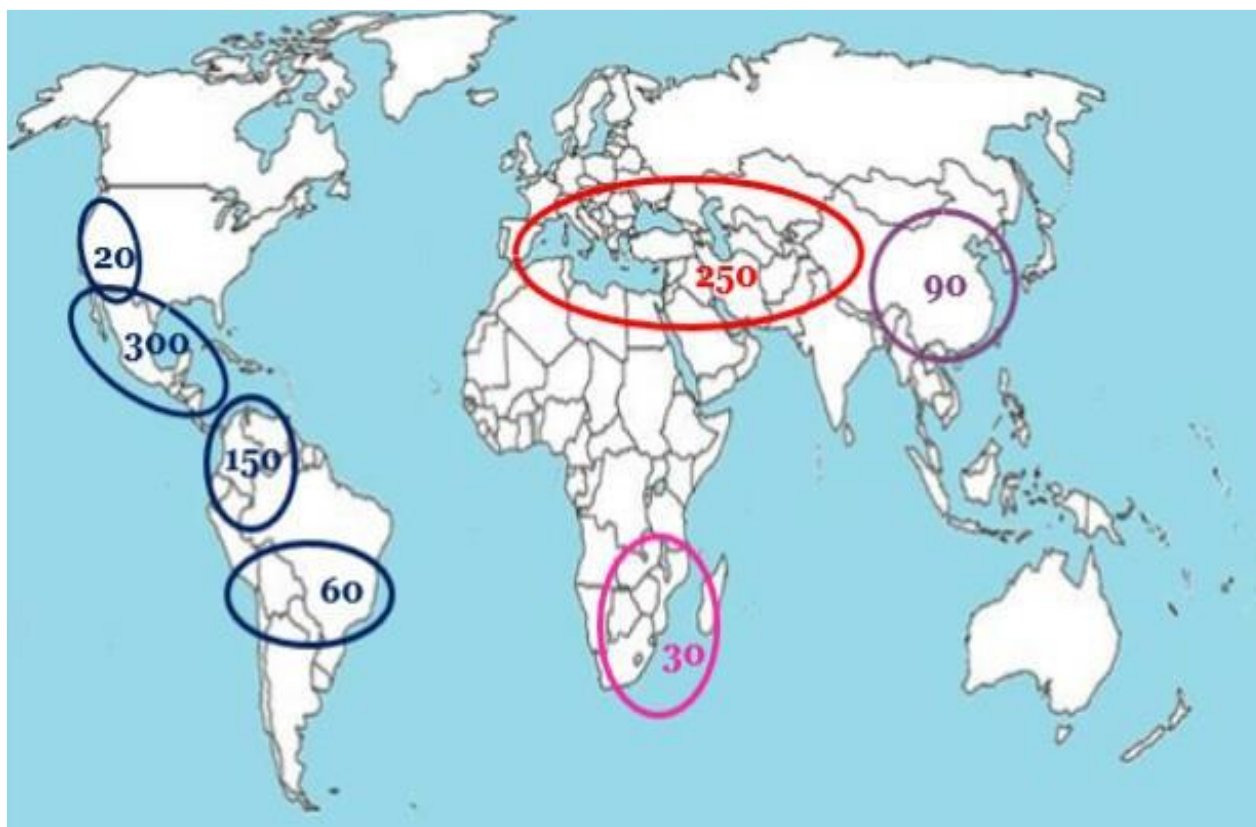


Figure 1.1 : Répartition géographique des espèces du genre *Salvia* dans le monde [14]. (20,30,60,90,150,250,300 représentent le nombre d'espèces dans chaque continent)

I.2.2. Composition chimique

Le genre *Salvia* représente une source précieuse de composés biologiquement actifs. Les principaux composés bioactifs des espèces de *Salvia* sont probablement les dérivés terpéniques (mono-, di- et tri-terpénoïdes). D'autres groupes chimiques présents comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins [17].

Les composés phénoliques, les monoterpénoïdes et les triterpénoïdes sont généralement présents dans les parties aériennes, tandis que les diterpénoïdes sont les principaux composés dans les racines des plantes *Salvia* [18].

De nombreux composés portent le nom de *Salvia*, tels que la salvine (diterpénoïde), la salvinorine (diterpénoïde), la salvihipine (diterpénoïde), l'acide salvianolique (dérivé d'acide phénolique), la salvigénine (flavone), le sclaréol (diterpénoïde) et d'autres. Cette grande diversité du genre *Salvia* et la richesse phytochimique suscitent un grand intérêt pour la découverte de nouveaux composés biologiquement actifs. Récemment, la salvihipine A et son glycoside, deux

diterpénoïdes néoclerodanes, ont été isolés à partir des parties aériennes de *Salvia hispanica* [19].

La composition phytochimique des huiles essentielles est très diversifiée, mais généralement, ce sont les composés hydrocarbonés et oxygénés qui contribuent principalement à leurs propriétés antioxydantes [20]. À titre d'exemple, plus de 120 composants ont été caractérisés dans l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes de *S. officinalis* [21]. En général, la composition de l'huile essentielle des espèces *Salvia* est constituée de mono terpènes hydrocarbonés, de mono terpènes oxygénés, de sesquiterpènes hydrocarbonés, de sesquiterpènes oxygénés et d'autres composés cyclo aliphatiques (composés non terpéniques structurellement liés aux terpènes cycliques) ainsi que de composés aromatiques [22]

Tableau 1.1 : Composition chimique des huiles essentielles de quelques espèces *Salvia*

Eespèce <i>Salvia</i>	Régions géographique	Stade phénologique	Partie de la plante	Composition chimique	Référence
<i>Salvia chudaei</i>	Algérie	Floraison	Parties aériennes	Acétate de bornyle (20,5 %), β -eudesmol (13,6 %), β -caryophyllène (10,6 %), valencène (9,3 %), τ -cadinol (9,3 %), α -pinène (6,9 %), γ -cadinène (5,8 %)	[23]
<i>S. officinalis</i>	Chine	floraison	Feuilles	β -thujone (14.86%), eucalyptol (14.82%), camphor (12.7%)	[24]
<i>S. officinalis</i>	Albania	Pleine floraison	Feuilles	Camphor (26.6 %–43.8%), α -thujone (15.9%–30.7%), 1,8-cineole (8.4 %–14.7%)	[25]
<i>S. hypoleuca</i>	Iran	Floraison	Parties aériennes	Bicyclogermacrène (1,5-37,3 %), β -pinène (2,1-29,8 %), α -pinène (1,4-29,3 %), (E)-caryophyllène (2,1-21,7 %)	[26]

Tableau 1.I : Composition chimique des huiles essentielles de quelques espèces *Salvia* (suite 1)

<i>S. miltiorrhiza</i>	Chine	Floraison	Feuilles	β -caryophyllène (11,05 %), oxyde d'aromadendrène (8,3 %), oxyde de caryophyllène (7,93 %), α -cadinol (7,31 %), germacrène D (6,82 %), 1-octen-3-ol (6,43 %)	[24]
<i>S. leriifolia</i>	Iran	Floraison	Parties aériennes	Camphor (12,0-39,9 %), 1,8-cinéole (3,6-21,8 %), β -pinène (8,7-18,1 %), α -pinène (4,4-10,0 %), bornéol (2,4-9,2 %), Δ -cadinène (3,5-6,5 %)	[27]
<i>S. lavandulifolia</i>	Espagne	Stade végétatif	Parties aériennes	1,8-cinéole (13,5-31,9 %), camphor (14,4-23,9 %)	[28]
<i>S. lavandulifolia</i>	Espagne	floraison	Parties aériennes	1,8-cinéole (31,30 %), camphor (15,59 %), β -pinène, (11,83 %), α -pinène (7,52 %), camphène (6,27 %)	[28]
<i>S. lanigera</i>	Chypre	Stade végétatif	Parties aériennes	Thymol (12,1 %), acide hexadécanoïque (6,0 %), carvacrol, α -thujone (5,7 %), β -thujone (3,8 %)	[29]

I.2.3. Propriétés pharmacologiques

Le genre *Salvia* est très utilisé en pharmacopée traditionnelle. Divers usages thérapeutiques sont connus depuis l'antiquité et ayant été validés par des tests biologiques appropriés. Les activités biologiques pour lesquelles ces espèces sont utilisées sont très diverses, on peut citer : l'activité anti cholinestérase, antibactérienne, antioxydante, antifongique, anti-inflammatoire et anticancéreuses [29 ; 31 ; 40]

Tableau 1.II : Utilisations des espèces du genre *Salvia* en médecine traditionnelle

Espèce de <i>Salvia</i>	Utilisation	Partie Utilisée	Préparations	Méthode d'utilisation	Lieu	Références
<i>S. officinalis</i>	Douleurs dentaires, périodontite, infections, maux d'estomac, troubles digestifs, coliques dans le tractus gastro-intestinal, flatulences, diarrhée, antibactérien, gingivite, affections cutanées, infections du système urogénital, infections chez les femmes, toux, autres infections du système respiratoire	Feuilles, Fleurs, Parties aériennes, Herbe	Baume, Thé, Décoction, Infusion, Sirop, Infusion à boire ou gargariser ; feuille fraîche à mâcher	Interne, Externe. Rinçage de la bouche, voie vaginale, interne (toux - avec du miel)	Bosnie- Herzégovine, Égypte, Irak, Palestine, Liban, Serbie, Slovénie, Italie, Kosovo, Roumanie, Serbie	[30];[31] ; [32]; [33];[34];[35];[36];[37] ;[38];[39]

Tableau 1.II : Utilisations des espèces du genre *Salvia* en médecine traditionnelle (suite 1)

Espèce de <i>Salvia</i>	Utilisation	Partie Utilisée	Préparations	Méthode d'utilisation	Lieu	Références
<i>S. fruticosa</i>	Anti-toux, anti-diarrhée, maux de gorge, troubles intestinaux gazeux, brûlures d'estomac, flatulence, antiseptique, vaginite	Feuilles fraîches, Feuilles séchées, Pousses, Fleurs,	Infusion, Huile volatile	Interne, Externe	Chypre, Turquie	[40];[41] ;[42]
<i>S. chudaei</i>	Maladies digestives (diarrhée, ulcère), maladies rénales et infections des voies urinaires	Feuilles, Parties aériennes	Décoction, Poudre, Infusion	Interne, Externe	Algérie	[43];[44]
<i>S. aegyptiaca</i>	Maladies digestives	Graines, Parties aériennes	Infusion, Décoction	Interne	Algérie	[43]

Tableau 1.II : Utilisations des espèces du genre *Salvia* en médecine traditionnelle (suite 2)

Espèce de <i>Salvia</i>	Utilisation	Partie Utilisée	Préparations	Méthode d'utilisation	Lieu	Références
<i>S. multicaulis</i>	Traitement des troubles gastriques	Herbe	Thé	Médecine interne	Liban	[32]
<i>S. hydrangea</i>	Troubles stomacaux	Herbe	Infusion	Médecine interne	Turquie	[45]
<i>S. glutinosa</i>	Traiter les douleurs abdominales	Feuilles	Décoction	Interne	Italie	[33]
<i>S. grandiflora</i>	Maux d'estomac	Feuilles, Fleurs	Thé	Interne	Bosnie-Herzégovine	[46]
<i>S. leucantha</i>	Maux d'estomac	Feuilles	Infusion	Orale	Mexique	[47]
<i>S. pratensis</i>	Traiter les douleurs abdominales, maux d'estomac et maladies de la peau	Feuilles, Fleurs	Décoction, Thé, Infusion	Interne	Italie, Bosnie-Herzégovine	[33]

Tableau 1.II : Utilisations des espèces du genre *Salvia* en médecine traditionnelle (suite 3)

Espèce de <i>Salvia</i>	Utilisation	Partie Utilisée	Préparations	Méthode d'utilisation	Lieu	Références
<i>S. rubifolia</i>	Toux	Feuilles, Jeunes pousses	Infusion	Orale	Liban	[32]

I.3. Espèce *Salvia chudaei*

La flore Algérienne compte 23 espèces du genre *salvia*, dont une espèce endémique du Sahara Central [10]. Elle a été découverte par deux explorateurs naturalistes E.F.Gautier et R.Chudeau après la soumission de Hoggar en 1902. Ces deux derniers, récoltent de nombreux végétaux dans les régions qu'ils parcourent et décrivent un certain nombre de nouveautés, parmi lesquelles une remarquable Sauge, la *Salvia Chudaei*. Ils donnent un aperçu déjà très instructif de la Flore des plaines et des basses montagnes du Sahara Central.

I.3.1. Nomenclature

Nom scientifique : *Salvia chudaei*

Nom français : La sauge de Sahara

Nom vernaculaire : aouit, tagrouft

Nom tamahaq : Abhihawt [48]

I.3.2. Position systématique selon APG IV 2016 [49]

Clade : Plantae

Clade : Spermaphytes

Clade : Angiospermes

Clade : Eudicotylédones

Clade : Super Astérideae

Clade : Astérideae

Clade : Lamiideae

Ordre : Lamiales.

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia chudaei*

I.3.3. Description botanique

Cette sauge se présente comme un arbrisseau vivace très rameux, de couleur gris bleuté. Elle mesure environ 30 à 40 cm de haut et possède des tiges striés très feuillues. Les feuilles sont étroites et allongées, crispées sur la marge. A l'extrémité des tiges, les inflorescences en épis portent de longs poils laineux qui masquent les

petites fleurs d'un bleu pâle. La plante entière dégage une odeur puissante et agréable, un peu camphrée [7].

➤ Feuilles

Les feuilles sont crénelées, longue et très étroites, souvent en fascicules [7].

➤ Fleurs

Les inflorescences sont en épis portant de longs poils laineux qui masquent de petites fleurs. Le calice est laineux et les pétales sont de couleurs bleu pâle de 5 à 8 mm de longueur [11].

➤ Fruit

Le fruit est un akène lisse. Il est de couleur brun foncé ou noir. Ce dernier est de forme globuleuse [50]

I.3.4. Répartition géographique

Salvia chudaei est une espèce caractéristique d'endémisme continentale insulaire des montagnes sahariennes ou certaines d'entre elles : Hoggar, Tefedest, Tassili des Ajjjer et Tibesti. On retrouve cette plante par petites touffes dans les sites de haute altitude supérieur à 1200m comme : Idelis, Tazrouk, Tahifet, Tehrhananet et Tinsawak [45].

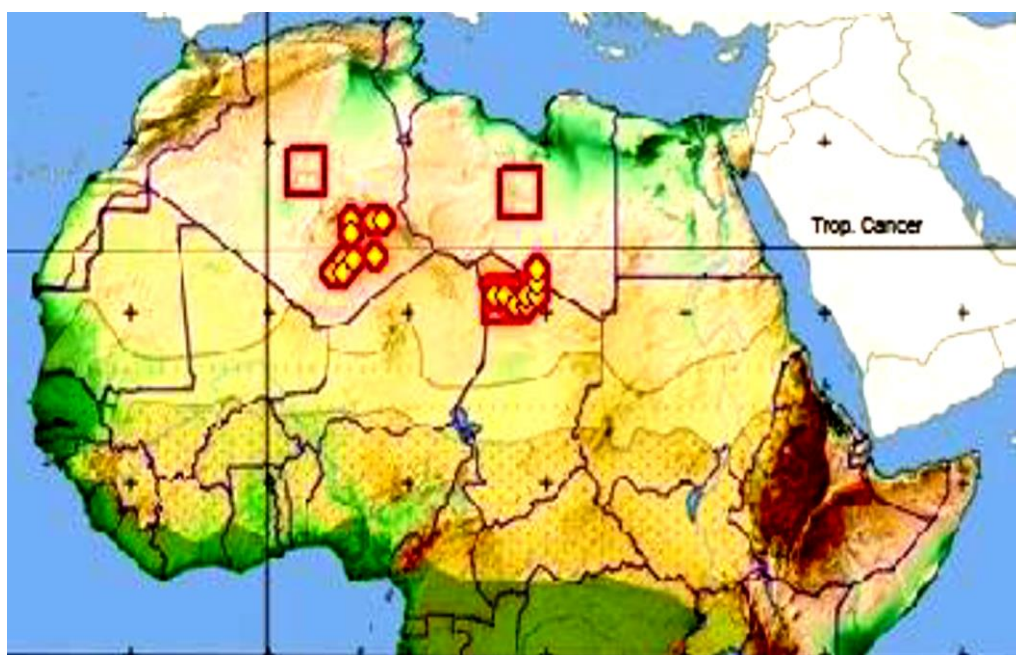


Figure 1.2 : Répartition géographique de *Salvia chudaei* [51].

I.3.5. Propriétés et usages

La plante dégage une agréable odeur et possède de nombreux usages médicaux et culinaires. Elle est utilisée pour traiter les rhumatismes et soulager les ulcères d'estomac. On peut la consommer sous forme de poudre ajoutée aux aliments ou mélangée avec de l'eau. Les Touaregs utilisent l'Awhihat pour aromatiser leur thé, et en cuisine, elle est utilisée comme condiment dans certains plats, notamment avec la viande et les bouillies de mil. De plus, elle peut être utilisée comme pâturage [11]; [52].

CHAPITRE II

METABOLITES SECONDAIRES

II .1 Composés phénoliques

Les composés phénoliques, également connus sous le nom de polyphénols, forment une vaste famille de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Cette famille compte plus de 8000 structures identifiées, allant des simples acides phénoliques aux substances hautement polymérisées comme les tanins [53] ; [54]. Les polyphénols se caractérisent par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, pouvant être libre ou engagé dans d'autres fonctions telles que les éthers, les esters ou les hétérosides [1].

Ces composés sont synthétisés par l'ensemble des plantes, et ils jouent un rôle crucial dans les réponses de défense face à divers stress, qu'ils soient d'origine biotique (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotique (exposition à la lumière, rayonnements UV, températures basses, carences) [55].

Les composés phénoliques sont d'une importance fondamentale dans la qualité sensorielle (couleur et caractéristiques organoleptiques) et nutritionnelle des végétaux tels que les légumes, les fruits, les céréales, les fruits secs, ainsi que dans des boissons populaires telles que le café, le cacao ou le thé. Une alimentation équilibrée fournit à l'Homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, ce qui représente dix fois plus que la quantité de vitamine C et cent fois plus que celle de caroténoïdes ou de vitamine E [56].

II.1.1 Biosynthèse des composés phénoliques

La biosynthèse des polyphénols se produit à travers deux principales voies métaboliques, à savoir la voie de **l'acide shikimique** et la voie de **l'acétate/malonate**. La voie prédominante implique la transformation de l'acide shikimique, une composante du métabolisme primaire, pour produire les acides aminés aromatiques essentiels : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ces acides aminés jouent

le rôle de précurseurs dans la biosynthèse de nombreux composés naturels secondaires, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines et les alcaloïdes [57].

Quant à la deuxième voie, elle fait intervenir la glycolyse et la β -oxydation pour générer de l'acétyl CoA, qui est ensuite transformé en malonate. Cette voie est responsable de la cyclisation des chaînes polycétoniques, formées par la répétition de l'unité "Acétate," par le biais de la carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase, conduisant à la formation de composés tels que les chromones, les coumarines, , les quinones [58].

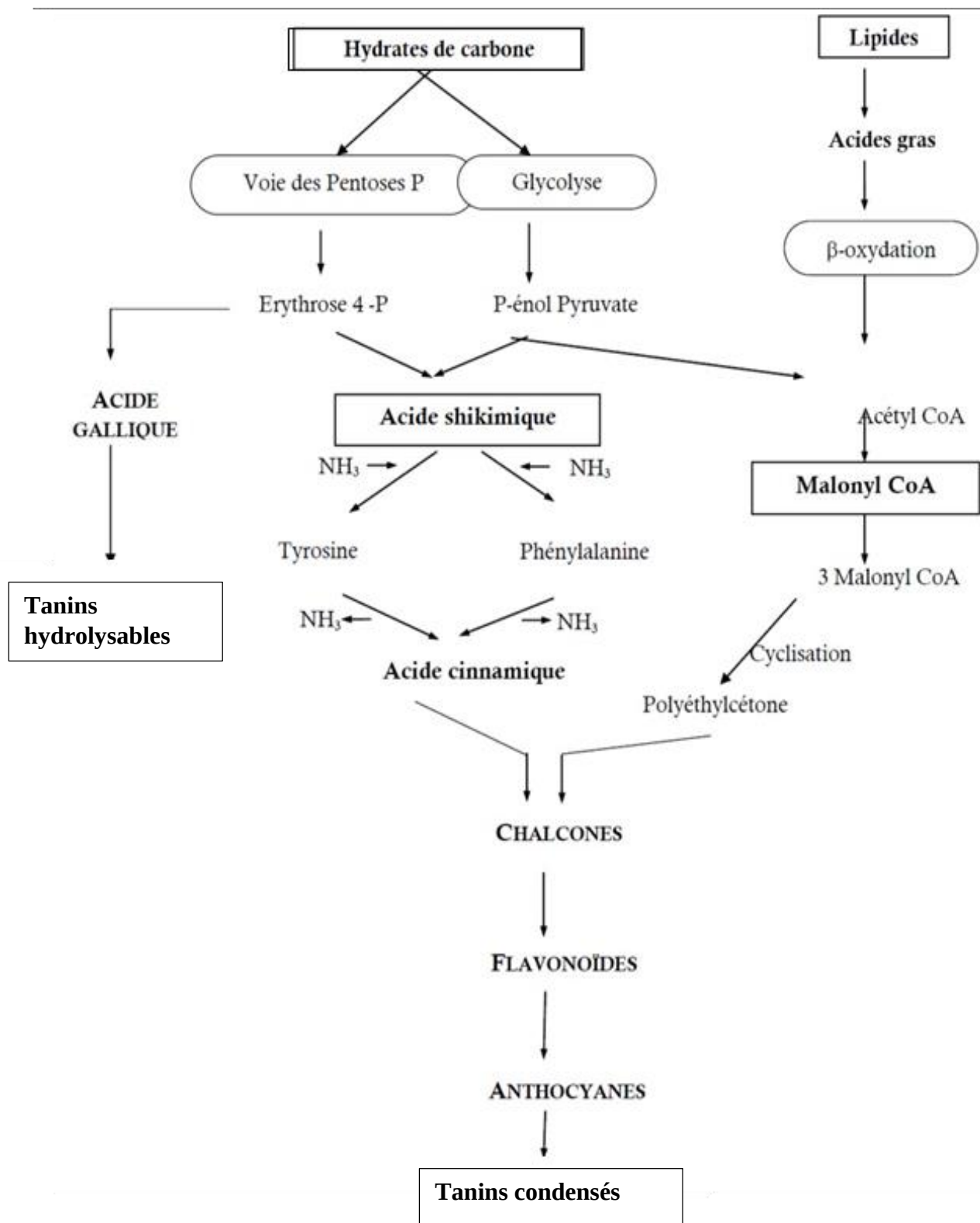


Figure 1.3 : Voies de biosynthèse des composés phénoliques [59]

II.1.2 Classification des composés phénoliques

II.1.2.1 les acides phénoliques

Les acides phénoliques, se composent d'un noyau phénolique unique associé à au moins une fonction carboxylique. Ils sont classés en deux catégories distinctes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique.

La première catégorie comprend les acides phénoliques qui dérivent de l'acide benzoïque et qui se forment par monohydroxylation et/ou polyhydroxylation, donnant ainsi naissance à des acides phénoliques et à des acides polyphénoliques. Parmi eux, on retrouve l'acide gallique et l'acide protocatéchique [60].

La deuxième catégorie regroupe les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique. De même avec l'acide cinnamique, l'hydroxylation conduit à l'acide p-coumarique et à l'acide caféique [61].

II.1.2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe très diversifiée de composés phénoliques que l'on trouve couramment dans les plantes. Ils jouent un rôle important dans la pigmentation des fleurs, des fruits et des feuilles, et ils offrent également une protection contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres.

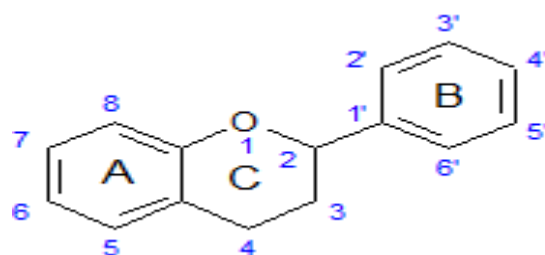


Figure 1.4 : Structure de base des Flavonoïdes [62]

La structure de base des flavonoïdes, est constituée de trois noyaux aromatiques (deux noyaux benzéniques A et B et un noyau C) reliés entre eux. Cette structure de base peut être modifiée par l'ajout de groupes hydroxyle, glycosyle et acyle sur les noyaux aromatiques, ce qui donne lieu à une grande variété de composés différents [1]

Les flavonoïdes sont connus pour avoir des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-cancéreuses, et ils sont également associés à de nombreux bienfaits pour la santé, tels que la réduction du risque de maladies cardiovasculaires et de certains types de cancer.

Ils se trouvent dans de nombreux aliments d'origine végétale, notamment les fruits, les légumes, le thé, le vin rouge et le chocolat noir. Leur consommation régulière est donc recommandée dans le cadre d'une alimentation équilibrée pour profiter de leurs effets bénéfiques sur la santé [63].

➤ Classification des flavonoïdes

Les principales classes de flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols, les isoflavones, et les anthocyanes [58]. Les principaux flavonoïdes présents dans les extraits des espèces *Salvia* sont : apigénine-7, 4'-diméthyl éther, salvigenine, apigénine-7-O-glucoside et lutéoline-7-O-glucoside, apigénine -7-O-Dcellobioside; apigénine- 7-O-D-cellobiosyl-4-O--D-glucopyranoside [64]

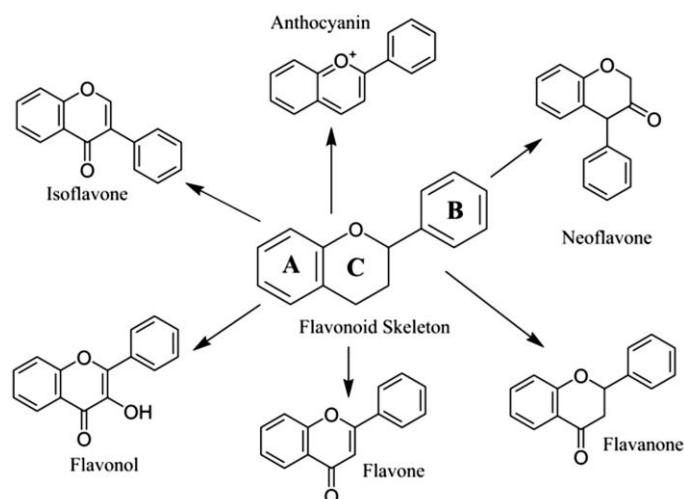


Figure 1.5 : Classification des flavonoïdes [65]

- Flavonones et flavonols

Les flavones et les flavonols constituent la grande majorité des flavonoïdes connus, représentant plus de 90% des cas. Dans ces molécules, le cycle A est généralement substitué par deux hydroxyles phénoliques en position C-5 et en position

C-7. Ces hydroxyles peuvent être soit libres soit étherifiés, et l'un d'entre eux peut être impliqué dans une liaison hétérosidique.

En ce qui concerne le cycle B, il est généralement substitué en position C-4' dans environ 80% des cas, mais il peut aussi être disubstitué en positions C-3' et C-4', ou plus rarement trisubstitué en positions 3', 4' et 5'. Ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) ou des groupes méthoxyles (OCH₃). Les autres positions, notamment C-2' et C-6', sont rarement sujettes à des substitutions.

Les flavones principales comprennent l'apigénine et la lutéoline, tandis que les flavonols principaux sont la quercétine, le kaempférol et la myricétine [62].

- Flavonones

Les flavanones et les dihydroflavonols se caractérisent par l'absence de la double liaison en C2-C3 et la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales dans ces molécules sont similaires à celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. La principale flavanone est la naringénine, tandis que le dihydroflavonol le plus courant est la catéchine [58]

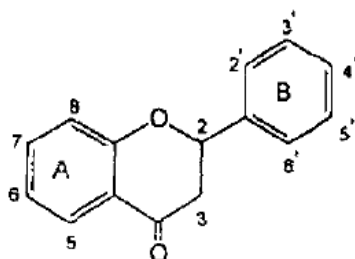


Figure1.6 : Structure de base des flavones [66]

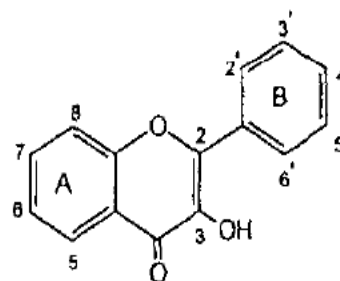


Figure 1.7 : Structure de base des flavonols [66]

	5	6	7	4'
Apéginine	OH	-	OH	OH
Lutéoline	OH	-	OH	-

	5	7	3'	4'	5'
Quercétine	OH	OH	OH	OH	OH
Kaempférol	OH	OH	-	OH	OH

- Chalcones

Les chalcones se distinguent des autres flavonoïdes par l'absence de l'hétérocycle central, et elles se caractérisent par la présence d'une chaîne tricarbonée cétonique α, β -insaturée. Bien que les substitutions sur le noyau A des chalcones soient généralement similaires à celles des autres flavonoïdes, il est assez courant que le noyau B reste non substitué. Il convient de noter que, pour ce type de molécules, la numérotation des positions diffère de celle des autres flavonoïdes. Parmi les chalcones les plus importants, on trouve notamment la butéine et la phlorétine [66].

- Anthocyanidines

Les anthocyanidines sont toujours hydroxylées en position 3, elles se caractérisent par l'absence du groupe hydroxyle à la position 4. Les anthocyanidines les plus abondants sont: la pélagonidine, la cyanidine et la péonidine [1].

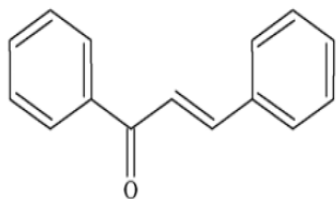


Figure 1.8 : Structure de base des Chalcones [65]

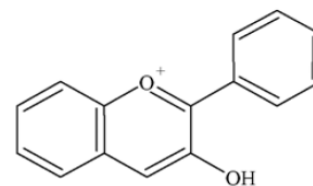


Figure 1.9 : Structure de base des Anthocyanidines [67]

II.1.2.3 Tanins

Les tanins sont un groupe de composés naturels que l'on trouve dans de nombreuses plantes, notamment dans les fruits, le thé, le vin, et diverses autres sources végétales. Ils ont des propriétés chimiques variées et peuvent avoir un impact sur la saveur, la couleur et la qualité des aliments et des boissons.

II.1.2.3.1 Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des composés présents principalement dans les dicotylédones des angiospermes. Ils sont composés d'un sucre, généralement le glucose, lié à un certain nombre de molécules d'acide phénol, qui peut être l'acide

gallique (dans le cas des tanins galliques) ou l'acide hexahydroxy diphénique (HHDP) et ses dérivés oxydés (dans le cas des tanins éllagiques). La caractéristique principale des tanins hydrolysables est leur susceptibilité à être facilement hydrolysés, c'est-à-dire décomposés, soit chimiquement, soit par des enzymes

II.1.2.3.2 Tanins condensés

Les tanins condensés, également appelés proanthocyanidines, constituent le groupe le plus important de tanins. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils ne contiennent pas de sucre dans leur structure. Leur structure est similaire à celle des flavonoïdes, ce qui les rend apparentés à cette classe de composés. Les tanins condensés sont formés par la polymérisation de flavan-3-ols (comme les catéchines) et de flavan-3,4-diols (comme les leucoanthocyanidines) [66]

En général, les tanins sont connus pour leur capacité à former des complexes insolubles lorsqu'ils sont en présence de glucides, de protéines et d'enzymes digestives. Ils présentent également des propriétés antioxydantes et être bénéfiques pour la santé, notamment en ce qui concerne la prévention de certaines maladies chroniques.

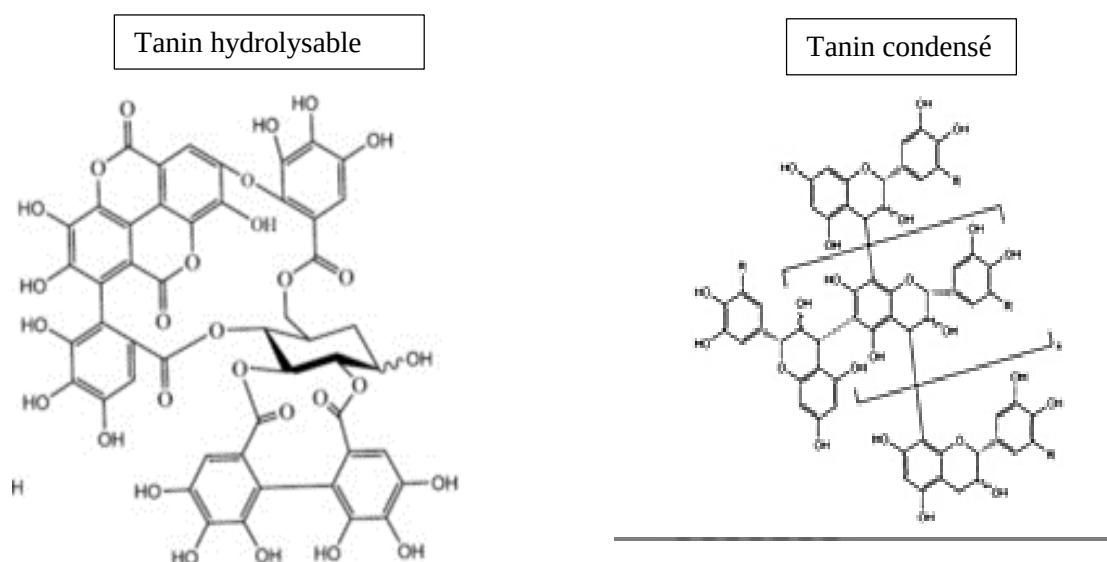


Figure 1.10 : Structure de tanin hydrolysable et tanin condensé [1]

II.2 Les huiles essentielles

Selon l'Agence Française de Normalisation (AFNOR), les huiles essentielles peuvent être définies comme suit (NF T 75-006) :

"Les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir de matières premières végétales, soit par distillation à la vapeur, soit par des processus mécaniques à partir de l'épicarpe des agrumes, ou par distillation 'sèche'." [68]

Les huiles essentielles (HE) sont insolubles dans les solvants inorganiques (eau) tout en étant solubles dans les solvants organiques (éther, alcool, huiles végétales). Ce sont des liquides volatils ayant une odeur caractéristique et une densité inférieure à l'unité, à l'exception du vétiver, du saffran et de la cannelle. Elles sont largement utilisées en parfumerie, en aromathérapie et dans l'industrie cosmétique.. Les huiles essentielles se trouvent dans différentes parties des plantes aromatiques, telles que les fleurs (rose, orange, lavande, bouton de fleur pour le clou de girofle et bractées pour l'ylang-ylang), les feuilles (menthe, eucalyptus, feuille de laurier, thym, sauge, sarriette, aiguilles de pin), les rhizomes (acore et gingembre), les racines (vétiver), les graines (coriandre et carvi), les fruits (anis, fenouil et épicarpe des agrumes) et le bois et l'écorce (santal, cannelle et bois de rose) [69].

II.2.1 Composition chimique

Il y a plus de 200 composants présents dans le mélange des huiles essentielles pures. Ces mélanges contiennent des dérivés phénylpropaniques ou des terpènes [70]. Ils peuvent être classés en deux catégories :

- Fraction volatile : La fraction volatile représente 90 à 95 % du poids total de l'huile. Elle contient des monoterpènes, des sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés. Des alcools aliphatiques, des esters et des aldéhydes.
- Résidu non volatil : Le résidu non volatil représente de 1 à 10 % du poids total de l'huile essentielle. Il contient des acides gras, des hydrocarbures, des stérols, des cires, des flavonoïdes et des caroténoïdes.
- **II.2.1.1 Terpènes**

Les terpènes peuvent être classés en sesquiterpènes, monoterpènes et diterpènes. Deux, trois et quatre unités d'isoprène sont jointes tête à queue pour former respectivement des monoterpènes, des sesquiterpènes et des diterpènes. Ils sont des antiseptiques, anti-inflammatoires, bactéricides et antiviraux par nature.

II.2.1.2 Alcools

Les alcools peuvent être présents sous forme libre ou sous forme combinée avec d'autres terpènes ou esters. Les terpènes associés à un groupe hydroxyle sont appelés alcools. Un monoterpène associé à un groupe hydroxyle est appelé monoterpenol. Ce sont des antiseptiques, antiviraux, bactéricides et germicides par nature.

II.2.1.3 Aldéhydes

Les aldéhydes sont des anti-inflammatoires, antifongiques, antiseptiques, bactéricides, antiviraux, sédatifs et désinfectants par nature. La présence d'aldéhydes dans les huiles essentielles revêt une grande importance médicale car ils sont efficaces dans le traitement des candidoses et de nombreuses autres infections fongiques.

II.2.1.4 Acides

Les acides sont des anti-inflammatoires par nature. Dans les huiles essentielles, les acides organiques sont présents en très petite quantité sous forme libre. Les acides végétaux agissent comme des composants ou des systèmes tampons pour contrôler l'acidité. Par exemple, l'acide benzoïque et l'acide cinnamique

II.2.1.5 Esters

Les esters présents dans les huiles essentielles ont des effets apaisants et équilibrants. Les esters sont des agents antimicrobiens efficaces en raison de la présence d'alcool dans leur structure. Dans le domaine médical, les esters sont caractérisés comme sédatifs et antifongiques, avec une action équilibrante sur le système nerveux.

II.2.1.6 Cétones

Les huiles essentielles (HE) contiennent des cétones et sont considérées comme bénéfiques pour favoriser la cicatrisation des plaies et encourager la formation de tissu cicatriciel, ils sont des agents de prolifération cellulaire, anti-catarrhales, vulnéraires et expectorants par nature.. Les cétones sont généralement toxiques, les plus toxiques sont le thuyone que l'on trouve dans la sauge, l'armoise, la tanaisie et l'absinthe.

II.2.1.7 Lactones

Les lactones sont particulièrement efficaces en raison de leur action anti-inflammatoire. Les lactones ont la capacité de réduire la synthèse des prostaglandines et montrent des actions expectorantes plus puissantes que celles des cétones [70].

CHAPITRE III

ACTIVITES BIOLOGIQUES

III. Activités biologiques

Plus de 400 espèces du genre *Salvia* sont utilisées en médecine traditionnelle et moderne, en tant qu'herbes aromatiques ou plantes d'ornement, dans le monde entier.

La sauge est largement décrite comme une plante médicinale officielle dans les pharmacopées de nombreux pays à travers le monde. Depuis les temps anciens, la sauge est une herbe importante aux propriétés curatives bénéfiques, utilisée dans l'ancienne Égypte, par les Romains, les Grecs, les Anglo-Saxons [71].

En médecine traditionnelle, l'herbe a été utilisée comme carminative, spasmolytique, astringente, antiseptique, en gargarisme ou en bain de bouche contre l'inflammation de la bouche, de la langue et de la gorge, comme agent de cicatrisation des plaies, dans les soins de la peau et des cheveux, contre la rhumatisme et la débilité sexuelle, et pour traiter les affections mentales et nerveuses.

En Europe, les feuilles de sauge ont été utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement symptomatique de troubles dyspeptiques légers tels que les brûlures d'estomac et les ballonnements, le soulagement de la transpiration excessive, et le traitement symptomatique des inflammations de la bouche ou de la gorge ainsi que des inflammations mineures de la peau [72].

De plus, cette plante a été traditionnellement utilisée pour traiter les problèmes gastro-intestinaux, les rhumes, la toux et les douleurs dentaires. Aujourd'hui, l'analyse des données de la littérature montre que les plantes *Salvia* ont un large éventail d'activités pharmacologiques, notamment des effets antimicrobiens, antioxydants, anti-inflammatoires, anticancéreux, hypoglycémiants, hypolipidémiants, [73]; [21].

III.1. Activité antimicrobienne

Les micro-organismes sont impliqués dans la pathogenèse de nombreuses maladies et provoquent la détérioration de divers produits. Malgré les progrès réalisés dans la compréhension du cycle de vie et du contrôle de nombreux agents pathogènes, presque toutes les maladies affectant des millions de personnes dans les pays en développement sont toujours causées par des micro-organismes. Les espèces *Salvia* sont couramment utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses infections microbiennes, l'activité antimicrobienne est l'une des bioactivités les plus citées des différents extraits des espèces *Salvia*, y compris contre les bactéries et les champignons. .

Dans une étude in vitro, les huiles essentielles de *S. limbata* et de *S. sclarea* ont montré des effets antimicrobiens sur les champignons sans effet sur les bactéries. L'huile essentielle de *S. limbata* était plus puissante que celle de *S. sclarea* avec une valeur de CMI de 15,62 à 62,50 $\mu\text{L/ml}$ [74].

L'extrait de dichlorométhane de la racine de *S. sclarea* et leurs principaux diterpénoïdes, salvipisone, aethiopinone, ferruginol et 1-oxoaethiopinone, ont montré un effet anti-biofilm contre les bactéries Gram-positif, notamment *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Enterococcus faecalis*. Salvipisone était le composant le plus puissant, notamment contre *S. epidermidis* (CMI = 9,37 mg/mL) [75].

Dans une autre étude, l'huile essentielle et l'extrait (n-hexane, dichlorométhane et méthanol) de *Salvia nemorosa* ont été examinés pour leur effet antibactérien et antifongique à l'aide de méthodes de diffusion sur disque et de concentration minimale inhibitrice. L'huile essentielle a notamment inhibé les bactéries Gram-positif (*Bacillus cereus* et *S. aureus*) mieux que la gentamicine [76].

Les auteurs de l'étude ont également signalé que l'huile essentielle de *Salvia reuterana* inhibait la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* et *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 14 à 45 mm [77].

Peana et *al.*, (2002) ont déterminé que les extraits d'acétone des parties aériennes de *S. sclarea* étaient actifs contre *Candida albicans* et *Proteus mirabilis*. De plus, l'alpha-terpinéol, un composant alcoolique isolé de *S. sclarea*, avait une activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* et *C. albicans* [78].

Dans une étude menée par Al-Bakri et *al.*, (2010) les activités antibiofilm et antimicrobienne de sept espèces de *Salvia* ont été étudiées. Parmi toutes les espèces de *Salvia*, l'extrait alcoolique et l'huile essentielle de *S. triloba* étaient efficaces avec une MBC de 1,00 à 1,17 mg/mL [79].

Baghayeri et *al.*, (2018) ont rapporté les effets des nanoparticules d'argent des extraits aqueux de feuilles de *S. leriifolia* contre *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus coagulase*, *Klebsiella pneumoniae* et *Streptococcus pneumoniae*. L'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent de *S. leriifolia* contre les organismes Gram-positif était supérieure à la vancomycine [80].

Dans une autre étude, les extraits méthanoliques et l'huile essentielle de *S. syriaca* et de *S. grossheimii* ont été examinés pour leurs activités antibactériennes en utilisant la méthode de diffusion sur agar. *S. syriaca* à une dose de 100 mg/mL a montré l'effet le plus puissant sur *Proteus vulgaris* [81].

Par cette même méthode, l'huile essentielle de *S. palaestina* a montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* (IZ = 10,39), *E. coli* (IZ = 8,57 mm) et *C. albicans* (IZ = 14,04 mm) [82].

Karcioglu et *al.*, (2011) ont testé l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques et chloroformiques des parties aériennes de *S. trichoclada* en utilisant la méthode de diffusion sur disque. L'extrait éthanolique obtenu par extraction soxhlet était plus efficace sur les bactéries Gram-négatif que les extraits chloroformiques [83]. Dans une autre étude, les extraits méthanoliques et les huiles essentielles de *S. reuterana* ont montré une activité antimicrobienne contre *C. albicans* (CMI = 7,8 µg/mL) [84].

III.2. Activité antioxydante

Le stress oxydatif peut être décrit comme un déséquilibre entre la production de substances réactives de l'oxygène et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages causés par leur activité [56].

Les recherches récentes en domaine biomédical mettent en évidence le rôle des radicaux libres dans de nombreuses maladies. Il existe de plus en plus de preuves suggérant que de nombreuses maladies dégénératives telles que les dysfonctionnements cérébraux, le cancer, les maladies cardiaques et le déclin du système immunitaire pourraient être le résultat de dommages cellulaires causés par les radicaux libres, et que les antioxydants pourraient jouer un rôle important dans la prévention des maladies [85].

Des études ont également montré que les composés phénoliques sont d'efficaces pièges à radicaux libres et, en tant que tels, peuvent être potentiellement utiles dans la prévention de plusieurs maladies [86].

Les antioxydants couramment utilisés, le butylhydroxyanisole et le butylhydroxytoluène (BHT, BHA), sont des produits chimiques synthétiques et la possible toxicité de ces antioxydants a conduit à leur utilisation réduite [87]. En raison des préoccupations pour la santé, les antioxydants naturels ont été largement utilisés ces dernières années. Plusieurs études avaient l'objectif de démontrer l'effet antioxydant des différentes espèces *Salvia* :

L'extrait méthanolique de *S. nemorosa*, riche en flavonoïdes et en composés phénoliques, a également montré une activité de capture des radicaux (CI50 : 82 mg/mL) [88].

Dans une autre étude, l'effet antioxydant des extraits méthanoliques d'espèces de *Salvia* a été démontré par les méthodes du radical DPPH et du bêta-carotène/acide linoléique. Le taux d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique dans l'extrait méthanolique de *S. limbata* et de *S. sclarea* était respectivement de 85,1 % $\pm$ 1 et de 76,6 % $\pm$ 1 [74].

Esmaeili et *al.*, (2008) ont évalué l'effet antioxydant de l'extrait méthanolique de trois espèces iraniennes de *Salvia* (*S. reuterana*, *S. lachnocalyx* et *S. sahendica*) in

vitro. Parmi ces espèces, l'extrait de *S. reuterana* présente à la fois le plus fort effet antioxydant et la plus grande teneur en flavonoïdes et en composés phénoliques [77].

L'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits méthanoliques de *S. syriaca* et de *S. grossheimii* a été évaluée par test DPPH. Les deux extraits avaient des effets antioxydants comparables à l'acide ascorbique (82,61 %) [81]. Il a également été signalé que l'huile de *S. palaestina* présente une activité antioxydante avec un CI50 de 2,333 et 1,585 mg/mL après 30 et 90 minutes, respectivement [82].

Ghomi et al., (2012) ont décrit l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits de fleurs et de feuilles de *S. reuterana*. Selon le test du DPPH, l'extrait méthanolique des fleurs était efficace (CI50 = 77,6 µg/mL), mais selon les tests du bêta-carotène/acide linoléique, l'extrait méthanolique des feuilles (CI50 = 40,03 µg/mL) était le meilleur piègeur de radicaux [84].

Dans une autre étude, l'activité antioxydante de l'extrait (méthanolique et aqueux) et des huiles essentielles de *S. sclarea* et de *S. limbata* a été mesurée par les méthodes du DPPH et du bêta-carotène/acide linoléique. Selon les tests du bêta-carotène/acide linoléique, l'extrait méthanolique des deux espèces de *Salvia* était comparable au BHT (85,1 % ± 1 pour *S. limbata*, 76,6 % ± 1 pour *S. sclarea* et 96 % ± 1 pour le BHT, respectivement) [74].

III.3. Activité anti-inflammatoire

Le processus inflammatoire est une réponse biologique complexe, généralement composée de quatre parties : les facteurs inducteurs de l'inflammation, les capteurs, les médiateurs inflammatoires et les tissus cibles affectés [89]. Les facteurs inducteurs de l'inflammation peuvent être divers stimuli nocifs, notamment des bactéries, des champignons, des virus, des produits chimiques toxiques et des blessures physiques [90]. La réponse inflammatoire conduit aux symptômes de rougeur, de gonflement, de chaleur et de douleur, qui ont des effets positifs sur l'élimination des agents pathogènes, la limitation de l'infection et la réparation des lésions [91]; [92]. Cependant, une surproduction de médiateurs de l'inflammation (l'oxyde nitrique (iNOS), la cyclooxygénase (COX), l'oxyde nitrique (NO), les chimiokines, les cytokines, les éicosanoïdes et les amines vasoactives) entraîne des troubles du système immunitaire, provoquant des maladies inflammatoires. De plus,

des recherches émergentes concluent que les réponses inflammatoires aiguës provoquées par des blessures et des infections peuvent se transformer en états inflammatoires chroniques [93]. La procédure inflammatoire prolongée affecte souvent le foie, les reins, le cœur, les intestins, le cerveau et d'autres organes. Les maladies courantes associées à l'inflammation comprennent les maladies cardiovasculaires, l'arthrite, le cancer, la maladie d'Alzheimer, le diabète, la maladie inflammatoire de l'intestin, les maladies auto-immunes, l'hépatite, la maladie cœliaque, les allergies, l'hypertension et les troubles de la reproduction [94].

En conclusion, les formes et les modalités des réponses inflammatoires sont très nombreuses et complexes, nécessitant une régulation précise et ciblée.

Les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) sont l'un des médicaments antipyrétiques et analgésiques les plus largement utilisés. Leur mécanisme anti-inflammatoire repose principalement sur l'inhibition de la cyclooxygénase (COX) pour réduire la production de médiateurs inflammatoires, notamment les prostaglandines [95] ; [96]. La COX est l'enzyme limitant le taux du métabolisme de l'acide arachidonique et possède deux isomères, la COX-1 et la COX-2 [97]. Malheureusement, les AINS sélectifs (coxibs, inhibiteurs sélectifs de la COX-2) et les AINS non sélectifs couramment utilisés sont associés à un risque élevé d'effets secondaires, notamment des événements cardiovasculaires et des événements indésirables gastro-intestinaux, tandis que les médicaments biologiques émergents sont plus coûteux. Il est urgent de découvrir des médicaments anti-inflammatoires présentant une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires pour surmonter la situation actuelle [98].

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont révélé les activités anti-inflammatoires de plusieurs extraits de plantes médicinales.

Les extraits et certains composés isolés des espèces *Salvia* peuvent atténuer la réponse inflammatoire associée à une lésion hépatique chronique. Les cellules de Kupffer (KCs), le principal type cellulaire du système monocyttaire et macrophagique intra-hépatique, initient des réponses inflammatoires en libérant des médiateurs inflammatoires pouvant causer des dommages tissulaires. Le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) et la protéine p38 jouent un rôle crucial dans l'induction d'une réponse

inflammatoire impliquant les KCs ; ainsi, le blocage des voies de signalisation stimulant le NF- κ B et la p38 est l'une des méthodes les plus efficaces pour gérer une lésion inflammatoire [99].

De manière intéressante, les extraits et les composés monomères isolés de *S. miltiorrhiza* (100 μ g/mL) ont agi sur les KCs stimulées par le lipopolysaccharide (LPS). L'expression des protéines des deux voies de signalisation a été analysée par western blot. Les résultats ont montré que les préparations de *S. miltiorrhiza* ont régulé à la baisse l'activité de la protéine de la voie p38MAPK-NF- κ B65-c-fos, inhibant ainsi l'activation des KCs et prévenant la réponse inflammatoire induite par la créatine kinase [100].

III.4. Autres activités :

Les espèces *Salvia* présentent une large gamme d'activités biologiques, ce qui en fait un groupe de plantes d'un grand intérêt médicinal. Elles sont associées à des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antimicrobiennes [99], ce qui suggère leur potentiel pour atténuer l'inflammation, réduire le stress oxydatif et combattre les infections comme ça été déjà exploité en amont.

De plus, certaines espèces *Salvia* montrent des effets bénéfiques sur la régulation de la glycémie, la santé neurologique, cardiovasculaire et hépatique (Tableau1.III). Bien que des études aient également suggéré un potentiel anticancéreux, davantage de recherche est nécessaire pour mieux comprendre ces propriétés.

Tableau 1.III : Activités pharmacologiques de quelques espèces *Salvia* [101]

Activité pharmacologique	Espèce	Partie de la plante (extrait)	Modèle ou essai	Traitement	Remarques	Références
Anti hyperlipidémique	<i>S. hydrangea</i>	Parties aériennes (extrait alcoolique)	Rats	100, 200 mg/kg	L'extrait à haute dose (200 mg/kg) a significativement réduit le taux de cholestérol.	[102]
Antidiabétique	<i>S. hydrangea</i>	Parties aériennes (extrait alcoolique)	Rats	100, 200 mg/kg	Une augmentation des niveaux d'insuline a été observée avec une dose élevée de l'extrait (200 mg/kg).	[102]
Anti-inflammatoire	<i>S. aegyptiaca</i>	Extraits bruts d'acétone et de méthanol	Souris	0,25, 0,5, 1 ou 2 g/kg P.O	outes les doses d'extraits ont pu réduire l'œdème de la patte induit par la carraghénane.	[103]
Anti-inflammatoire	<i>S. hypoleuca</i>	Feuilles et fruits secs	Rats	1, 10, 100 mg I.V	Le <i>S. hypoleuca</i> à 100 mg était plus puissant.	[104]

Tableau 1.III : Activités pharmacologiques de quelques espèces *Salvia* [101] (Suite1)

Activité pharmacologique	Espèce	Partie de la plante (extrait)	Modèle ou essai	Traitement	Remarques	Références
Anti-ischémie-reperfusion	<i>S. leriifolia</i>	Extraits aqueux et éthanoliques	Rats	100, 200 et 400 mg/kg I. P	Toutes les doses évaluées ont pu augmenter l'amplitude.	[105]
Antinociceptif	<i>S. aegyptiaca</i>	Extraits bruts d'acétone et de méthanol	Souris	0,25, 0,5, 1 ou 2 g/kg P. O	L'effet antinociceptif a été observé pour l'extrait d'acétone à 0,5, 1 ou 2 g/kg et pour les extraits de méthanol à 0,5 g/kg.	[103]
Hépatoprotecteur	<i>S. hypoleuca</i>	Plante séchée à l'air	Rats	400 mg/kg/jour, P. O	L'effet s'est manifesté par la récupération des taux de bilirubine sérique, de protéines et d'enzymes.	[104]

Tableau 1.III : Activités pharmacologiques de quelques espèces *Salvia* [101] (Suite1)

Activité pharmacologique	Espèce	Partie de la plante (extrait)	Modèle ou essai	Traitement	Remarques	Références
Effet Hypnotique	<i>S. reuterana</i>	Extrait éthanolique	Souris mâles	50, 100 et 250 mg/kg I. P	L'extrait aux doses de 100 et 250 mg/kg a pu augmenter la durée et réduire le temps de latence.	[106]
Immunomodulateur	<i>S. mirzayanii</i>	Parties aériennes (extrait de méthanol)	Souris	1, 50, 100 mg/kg I. P	L'effet a été observé à des concentrations plus basses et plus élevées de l'extrait.	[107]
Dépendance à la morphine	<i>S. macrosiphon</i>	Parties aériennes (pousses fleuries)	Souris	100, 200, 500, 1000, 1500 mg/kg I. P	L'extrait méthanolique s'est révélé efficace.	[108]
Inhibition de l' α -amylase	<i>S. virgata</i>	Parties aériennes (extrait d'éthanol)		0,58, 0,91, 1,42, 2,23, 3,48 mM	La chryséoriol a inhibé l' α -amylase.	[109]

MATERIEL ET METHODES

L'objectif principal de cette étude était de caractériser en détail les métabolites secondaires présents dans *Salvia chudaei* Bat & Trab et d'explorer diverses propriétés biologiques associées à cette plante, notamment ses activités antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, analgésique, ainsi que sa toxicité potentielle. Pour atteindre ces objectifs, nous avons mis en œuvre un ensemble de méthodologies et d'analyses approfondies, comme suit :

- Screening phytochimique : Nous avons réalisé une analyse détaillée pour révéler la présence des différents métabolites secondaires présents dans *Salvia chudaei*.
- Extraction des huiles essentielles et préparation des extraits : Nous avons extrait les huiles essentielles de la plante et préparé deux types d'extraits, à savoir l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique.
- Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins : Nous avons mesuré les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins dans les extraits éthanolique et aqueux afin de mieux comprendre la composition chimique de la plante.
- Évaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique : Nous avons étudié la capacité des extraits de *Salvia chudaei* à inhiber la croissance des micro-organismes, ce qui peut avoir des applications dans la lutte contre les infections bactériennes et fongiques.
- Évaluation de l'activité antioxydante : Nous avons évalué le potentiel antioxydant des extraits à l'aide de plusieurs méthodes, notamment la capacité antioxydante totale, le test du piégeage du radical libre DPPH, le test du blanchiment de la β -carotène et la méthode FRAP. Ces analyses ont permis de

déterminer la capacité des extraits à neutraliser les radicaux libres et à prévenir les dommages oxydatifs.

- Toxicité : Nous avons déterminé la DL50 (toxicité aiguë) des différents extraits pour évaluer leur niveau de toxicité. Cette étape est cruciale pour garantir la sécurité d'utilisation des extraits.
- Évaluation de l'effet pharmacologique *in vivo* : Enfin, nous avons évalué les effets anti-inflammatoires et analgésiques des extraits.

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La plante a été récoltée durant le printemps (2013 et 2014) dans l'oued Tinsawak à 220 km, nord-est de la wilaya de Tamanrasset à 1392 m d'altitude.

L'identification de l'espèce a été faite par Mme SAHKI.R de la station INRF de Tamanrasset [110].

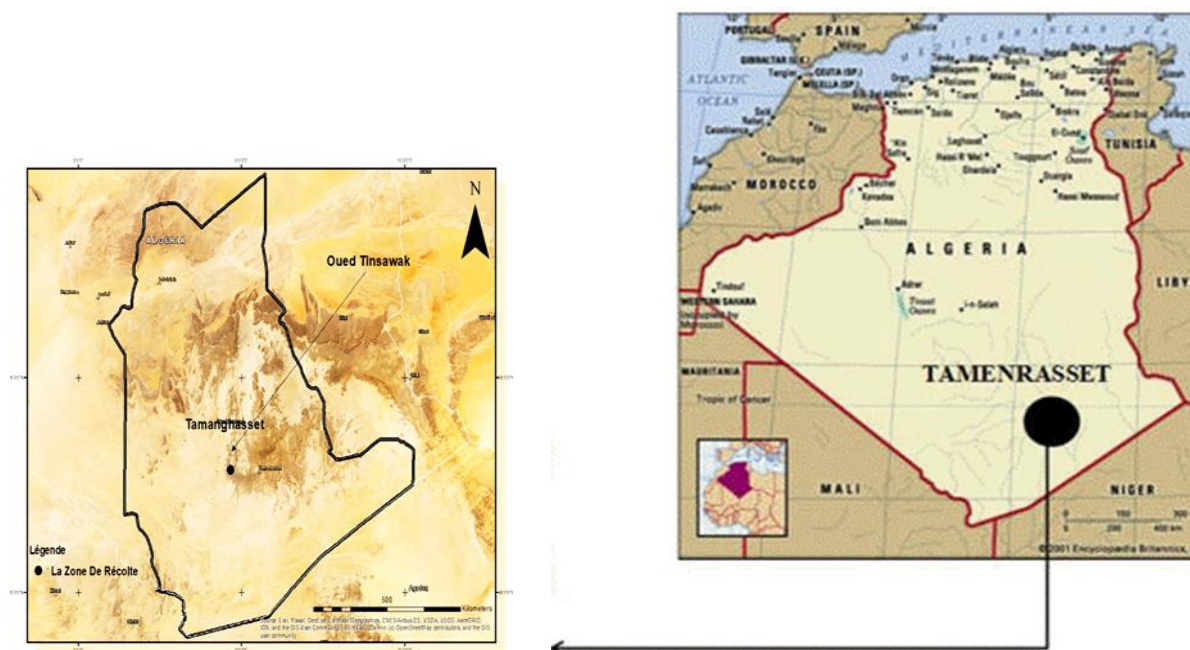


Figure 2.1 : Présentation de la zone d'échantillonnage.

Des échantillons de la partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de la plante récoltée, ont été séchés à l'abri de la lumière et de l'humidité, à une température de 25°C , puis conservés jusqu'au moment de l'extraction.

- ❖ Une partie de la plante est broyée à l'aide d'un broyeur électrique, afin d'obtenir une poudre qui servira à l'extraction des composés non volatils.
- ❖ Une autre partie est coupée en petits morceaux de 1 à 2 cm à l'aide d'un ciseau afin de réaliser l'extraction des huiles essentielles.

I.2. Souches microbiennes

Les souches utilisées sont responsables de diverses pathologies chez l'être humain. Elles proviennent de Laboratoire de Microbiologie de l'unité Antibiotical de SAIDAL et de Service de Microbiologie Alimentaire du Laboratoire d'Hygiène de la wilaya de Médéa. (Tableau 2.I).

Tableau 2.I : Gamme des souches microbiennes testées.

Catégories		Souches	Références
Bactéries	Gram positive	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
		<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
		<i>Staphylococcus épidermidis</i>	ATCC 12228
		<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Sarcina lutea</i>	Isolée et identifiée au niveau de laboratoire d'hygiène et de parasitologie de Médéa
	Gram negative	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
		<i>Escherichia coli</i>	ATCC 2378
		<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 2372
		<i>Citrobacterdiversus</i> <i>Klebsiellapneumonia</i> <i>Pseudomonas aerugimonas</i> <i>Schigellaflexinen</i>	Isolée et identifiée au niveau de laboratoire d'hygiène et de parasitologie de Médéa
Levures		<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
		<i>Candida tropicalis</i>	Isolée et identifiée au niveau de laboratoire d'hygiène et de parasitologie de Médéa

I.3. Souches fongiques

L'activité antifongique a été testée contre des souches fongiques du genre *Fusarium*, fournies aimablement par le laboratoire de mycologie de l'université de Tiaret. Il s'agit de *Fusarium equiseti* (Wy11), *Fusarium redolens* (Wy5), *Fusarium solani* (Wy14) et *Fusarium oxysporum* (Wy18).

I.4. Animaux d'expérimentation

Pour l'activité antiinflammatoire, antispasmodique et la toxicité aigüe, nous avons utilisés des souris albinos (NMRI) dont le poids varie de 20 à 30 g provenant de l'Institut Pasteur d'Alger. Ils ont été soumis à une période d'acclimatation de 2 semaines avant le début des expériences. Les souris ont été hébergées à une température de 24 ± 1 °C, avec une humidité de $50 \pm 5\%$, et un cycle de lumière/obscurité de 12 heures/12 heures. Leur alimentation était constituée de nourriture pour rongeurs provenant de l'Office National de l'Alimentation Animale (ONAB), et elles avaient accès libre à l'eau.

II. Méthodes

L'ensemble des expérimentations réalisées sont illustrées dans les figures 2.2 et 2.4 portant sur les deux volets de cette étude :

1. l'étude phytochimique de *Salvia chudaei*.
2. l'étude des activités biologiques de la plante.

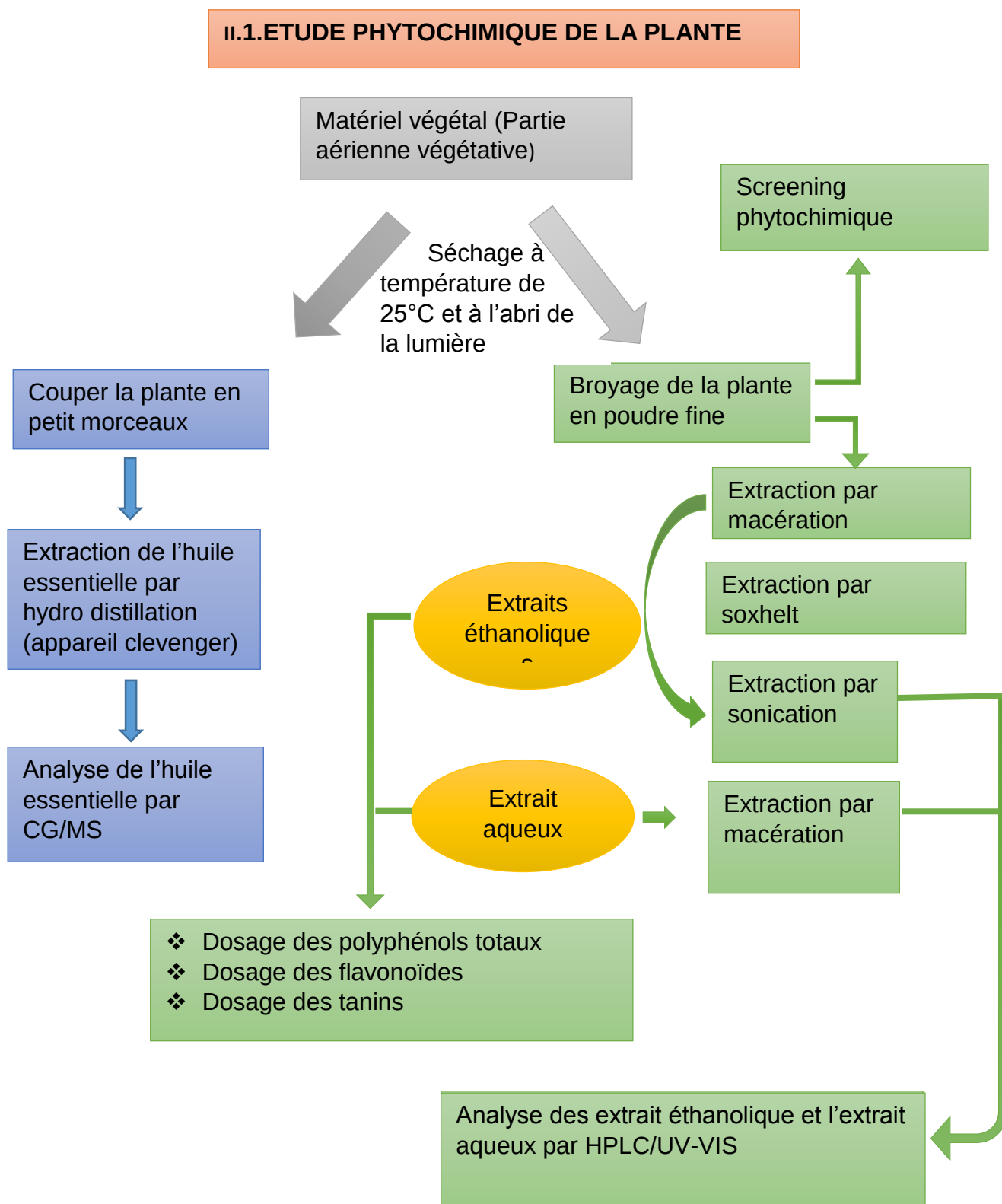


Figure2.2 : Représentation de la première partie : étude phytochimique de la plante étudiée.

I.1 Etude phytochimique de la plante

II.1.1 Screening phytochimique

Le but est de mettre en évidence la présence ou l'absence des principaux métabolites secondaires contenus dans un organe végétal d'une façon qualitative par un ensemble de réactions physicochimiques [111].

Les tests sont réalisés soit sur :

- La poudre
- Un infusé à 5 % ; préparé avec 100ml d'eau distillée bouillante sur 5g de poudre.
- Un extrait chloroformique ; préparé à partir de 1g de poudre épuisée par 10 ml de chloroforme après un chauffage au bain-marie pendant 3 mn.
- Un hydrolysât ; préparé à partir de la poudre précédemment épuisée par le chloroforme avec l'ajout de 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré suivi d'un chauffage au bain marie sous courant d'eau froide.

II.1.1.1 Recherche des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont mis en évidence par le réactif de Dragendorff .

1g de poudre est macérée dans 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% pendant 24 h à température ambiante puis filtré. 1ml de filtrat est additionné avec 5 gouttes de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité rouge orangé ou brun - rougeâtre indique la présence des alcaloïdes [112].

II.1.1.2 Recherche des tanins

La présence des tanins galliques et catéchiques a été mise en évidence à l'aide du chlorure ferrique.

-Les tanins galliques : ils sont mis en évidence par l'ajout de 3ml de réactif de Stiasny à 6ml de l'infusé après un chauffage au bain marie à 90°C et filtration, le mélange est saturé par 0.04g d'acétate de plomb $[Pb(CH_3COO)_2]$ et 1ml d'une solution de $FeCl_3$ à 1%. Une teinte bleue-noire indique la présence de tanins galliques.

-Les tanins catéchiques : sont caractérisés par l'addition de 0.2 ml de HCl concentré à 1 ml de l'infusé, après ébullition pendant 15 min, un précipité rouge insoluble dans l'alcool iso amylique indique la présence de tanins catéchiques [113].

II.1.1.3 Recherche des flavonoïdes

La présence de ces derniers est révélée par la réaction de cyanidine.

A 5 ml de l'infusé on ajoute 5ml d'une solution de HCl concentré à 50% dans l'éthanol (alcool chlorhydrique) et 1ml d'alcool iso amylique et quelques copeaux de magnésium. Une coloration rose-orange (flavone) ou rose violacée (flavonone) révèle la présence de flavonoïdes libres [1].

II.1.1.4 Recherche des leucoanthocyanes

Les leucoanthocyanes sont révélés par la réaction de cyanidine mais sans l'ajout de copeaux de magnésium, après 15 min de chauffage au bain marie, une coloration rouge cerise caractérise leur présence [1].

II.1.1.5 Recherche des anthocyanes

Les anthocyanes sont mise en évidence par ajout à 5 ml de l'infusé, 5ml de H₂SO₄ à 10% et 5ml de NH₂OH à 50%.La réaction est positive si la coloration de l'infusé s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique [1].

II.1.1.6 Recherche des dérivés anthracéniques

Les quinones et les anthraquinones sont mis en évidence à l'aide d'une solution de NH₄OH diluée à 50% [113].

- Dérivés anthracéniques libres

1 ml d'extrait chloroformique + 1 ml de NH₄OH dilué à 50%, après agitation; une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres [113].

- Dérivés anthracéniques combinés

✓ O-hétérosides (anthraquinones)

5ml de l'hydrolysât sont agités avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH₄OH dilué à 50%. La présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense [113].

✓ C-hétérosides

Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hétérosides par 10 ml d'eau distillée et ajouter 1 ml de FeCl₃ à 10%. Après 30

min de chauffage au bain-marie, on laisse refroidir puis agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase chloroformique dans un tube à essai, dans lequel on ajoute 1 ml de NH_4OH dilué. Après agitation une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence des C-hétérosides [113].

II.1.1.7 Recherche des saponosides

A 5 ml de l'infusé on ajoute 10 ml d'eau distillée, après avoir agité pendant quelques minutes. L'apparition d'une mousse confirme la présence de saponosides [114].

II.1.1.8 Recherche des composés réducteurs

Les composés réducteurs ont été mis en évidence par le réactif de Fehling.

À 5 ml de décocté aqueux à 10% sont additionnés 5 ml de liqueur de Fehling. La formation d'un précipité rouge brique après 2-3 min de chauffage au bain-marie à 70°C indique une réaction positive [115].

II.1.1.9. Recherche des coumarines

En évaporant 5 ml d'extrait éthérique, obtenu par macération pendant 24 heures de 1 g de poudre dans 20 ml d'éther. Puis, en complétant avec 2 ml d'eau chaude, la solution est partagée entre 2 tubes à essai. Puis le contenu de l'un des tubes est additionné avec 0.5 ml de NH_4OH à 25%. Le développement d'une fluorescence intense sous UV à 366 nm, témoigne la présence de coumarines [115].

II.1.1.10. Recherche du Mucilage

Introduire 1 ml de décocté aqueux à 10% dans un tube à essai, ajouter 5 ml d'alcool absolu. La formation d'un précipité floconneux révèle la présence des mucilages [115].

II.1.2 Préparation des extraits

II.1.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique par macération

La macération consiste à immerger une substance végétale, souvent dans un liquide comme l'alcool ou l'eau, afin de permettre aux composés solubles de se

dissoudre progressivement dans le liquide. Ce processus se déroule sur une période prolongée, pendant laquelle les constituants actifs de la matière végétale sont extraits lentement par diffusion. Une fois la macération terminée, le liquide est généralement filtré pour séparer la matière végétale insoluble, laissant ainsi un extrait liquide enrichi en composés souhaités.

L'extrait ethanolic de *Salvia chudaei* est préparé par macération de 60g de la poudre à température ambiante dans 600 ml d'éthanol pendant 72 heures sous agitation. Après filtration sur papier wattman (N°1), le filtrat est évaporé à 45°C en utilisant un évaporateur rotatif. Les extraits obtenus sont ensuite conservés dans des flacons stérile hermétiquement fermé jusqu'à leur utilisation [13].

II.1.2.2. Préparation de l'extrait éthanolic par Soxhlet

Le Soxhlet constitue un appareil spécifiquement conçu pour l'extraction continue de substances solides dans un liquide. Durant cette opération, le solvant est en contact prolongé avec la matière à extraire pendant que le réservoir se remplit. Une fois que le niveau de solvant atteint un seuil prédéterminé, le siphon est activé, ramenant le solvant enrichi en substances dissoutes vers le ballon principal, emportant ainsi les composés à extraire. Ce processus cyclique peut être réitéré plusieurs fois jusqu'à ce que le solide ne puisse plus céder de substances.

30 g de plante préalablement séchée et réduite en poudre est placée dans une cartouche en papier filtre, qui est ensuite insérée dans le réservoir à siphon. Parallèlement, 350 ml d'éthanol sont versés dans un ballon à col rodé, ce ballon est positionné dans un chauffe-ballon, permettant ainsi au solvant d'atteindre son point d'ébullition. Après avoir effectué environ douze cycles de siphonage, le ballon contenant le solvant enrichi en composés solubles (c'est-à-dire la fraction polaire) est recueilli. Enfin, le résidu restant est obtenu par évaporation du solvant au moyen d'un évaporateur rotatif [116].

II.1.2.3. Préparation de l'extrait éthanolique par ultrasons

Les ondes sonores génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu [117].

Plusieurs facteurs gouvernent l'action des ultrasons comme la fréquence, la pression, la température et le temps de sonication. Il faut prendre en considération les caractéristiques de la plante comme l'humidité, les dimensions des particules et les solvants utilisés pour avoir un bon rendement [118].

10g de matière végétale sont combinés avec 100 ml d'éthanol dans un erlenmeyer de 250 ml. Une étape de sonication est entreprise en utilisant un bain de nettoyage à ultrasons (ultra-turrax) avec des paramètres de 230 v~, 50/60 Hz, 500 W et une température de 60 °C, pour une durée de 60 minutes[119]. Le liquide extrait résultant est soumis à plusieurs filtrations à travers un papier filtre Wattman (N°1). Le filtrat ainsi obtenu est ensuite introduit dans un évaporateur rotatif et exposé à une température de 45 °C, jusqu'à ce que le solvant se soit complètement évaporé, laissant ainsi place à la récupération du résidu.

II.1.2.4. Préparation de l'extrait aqueux

100g de la poudre végétale est mise en macération à température ambiante dans 1 litre d'eau distillée pendant 24 heures. Après décantation du mélange, l'extrait hydrique est récupéré par filtration sur papier filtre. Le filtrat obtenu est immédiatement congelé à – 4° C puis lyophilisé dans un lyophilisateur. Le lyophilisat a été récupéré dans un flacon en verre hermétiquement fermé et conservé à – 4° C jusqu'à leur utilisation où ils sont reconstitués avec de l'eau distillée aux concentrations voulues, (Majhenic et al., 2007).

II.1.2.5 Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction (les deux solvants utilisés) est exprimé en % et calculé selon la formule suivante : $R (\%) = \frac{M_{es}}{M_v} \times 100$

R : le rendement en %.

Mes : la masse de l'extrait (g)

Mv : la masse de matériel végétal utilisé (g)

II.1.3 Détermination de la teneur en Polyphénols totaux (TPC)

Le dosage des polyphénols totaux est basé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu, en milieu alcalin, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ces hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe molybdotungstique bleu. La coloration bleue obtenue est mesurée au spectrophotomètre à 765 nm et l'absorption est proportionnelle à la quantité de phénols présents [120].

Un volume de 200µl de chaque extrait a été mélangé avec 1 ml du réactif Folin Ciocalteu (dilué 10 fois), et 800µl d'une solution de carbonate de sodium(Na_2CO_3) à 7,5% dans des tubes à hémolyse en verre. Après agitation et incubation pendant 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 765 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0.125-1 mg/ml). Les résultats sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait.

II.1.4 Détermination de la teneur en Flavonoïdes (TFC)

Les flavonoïdes sont composés d'une variété des composés naturels qui appartiennent aux polyphénols présents dans la plupart des plantes. Certains de ces groupes structuraux forment des complexes jaunâtres, probablement par chélation de métaux, notamment l'aluminium et le fer [1].

La teneur en flavonoïdes a été déterminées par une méthode trichlorure d'aluminium décrite par Lamairson (1990) [121]. Un volume de 1,5 ml de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 2 % dissous dans du méthanol a été ajouté à un volume égale de l'extrait. Le mélange a été secoué et l'absorption a été déterminer à 440 nm après 10 min d'incubation.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine à différentes concentrations (0.125-1 mg/ml). Les résultats sont exprimés en µg équivalent de quercétine par mg d'extrait.

II.1.5 Détermination de la teneur en Tanins

La teneur en tanins a été évaluée à l'aide de l'essai au Vanilline [122]. Pour cela, 50 µl d'extrait ont été mélangés avec 3 ml d'une solution de vanilline à 4% et 1,5 ml d'HCl concentré. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 500 nm. La quantification des tanins a été réalisée en utilisant une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = a \times b$) établie avec des concentrations croissantes d'acide gallique allant de 0 à 500 µg/ml.

Les résultats ont été exprimés en µg équivalents d'acide gallique par mg d'extrait, fournissant ainsi une mesure quantitative de la teneur en tanins dans les échantillons étudiés.

II.1.6 Analyse des extraits par HPLC/UV-VIS

La chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible (HPLC/UV-VIS) est une technique analytique qui combine la séparation chromatographique avec la détection UV-visible. Elle est utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composés chimiques présents dans un échantillon liquide [123].

Injection et Séparation des composés : L'échantillon liquide est injecté dans un flux de solvant qui le transporte à travers une colonne de chromatographie. La colonne est remplie de particules stationnaires, souvent des particules poreuses. Les composés de l'échantillon interagissent différemment avec la phase mobile (solvant) et la phase stationnaire (particules de la colonne). Ces interactions entraînent une séparation des composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, tels que la polarité, la taille moléculaire et la charge [124],[125].

Détection UV-visible : À mesure que les composés séparés passent à travers la colonne, ils sont détectés à l'aide d'un détecteur UV-visible. La détection UV-visible repose sur l'absorption de la lumière par les composés. Les composés absorbent la lumière à des longueurs d'onde spécifiques, ce qui génère des pics d'absorption. Ces derniers sont enregistrés sous forme de chromatogramme, qui est une représentation graphique de l'intensité de l'absorption en fonction du temps de rétention. Chaque pic correspond à un composé spécifique. En comparant les pics du chromatogramme

avec des standards connus, il est possible de quantifier les composés présents dans l'échantillon. [123].

L'analyse est effectuée par un appareil AGILENT SERIE 1200 HPLC composé par une phase mobile constituée de deux solvants (P.A : Eau à 1% AC. Acétique, P.B : Méthanol grade CLHP) et phase stationnaire dont une colonne apolaire (inverse) C18 de marque AGILENT (longueur : 150mm, diamètre : 4.6 mm, taille de particules : 5µm) couplé à un détecteur UV-VIS.

Les conditions opératoires de HPLC/UV-VIS sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2.II: Conditions opératoires de HPLC/UV-VIS

Boucle d'injection	20µL
Température	35°C
Détection (Å)	254 nm/ 280 nm
Durée d'analyse	60 mn
Débit	1ml/min
Volume injecté	20µL

II.1.7 Extraction de l'huile essentielle

Les huiles essentielles ont été obtenues par hydro distillation en utilisant un appareil de type Clevenger. L'extraction est effectuée durant quatre heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle [126].

Le principe de l'hydrodistillation est basé sur une distillation hétérogène. Pour ce faire, la matière végétale est immergée dans un bain d'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition à pression atmosphérique. La chaleur provoque l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qu'elles contiennent.

Après la distillation, le mélange est refroidi et condensé dans un essencier. Une fois condensées, l'eau et les molécules aromatiques, en raison de leurs différences de

densité, se séparent en deux phases distinctes : une phase aqueuse et une phase organique, qui est l'huile essentielle[127] .

Les huiles essentielles sont ensuite conservées dans un flacon opaque hermétiquement fermé à une température de 4°C jusqu'à leur utilisation.

II.1.7.1 Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = Mh/Mv \times 100$$

R : le rendement en %.

Mh : la masse de l'huile essentielle (g)

Mv : la masse de matériel végétal utilisé (g).

II.1.7.2 Analyse de l'huile essentielle par CG/MS

L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse a été réalisée au laboratoire de chromatographie de Département de chimie, Université Sultatan Kaboos (OMAN).

C'est une méthode qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et le spectromètre de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substance.

Chromatographie en Phase Gazeuse (CG) : La chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour séparer les composants d'un mélange en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, notamment leur volatilité et leur affinité pour une colonne de séparation. L'échantillon est vaporisé puis injecté dans le système de CG où il est transporté par un gaz porteur (généralement de l'hélium) à travers une colonne de séparation. Chaque composant se déplace à une vitesse différente dans la colonne en fonction de ses interactions avec la phase stationnaire, ce qui entraîne une séparation des constituants du mélange.

Spectrométrie de Masse (MS) : La spectrométrie de masse est utilisée pour identifier les composants séparés par la CG. Dans cette étape, les molécules ionisées issues de la CG sont fragmentées en ions et leur rapport masse/charge (m/z) est mesuré. Ces spectres de masse générés sont uniques pour chaque composé

chimique, ce qui permet une identification précise des composants présents dans l'échantillon [128].

L'analyse GC-MS a été effectuée sur un système GC GC-17 Shimadzu, équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (longueur 30 m x diamètre interne 0,25 mm ID x 0,25 μ m d'épaisseur de film), couplé avec Shimadzu QP5050A MS. Toutes les données ont été obtenues par la collecte des spectres à balayage complet de masse. Les composés inconnus ont été identifiés par comparaison des spectres obtenus avec la bibliothèque de spectre de masse Wiley229. Les conditions opératoires de la CG/MS sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2.III : Conditions opératoires du CG/MS

Conditions	Valeur
Volume d'échantillon injecté	1 μ l
Gaz vecteur	Hélium (He) à 1,7 ml/min
Température de l'injecteur splitless	275°C
Température de la ligne de transfert	300°C
Température de la source d'ions	300°C
Énergie d'ionisation	70 eV
Programmation de température du four	51°C (maintenir pendant 1 min.), augmentation à un taux de 5°C/min jusqu'à 251°C (maintenir pendant 5 min.)

II.2. ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA PLANTE

EXTRAITS DE *Salvia chudaei* :

- ❖ Extrait aqueux
- ❖ Extrait éthanolique (obtenu par sonication)
- ❖ Huile essentielle



Etude de l'activité antimicrobienne

Evaluation du pouvoir antioxydant

Etude de la toxicité aigue

Etude l'activité analgésique par le test de contorsion induite par l'acide acétique

Etude de l'activité anti-inflammatoire par le test d'œdème induit par la carragénine

Evaluation du pouvoir antibactériens :

- ❖ Méthode de diffusion sur milieu solide
- ❖ Détermination de la CMI

Evaluation du pouvoir antifongique par la méthode de contact directe sur milieu P.D.A

- ❖ Capacité antioxydante totale
- ❖ Test DPPH
- ❖ Test du Blanchiment du β -carotène
- ❖ Test FRAP

Détermination de la DL50

Figure 2.4: Représentation de la deuxième partie : étude des activités biologiques de la plante

II.2 Etude des activités biologiques

II.2.1 Activité antibactérienne

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des différents extraits issus de la plante étudiée (extrait éthanolique, extrait aqueux et huile essentielle) au cours des étapes précédentes sur une gamme de souches microbienne, nous avons utilisés deux méthodes :

II.2.1.1 La méthode de diffusion sur milieu solide

Le principe de la méthode repose sur la diffusion des extraits à tester en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration. Après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible, l'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible ou résistante [129].

Chaque souche bactérienne ou levure est revivifiée dans 9ml de bouillon nutritif puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La turbidité du bouillon nutritif indique le développement de souches cultivées.

A partir des cultures préparées précédemment, Les bactéries sont ensemencées en stries sur des boîtes de pétri contenant le milieu gélose nutritif solide à l'aide d'une anse stérile et incubées à 37C° pendant 24 heures pour les bactéries et à 25C° pendant 48 heures pour les levures, afin d'obtenir une culture jeune (des cellules bactériennes en phase exponentielle de croissance) et avec des colonies bien isolées.

A partir d'une culture bactérienne jeune de 18 heures, on réalise des suspensions en mettant quelques colonies dans 5ml d'eau physiologique stérile, afin d'avoir une solution de 0.5 Mac Ferland ou une Densité Optique (DO à 600 nm) de 0.08-0.1 correspondant à 10^8 UFC/ml. A partir d'une culture fongique jeune de 48heures, on réalise des suspensions, on dilue quelques colonies dans 5ml d'eau physiologique stérile à fin d'avoir une solution de 2 Mac Ferland ou une densité Optique (DO à 600 nm) de 0.32-0.4 correspondant à 4.10^8 UFC/ml.

Des milieux de cultures Mueller Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures), sont préalablement coulés dans des boîtes de Pétri. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse pendant 15 min.

L'ensemencement de la Gélose avec la suspension est réalisé sur toute la surface par la méthode d'écouvillonnage dans trois direction ou en utilisant un ensemencement rotatif.

Des disques stériles de 6 mm sont imbibé avec 25µl de d'huile essentielle ou d'extrait éthanolique ou extrait aqueux (à raison de 300µg d'extrait par/disc) sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn puis incubées à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 25C° pendant 48 h pour les levures [130].

Un contrôle négatif est également effectué en utilisant un disque de papier imprégné de DMSO.

Après incubation, l'absence de croissance bactérienne exprimant une activité antimicrobienne se traduit par un halo translucide autour du disque, de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré à l'aide d'une règle graduée millimétrée.

II.2.1.2 La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

Le test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) est une méthode utilisée en microbiologie pour évaluer l'efficacité d'un agent antimicrobien contre des micro-organismes spécifiques. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'inhiber visiblement la croissance d'un micro-organisme donné.

La CMI a été déterminée selon la méthode utilisée par Weigand et *al.*, (2008) pour déterminer la plus faible concentration de l'ingrédient actif nécessaire pour empêcher la croissance des micro-organismes [129] . Cent microlitres de bouillon nutritif, utilisé comme milieu de stimulation, ont été ajoutés aux puits de la plaque. Ensuite, 100 µl d'extrait ont été ajoutés au premier puits et mélangés de manière homogène par un processus de pipetage, 100 µl ont été prélevés et déposés dans le puits suivant. Une dilution a été réalisée jusqu'au puits 6. Le milieu + bactéries (témoin

négatif) a été ajouté au puits 7, et seul le milieu (témoin négatif) a été ajouté au puits 8. La plaque a été enveloppée dans du papier aluminium et incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. À la fin de l'incubation, la turbidité a été examinée et les valeurs de DO à 600 nm ont été mesurées.

II.2.2 Activité antifongique

L'étude du pouvoir antifongique des extrait de *Salvia chudaei* est évaluée in vitro, par la méthode de contacte directe sur milieu P.D.A, vis-à-vis de quatre souches fongiques : *Fusarium equiseti*, *Fusarium redolens* , *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*

Cette méthode est l'une des plus utilisées dans la détermination de Taux d'inhibition d'un agent antifongique et antimicrobien [129]. Quand ce dernier est soluble, il est mélangé et dilué dans de l'agar, puis le champignon est inoculé sur ce milieu. Si l'agent est insoluble ou faiblement soluble, il est mis sur l'agar et une suspension de spores du champignon étudié est pulvérisée.

Diverses dilutions des extraits éthanolique et aqueux ont été élaborées dans le but d'évaluer leur effet antifongique. Après des essais préliminaires, une plage de concentration a été sélectionnée, s'étendant de 5 mg/ml à 25 mg/ml.

Trois volumes distincts d'huile essentielle, variant de 5 à 20 µl, ont été choisis pour correspondre à différentes concentrations.

- Chaque dilution de l'extrait est ajoutée aseptiquement à 15 ml de milieu de culture P.D.A.

- Les boîtes de Pétri ainsi préparées ont été légèrement agitées pour assurer l'homogénéisation du milieu avec les extraits.

- Les cultures témoins ont été préparées 15 ml PDA additionné de DMSO pour l'évaluation de l'effet d'extrait.

- Après solidification, à l'aide d'une pipette pasteur stérile le repiquage a été fait par dépôt d'un disque mycélien de 6 mm de diamètre de chaque souche fongique étudié, issu du périphérique des cultures jeunes développées sur milieux PDA.

- Les boîtes de Pétri préparées ont été scellées par du para film et incubées à l'obscurité pendant 6 jours dans une étuve réglée à 24 °C.
- Pour chaque concentration trois répétitions ont été effectuées.

La lecture des résultats est basée sur la mesure de diamètre de croissance radiale mycélienne en fonction de temps afin de calculer le taux d'inhibition. Ce dernier est évalué par le calcul du pourcentage de réduction de la croissance mycélienne, par rapport au témoin selon la formule suivante:

$$TI\% = [(DT - D) / DT] \times 100 \text{ [131]}.$$

TI% : taux d'inhibition de la croissance mycélienne.

DT : diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon (en cm) dans la boîte de Pétri (témoin).

D : diamètre moyen de la croissance mycélienne du champignon dans la boîte Pétri qui contient l'extrait.

II .2.2.1 Etude de l'effet fongicide ou fongistatique des extraits

L'effet fongicide ou fongistatique des extraits étudiés sur les souches fongiques testées, a été évalué par le transfert d'un fragment à partir de la zone d'inhibition sur une nouvelle boîte pétri contenant le milieu PDA par la méthode de repiquage.

Si l'inhibition de cette croissance persiste après 6 jours d'incubation, le pouvoir fongicide de l'extrait est alors confirmé.

En cas de reprise de la croissance mycélienne, l'extrait de plante est dit à activité fongistatique.

II.2.3 Activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, telles que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon contenant des antioxydants capables d'inhiber la génération de

radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes principaux : le transfert d'atome d'hydrogène ou le transfert d'électron [132].

Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène, tandis que les méthodes basées sur le transfert d'électron évaluent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron pour réduire divers composés, y compris les métaux, les carbonyles et les radicaux. Ainsi, il est recommandé d'utiliser différents tests pour confirmer l'activité antioxydante [132] ; [133]. Pour cela l'activité antioxydante des différents extraits de *Salvia chudaei* a été évaluée par plusieurs tests.

II.2.3.1 La capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante des différents extraits a été évaluée au moyen de la méthode du phospho-molybdène, qui se base sur la réduction du molybdate de molybdène VI (MO(VI)) en molybdate de molybdène V (MO(V)) [134].

Pour cela, un réactif a été préparé en mélangeant 0,6 M d'acide sulfurique avec 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium. Ensuite, 3,6 ml de ce réactif ont été mélangés avec 0,4 ml d'extrait à tester, suivi d'une incubation en bain-marie à 95°C pendant 90 minutes.

Une fois refroidi, l'absorbance du mélange a été mesurée à 695 nm en utilisant un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait.

La capacité antioxydante a été exprimée en µg d'acide ascorbique équivalent par milligramme d'extrait, fournissant ainsi une mesure quantitative de l'activité antioxydante de chaque extrait.

II.2.3.2 Test du piégeage des radicaux libre (DPPH)

La méthode DPPH (diphenyl picryl-hydrayl) est basée sur la réduction d'une solution alcoolique du DPPH• en présence d'un atome d'hydrogène antioxydant donneur (AH), qui entraîne la formation d'une forme non radicalaire, DPPH-H (diphényl picrylhydrazine).

Un volume de 3.9 ml de la solution méthanolique de DPPH (0,004 %) est mélangé avec (0.1ml) de différentes concentrations de chaque extrait (aqueux, éthanolique et HE) respectivement. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est déterminée à 517 nm contre un blanc qui contient juste la solution DPPH.

Le pouvoir antioxydant est exprimé en pourcentage d'inhibition, qui est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = ((\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs blanc}) \times 100$$

II.2.3.2.1 Calcul des IC50

La concentration inhibitrice IC50 représente la concentration minimale inhibitrice nécessaire pour diminuer la teneur en radicaux libres de 50%, elle est déterminée partir des courbes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations utilisées [135].

II.2.3.3 Le test de blanchiment de la bêta-carotène

C'est une technique spectrophotométrique utilisée pour évaluer la capacité d'un composé à agir en tant qu'antioxydant. Le principe du test repose sur la mesure de la décoloration du β -carotène, qui est oxydé par les radicaux peroxydes produits lors de la décomposition de l'acide linoléique. Ces radicaux libres oxydent le β -carotène, entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge. Cette décoloration est suivie par spectrométrie à 470 nm [136].

On mélange 0,5 mg de β -carotène avec 200 μ l de tween 40, 25 μ l d'acide linoléique et 1 ml de chloroforme. Puis on évapore le mélange à l'aide d'un évaporateur rotatif et on ajoute 50 ml d'eau oxygénée à la solution (afin d'avoir une absorbance comprise entre 0.5 et 0.6).

Dans chaque puits d'une plaque, on met 40 μ l de chaque concentration des extraits testés et du standard (acide ascorbique) à 160 μ l de la solution de β -carotène préparée précédemment.

La plaque est incubée à 45°C et l'absorbance est déterminée à 470 nm est enregistrée toutes les 30 minutes pendant 2 heures.

Le pourcentage d'inhibition de blanchiment de la β -carotène est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(DO_{E120} - DO_{T120}) / (DO_{T0} - DO_{T120})] \times 100$$

DO_{E120} : Absorbance de l'extrait à T = 120 min (temps final)

DO_{T120} : Absorbance du témoin négatif à T = 120 min (temps final)

DO_{T0} : Absorbance du témoin négatif à T = 0 min (temps initial)

Le pourcentage d'inhibition de blanchiment indiquera la capacité de l'échantillon à prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène, en neutralisant les radicaux libres produits par l'acide linoléique. Une inhibition élevée indique une forte activité antioxydante du composé testé.

II.2.3.4 Pouvoir réducteur du Fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur des extraits a été évalué en utilisant la méthode de Decker et Welch [137]. 1 ml d'extrait à une concentration de 1 mg/ml a été mélangé avec 0,1 ml de $FeCl_2$ (2 mM). La réaction est initiée par l'ajout de 0,2 ml de Ferrozine (5 mM), suivi d'une agitation et d'une incubation pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance est lue à 562 nm et les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} selon la formule suivante :

$$I (\%) = (Do_{\text{control}} - Do_{\text{extrait}}) / Do_{\text{control}} \times 100$$

$I(\%)$: Pouvoir réducteur.

Do : Absorbance à 562 nm.

II.2.4 Toxicité aigue

L'évaluation de la toxicité aiguë d'un extrait est une étape essentielle dans la recherche biomédicale et la sécurité des produits. Afin de mettre en évidence

d'éventuels effets toxiques des extraits obtenus, et de déterminer la dose létale 50 (DL₅₀) [138].

Des souris de sexe male et femelle sont répartis de manière aléatoire en plusieurs lots (n=6). Les animaux sont mis en diète hydrique pendant 18 heures avant le test. Chaque animal reçoit par voie orale une dose unique (0.500 ; 1 ; 2 ; 5g/kg) de l'extrait aqueux, éthanolique ou l'huile essentielle. Les animaux sont attentivement surveillés après l'administration de l'extrait et d'éventuels signes de toxicité, tels que changements de comportement, modifications physiologiques, ou mortalité sont notés.

À la fin de la période d'observation qui est de 14 jours, les résultats sont analysés pour déterminer la dose létale médiane (DL₅₀).

II.2.5 Activité analgésique

L'activité analgésique est le pouvoir de supprimer ou de réduire les spasmes musculaires involontaires, en particulier dans les muscles lisses du tractus gastro-intestinal, de l'utérus ou des voies urinaires. Les spasmes peuvent être douloureux et entraîner des symptômes désagréables.

Il existe différents agents antispasmodiques, tels que des médicaments, des herbes et des thérapies, qui peuvent être utilisés pour traiter les spasmes. Les antispasmodiques agissent généralement en bloquant les récepteurs muscariniques du système nerveux parasympathique, ce qui diminue la stimulation des muscles lisses et réduit ainsi les contractions involontaires. D'autres agents agissent en inhibant les canaux calciques des cellules musculaires, ce qui réduit l'entrée de calcium dans ces cellules et limite les contractions.

L'effet analgésique des extraits a été déterminé en mesurant le nombre de torsions abdominales induites par l'injection intra-péritonéale (IP) de l'acide acétique, selon la méthode décrite par Liu et al. (2015) [139]. Cinq groupes de six souris chacun ont été utilisés dans cette évaluation, et les différents groupes ont reçu des traitements par voie orale comme suit :

- Groupe témoin reçoit 0,5 ml de solution saline.
- Groupe de référence reçoit du paracétamol® à une dose de 100 mg/kg de poids corporel.

- Trois Groupes reçoivent une dose de 500 mg/kg de poids corporel des extraits ethanolique, aqueux et l'huile essentielle respectivement.

Après 30 minutes, les souris ont été soumises à une injection intrapéritonéale de 200µl d'acide acétique à 0,6 %. Cinq minutes après l'injection, le nombre de contractions abdominales a été compté pendant une période de 30 minutes.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de protection en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de protection (\%)} = [(NC_c - NC_T) / NC_c] \times 100.$$

NC_c : le nombre de contractions dans le groupe témoin (solution saline)

NC_T : le nombre de contractions dans le groupe traité (paracétamol® et les différents extraits).

II.2.6 Activité anti-inflammatoire

Le but de ce test est la mesure de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Salvia chudaei*. Le principe repose sur la détermination du pourcentage d'œdème de la patte provoqué par l'injection de carraghénane [140]. Cette inflammation peut être réduite par l'administration d'un anti-inflammatoire.

Dans cette expérience, 5 groupes de 6 souris chacun ont été utilisés :

- ✓ Un groupe témoin reçoit 0,5 mL de solution saline ;
- ✓ Un groupe de référence reçoit 50 mg/kg de diclofénac ;
- ✓ Trois autres groupes reçoivent les extraits de *Salvia chudaei* (aqueux, ethanolique et l'huile essentielle) à la concentration de 500 mg/kg.

L'œdème a été induit 30 minutes après l'administration des extraits par l'injection d'une solution de carraghénane à 1% dans une solution saline (0,9% de NaCl) dans la surface plantaire de la patte arrière droite des souris. Les volumes des pattes injectées ont été mesurés 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h après l'injection.

L'importance de l'œdème a été appréciée par la détermination de la moyenne du pourcentage d'augmentation (%AUG) du volume de la patte de la souris suivant la formule :

$$\text{AUG (\%)} = [(V_t - V_0) / V_t] \times 100.$$

V_t : Volume de la patte au temps t ;

V_0 : Volume initial de la patte.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème selon la formule :

$$\text{INH (\%)} = [(AUG \text{ témoin} - AUG \text{ traité}) / AUG \text{ témoin}] \times 100$$

II.2.7 Analyse statistique

L'analyse des résultats des tests a été réalisée sur la base du traitement statistique en utilisant le logiciel Graph Prism version 9. One way ANOVA, multi comparaison ANOVA ET Tuckey test ont été utilisé comme traitement statistique. Les différences sont considérées comme significatives si $p < 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats de l'étude phytochimique de la plante

I.1. Screening phytochimique

Le Screening phytochimique a été effectué dans le but d'identifier toutes les composantes chimiques présentes dans la plante et de cibler plus ou moins précisément les molécules responsables des différentes propriétés de la plante. Cette analyse vise à obtenir une vue d'ensemble des constituants chimiques de la plante et à explorer leur potentiel pour expliquer les divers effets et propriétés associés à cette plante. Les résultats sont présentés dans le tableau :

Tableau 2.IV : Résultats du screening phytochimique

Les composés chimiques			Réactions	Résultats
Tannins	Tannins catéchiques		Alcool iso amylique	(+) : Apparition d'un précipité rougeinsoluble dans l'alcool iso amylique
	Tannins galliques		Réactif de Stiasny	(-) : Négatif
Flavonoïde	Flavonoïdes libres		Réaction de cyanidine	(+) : Apparition d'une couche rouge surnageant
	Leucoanthocyanes		Réaction cyanidine sans ajouter de magnésium	(-) : négatif
	Anthocyanes		H2SO4 + NH2OH	(+) : coloration bleu violacé
Les Coumarines			NH4OH	(+) : apparition d'une fluorescence jaune sous UV
Les Alcaloïdes			Réactif de Dragendorff	(-) : Négatif
Les Dérivés anthracéniques	Anthracéniques libres		Réaction de borntrager	(+) : une coloration plus ou moins rouge
	Anthracéniques Combinés	O-	Réaction de borntrager	(+) : une coloration plus ou moins rouge
		C-	Réaction de borntrager	(-) : négatif
Les Hétérosides cardioniques			Réaction de Liebermann burchard par l'intermédiaire de réactif de Baljet	(+) : l'apparition d'unecoloration orangée
Les Saponoside			Test de Mousse	(+) : la formation de mousse.
Les Composés réducteurs			Liqueur de Fehling	(+) : La formation d'un précipité rouge brique
Les Mucilages			Alcool absolu	(+) : La formation d'un précipité floclanconneux

(+) : réaction positive (-) : réaction négative

Les tests phytochimiques qualitatifs ont révélé la présence de diverses familles de produits naturels dans la plante étudiée. Parmi ces composés, on a identifié des polyphénols, tels que les flavonoïdes (flavonols, flavononols et anthocyanes), les tanins (catéchiques) et les coumarines. De plus, des hétérosides ont été détectés, notamment les dérivés anthracéniques (libres et combinés), les hétérosides cardiotoniques, les saponosides, les composés réducteurs et les mucilages. Ces composés ont montré des réactions caractérisées par des couleurs très intenses. Notamment, les alcaloïdes sont absents ou présents en quantités très faibles dans cette plante.

Les résultats obtenus sont cohérents avec des études antérieures menées sur la même plante par krimat et al (2022) et Hammoudi (2015) , qui ont également révélé la présence de flavonoïdes, tanins, hétérosides, triterpènes, saponosides, anthraquinones. Ils ont aussi rapporté l'absence d'alcaloïdes[141] et [119].

Ces résultats suggèrent que la plante possède une activité biologique intéressante. Bien que les conclusions soient générales et imprécises, elles sont encourageantes en raison des propriétés pharmacologiques connues de ces composés, qui sont impliqués dans de nombreuses activités biologiques.

I.2. Préparation des extraits

Les parties aériennes de *Salvia chudaei* ont été soumises à divers types d'extraction : macération, macération sous ultrasons et extraction par soxhlet en utilisant l'éthanol comme solvant. Un extrait aqueux a été également obtenu par macération.

D'après les résultats présentés dans le tableau V, il est clair que l'extraction par ultrasons produit le rendement le plus élevé en termes de matière extractive. Cette observation peut être expliquée par le mécanisme d'action des ondes ultrasonores.

En effet, les ondes ultrasonores génèrent des bulles de cavitation dans le solvant, qui implosent avec force lorsqu'elles entrent en contact avec la matière première. Ces forces de cavitation agissent sur les parois cellulaires, les rompent et permettent une libération rapide des composés souhaités présents dans la matière première [142].

Tableau 2.V : Rendements des extractions

Extraits	Méthode d'extraction	Rendement en (%)
Ethanolique	Macération	12,23%
	Macération sous ultrasons	14,75%
	Soxhlet	11,98%
Aqueux	Macération	8,63%

En comparaison, dans d'autres méthodes telles que la macération ou le Soxhlet, l'extraction des composés peut être plus lente et moins efficace. La macération repose sur la diffusion des composés dans le solvant, tandis que le Soxhlet fonctionne par extraction continue mais avec une action moins intense sur les parois cellulaires. Ces méthodes peuvent être moins efficaces pour extraire les composés, surtout lorsque la matière première est difficile à pénétrer [143] ; [144].

I.3.Quantification de composés phénoliques

Les métabolites secondaires englobent une vaste gamme de molécules présentes dans les plantes, avec leur nature chimique et leurs concentrations variant considérablement d'une espèce à l'autre. Pour évaluer les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins contenus dans les extraits précédemment préparés, des dosages spectrophotométriques ont été effectuée. Les teneurs ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage et exprimées en microgrammes équivalent d'étalon par milligrammes d'extrait. Ces dernières sont représentées en tableau 2.VI.

Les divers extraits éthanoliques obtenus par différentes méthodes d'extraction montrent une importante variation dans leurs concentrations en composés phénoliques. L'analyse statistique, effectuée (ANOVA one way), n'a révélé aucune différence significative ($p=0.778$) entre les différentes concentrations obtenues par les divers procédés d'extraction. Cependant, la méthode de macération sous ultrasons a produit des concentrations élevées, atteignant $765,85 \pm 1,20$ μg d'acide gallique/mg

d'extrait pour les polyphénols totaux, $84,32 \pm 1,98$ μg de quercétine/mg d'extrait, et $16,15 \pm 3,9$ μg d'acide tannique/mg d'extrait pour les flavonoïdes et les tanins respectivement.

Tableau 2.VI : Teneurs en composés phénoliques

Extraits	Polyphénols totaux (μg d'acide gallique/mg d'extrait)	Flavonoïdes (μg de quercétine/mg d'extrait)	Tanins (μg d'acide tannique/mg d'extrait)
Extrait éthanolique par macération	$556,72 \pm 2,56$	$72,01 \pm 3,21$	$14,65 \pm 0,95$
Extrait éthanolique par soxhlet	$249,08 \pm 3,27$	$64,38 \pm 4,20$	$13,09 \pm 0,7$
Extrait éthanolique par ultrasons	$765,85 \pm 1,20$	$84,32 \pm 1,98$	$16,15 \pm 3,9$
Extrait aqueux	$401,11 \pm 1,78$	$36,60 \pm 2,32$	$9,21 \pm 1,94$

L'extrait éthanolique par macération a donné des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins de : $556,72 \pm 2,56$ μg d'acide gallique/mg d'extrait ; $72,01 \pm 3,21$ μg de quercétine/mg d'extrait et $14,65 \pm 0,95$ μg d'acide tannique/mg d'extrait respectivement. Alors que l'extraction sous reflux (soxhlet) a permis de quantifier des valeurs de $249,08 \pm 3,27$ μg d'acide gallique/mg d'extrait pour les polyphénols totaux, $64,38 \pm 4,20$ μg de quercétine/mg d'extrait pour les flavonoïdes et $13,09 \pm 0,7$ μg d'acide tannique/mg d'extrait pour les tanins (Figure 2.4).

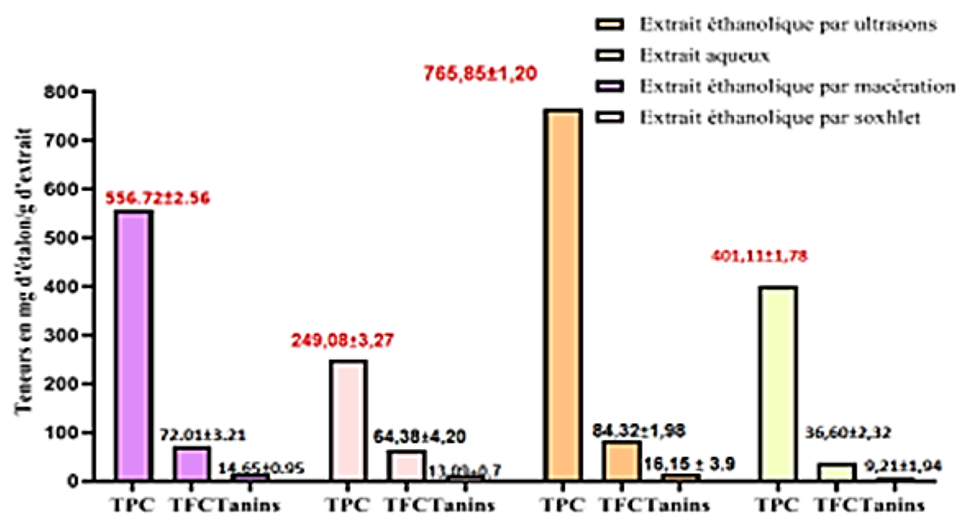


Figure 2.4 : Teneurs en polyphénols totaux (TPC), flavonoïdes (TFC) et tanins par différents procédé d'extraction.

L'extrait aqueux obtenu par macération affiche des quantités de $401,11 \pm 1,78$ μg d'acide gallique/mg d'extrait ; $36,60 \pm 2,32$ μg de quercétine/mg d'extrait et $9,21 \pm 1,94$ μg d'acide tanique/mg d'extrait pour les trois types de composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoides et tanins) respectivement.

Les méthodes d'extraction jouent un rôle crucial dans la quantification des composés phénoliques présents dans les échantillons. Différentes techniques d'extraction peuvent entraîner des variations significatives dans les teneurs en composés phénoliques mesurées.

Chaque méthode d'extraction peut extraire différents sous-groupes de composés phénoliques. Certains composés phénoliques sont mieux extraits par des solvants organiques, tandis que d'autres sont plus solubles dans l'eau. Par conséquent, le choix du solvant aura un impact sur les teneurs obtenues. Par exemple, les phénols non polaires peuvent être mieux extraits avec des solvants organiques, tandis que les anthocyanes et acides phénoliques sont plus solubles dans l'eau [144].

La méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction [145]. L'extraction assistée par ultrasons est une méthode rapide et efficace pour extraire les

composés phénoliques. Les ultrasons peuvent faciliter la rupture des parois cellulaires, augmentant ainsi le rendement d'extraction. Les ultrasons présentent l'avantage de réduire considérablement le temps d'extraction et d'augmenter le rendement d'extraction [142].

Samaoui et *al.*, (2019) rapportent que l'extrait aqueux de *Salvia chudaei* présente des teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes différentes des nôtres, elles sont de : 201,8 mg GAE/ g DW, 195. 6 mg ECE/g DW respectivement [146].

En outre Hammoudi et *al.*, (2017) trouvent des taux de poly phénols totaux de 187.2 ± 4.68 et 292.1 ± 3.81 mg GAE/g DW pour l'extrait éthanolique obtenu par macération ou par Soxhlet respectivement. Ces valeurs sont proches concernant l'extraction par soxhlet, mais restent inférieurs à ceux obtenus par macération [119].

Pendant la croissance de la plante, il est possible que la distribution des métabolites secondaires subisse des changements. Ces variations pourraient être associées à des conditions climatiques telles que des températures élevées, une exposition solaire intense, la sécheresse et la salinité. Ces facteurs peuvent stimuler la biosynthèse de métabolites secondaires comme les polyphénols [13] ; [147].

Il est important de noter que la teneur phénolique d'une plante est également influencée par divers autres facteurs tels que les conditions climatiques, le moment de la récolte, le solvant utilisé lors de l'extraction, le type de variété de la plante, l'environnement, le type de sol et les conditions de stockage [148] ; [149].

Les concentrations en composés phénoliques totaux présentes dans les extraits de *S. chudaei*, telles que déterminées au cours de cette étude, se révèlent être supérieures ou équivalentes à celles de certains autres extraits de *Salvia*. C'est notamment le cas pour *S. officinalis*, affichant une concentration de 431 ± 37 mg GAE/g d'extrait [150], ainsi que *S. tomentosa* et *S. fruticosa*, avec respectivement $349,72 \pm 1,27$ et $396,31 \pm 1,89$ mg GAE/g d'extrait [151], De plus, *S. cadmica* présente une concentration notable de $940,93 \pm 6,97$ mg GAE/100g d'extrait [152] .

En ce qui concerne le contenu total en flavonoïdes (TFC) des différentes espèces *Salvia*, plusieurs études ont rapporté des valeurs inférieures de TFC. Par exemple, l'espèce *S. officinalis* a affichée une teneur de 11,2 mg d'équivalent de

catéchine par gramme d'extrait [153]. En De même, *S. fruticosa* a affiché une valeur de $107,14 \pm 2,47$ mg d'équivalent de catéchine par gramme de matière déshydratée (DE) [154], tandis que *S. aramiensis* a présenté une valeur de $118,85 \pm 4,47$ mg d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait [155]. D'autres espèces, telles que *S. sclarea*, *S. atropatana*, *S. ahendica*, *S. hydrangea*, *S. xanthocheila*, *S. macrosiphon*, *S. glutinosa*, *S. chloroleuca*, et *S. ceratophylla*, ont montré des variations dans leur contenu en flavonoïdes. Les extraits méthanoliques de ces espèces se situaient dans une fourchette allant de $2,2 \pm 0,2$ à $36,2 \pm 0,5$ mg d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait [156].

La comparaison des valeurs de TPC (teneur totale en composés phénoliques) et de TFC (teneur totale en flavonoïdes) des extraits de *S. chudaei* avec les résultats rapportés dans la bibliographie permet d'avoir une idée de leur richesse en composés phénoliques. Néanmoins, il est important d'identifier le type de composés phénoliques présents dans ces échantillons, ce qui a été réalisé par la suite par HPLC-UV/VIS.

I.4. Analyse chromatographique par HPLC-UV/VIS

L'analyse chromatographique des deux extraits de *Salvia chudaei* (extrait éthanolique et aqueux) a été réalisé par HPLC-UV/VIS contre une gamme de composés phénoliques standards (40 composés). L'identification des différents composés était basée sur leur temps de rétention et sur leurs spectres UV-visible, en comparaison avec ceux des standards utilisés (Figure 2.5 et 2.6).

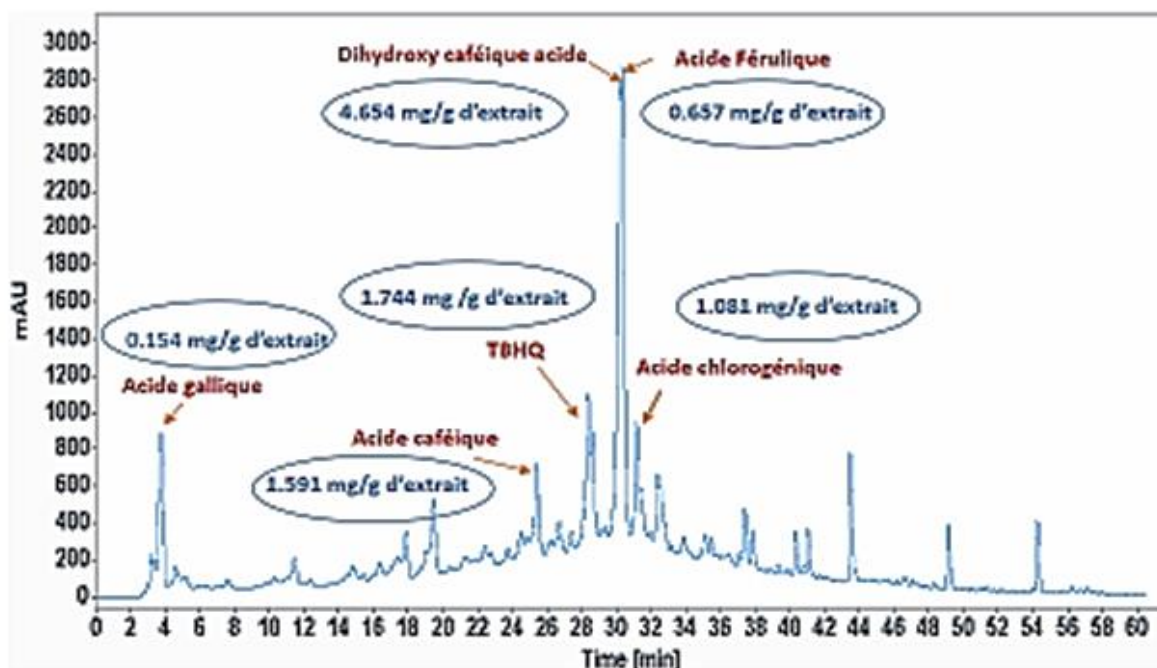


Figure 2.5 : Profil chromatographique par HPLC-UV/VIS de l'extrait éthanolique de *Salvia chudaei*

Les résultats sont répertoriés dans le Tableau V, mettant en lumière différentes catégories de composés phénoliques extraits de *Salvia chudaei*, notamment des acides dérivés du benzoïque tels que le catéchol et l'acide gentisique, ainsi que des acides hydroxycinnamiques tels que l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogénique et l'acide sinapique. De plus, on observe la présence du tert-butylhydroquinone (TBHQ), un dérivé d'hydroquinones, et de l'acide phénylpropanoïde, l'acide hydrocinnamique. Il est à noter qu'aucune recherche antérieure n'avait exploré le profil phénolique de l'extrait éthanolique de *S. chudaei*, faisant de ces résultats la première étude détaillée décrivant sa composition phénolique.

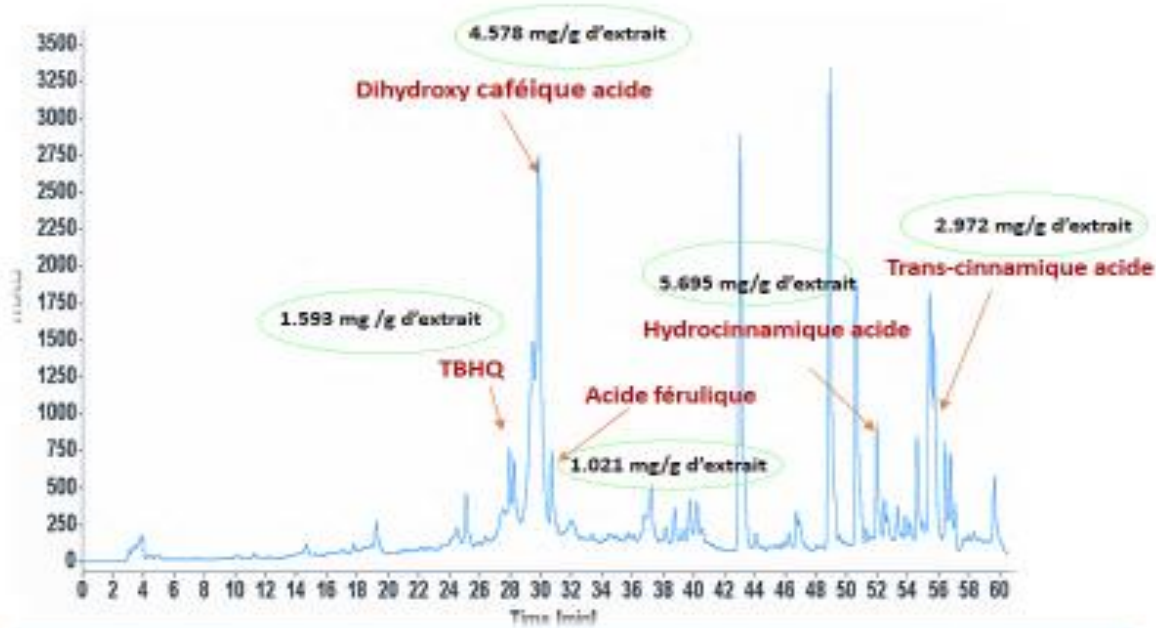


Figure 2.6 : Profil chromatographique par HPLC-UV/VIS de l'extract aqueux de *Salvia chudae*

En ce qui concerne la quantification, l'extract éthanolique révèle une concentration plus élevée en acide dihydroxy caféique (4,654 mg/g d'extract), TBHQ (1,744 mg/g d'extract), acide caféique (1,591 mg/g d'extract) et acide chlorogénique (1,080 mg/g d'extract). En revanche, l'extract aqueux présente des niveaux plus élevés d'acide hydrocinnamique (5,695 mg/g d'extract), acide dihydroxy caféique (4,578 mg/g d'extract), acide trans-cinnamique (2,972 mg/g d'extract), TBHQ (1,593 mg/g d'extract) et acide férulique (1,021 mg/g d'extract).

L'analyse a montré que les composés phénoliques étaient principalement représentés par des dérivés d'acide hydroxycinnamique (voir détails en ANNEXE B). Cette observation est conforme à des études antérieures menées sur d'autres espèces *Salvia* [157] ; [158] ; [159] ; [160]

La majorité des acides phénoliques dans les espèces *Salvia* sont exclusivement des dérivés de l'acide caféique notamment l'acide rosmarinique, l'acide coumarique et acide dihydroxy caféique. L'acide caféique joue un rôle central dans la biochimie des Lamiaceae et se présente principalement sous forme de dimère en tant qu'acide rosmarinique [161]. Dans les espèces *Salvia*, l'acide caféique sert de bloc de construction à une variété de métabolites végétaux, allant des monomères plus

simples aux produits de condensation multiples, donnant ainsi naissance à divers oligomères. Les trimères et tétramères sont particulièrement intéressants du point de vue thérapeutique, car ils ont démontré posséder des activités biologiques significatives [162].

Les monomères fréquemment présents dans les espèces du genre *Salvia* sont représentés par l'acide caféique [163] et d'autres dérivés monomériques, notamment l'acide férulique et l'acide isoferulique [164].

Les travaux de Tohma et *al.*, (2016) sur l'analyse en composés phénolique de plusieurs espèces du genre *Salvia*, rapportent que les principaux acides phénoliques étaient le kaempférol, l'acide rosmarinique, alors que les phénols moins abondants étaient l'apigénine, l'acide *p*-coumarique, lutéoline et l'acide chlorogénique [165]. Des différences dans la variété et la quantité de composés phénoliques provenant de différentes espèces *Salvia* sont attendues, car il est possible que la saison de récolte et l'origine géographique affectent les contenus phénoliques. De plus, chaque espèce a une composition phénolique unique propre à la plante [166].

Tableau 2.VII : Identification et quantification des composés phénoliques des extraits de *Salvia chudaei*

Nom du composé	Temps de rétention	Air	Concentration dans l'extrait éthanolique en mg/g d'extrait	Concentration dans l'extrait aqueux en mg/g d'extrait
Gallic acide	3.77	14584.74	0,0154	0,012
2,3,4-Trihydroxybenzoic acide	9.89	317.75	-	0,013
Catechol	11.45	3859.87	0,238	0,038
4-Hydroxybenzoic acide	15.41	450.23	-	-
4-Acetocatechol	16.36	1406.01	0,016	-
2,4-Dihydroxybenzoic acide	17.87	3939.20	0,062	0,11
Homovanillic acide	19.45	7804.18	0,819	0,379
3-hydroxybenzoic acide	19.96	109.77	-	-
Pyrogallol	21.27	1066.59	-	-
4-Methylcatechol	22.40	1229.87	0,065	-
phenol	22.77	585.53	-	-
2,3-hydroxybenzoic acid	23.75	880.74	-	
resorcinol	24.51	2329.70	0,093	0,084
caffeic acide	25.42	9133.21	1,591	0,759
2,6-dihydroxybenzoic acid	26.69	3220.78	0,396	-
coniferyl alcohol	27.40	1171.66	-	-
tert-butyl hydroquinone TBHQ	28.63	7052.27	1,744	1,593
Dihydroxycaffeic acide	30.21	31674.73	4,654	4,578
ferulic acid	30.33	32431.10	0,659	1,021

Tableau 2.VII : Identification et quantification des composés phénoliques des extraits de *Salvia chudaei* (Suite 1)

Nom du composé	Temps de rétention	Air	Concentration dans l'extrait éthanolique en mg/g d'extrait	Concentration dans l'extrait aqueux en mg/g d'extrait
chlorogenic acid	31.18	7840.10	1,081	-
Caffeic acide dimethyl ether	32.40	8977.25	0,076	0,021
Sinapic acid	33.87	1934.03	0,119	0,030
p-coumaric acid	36.07	117.78	-	0,030
hydroferulic acid	37.42	4173.80	0,267	0,137
4-Propylphenol	37.83	2524.78	0,074	0,038
3,4,5-trimethoxycinnamic acide	41.70	132.56	-	-
lawson	42.06	224.91	-	-
Acide salicylique	45,81	289,98	-	0,119
esculin	46.63	491.98	0,037	-
beta-carotene	47.08	300.09	0,027	0,200
hespertin	47.28	228.96	0,019	-
4-ethyl phenol	48,90	44755,76	-	0,723
benzoic acide	49.14	3664.67	0,067	-
3,5-Dimethoxyphenol	50.49	143.44	0,070	-
Hydrocinnamic acide	52.19	180.40	0,119	5,695
trans-cinnamic acid	56.25	501.54	0,079	2,972

1.5 Extraction des huiles essentielles

Dans notre étude, l'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne de *Salvia chudaei* par hydro-distillation a donné une huile essentielle de couleur jaune pâle, une odeur agréable, épicée rappelant l'odeur de la plante et avec un rendement de 1.33 %. Ce résultat est plus élevé par rapport à celui de Krinat et *al.*, (2015) [23], Hammoudi et *al.*, (2015) [119], qui rapportent des valeurs de 0.55% et 0.4 - 0.6% respectivement. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que nous avons testé une période de récolte différente et des conditions climatiques distinctes dans chaque étude.

Des variations significatives dans le rendement en huiles essentielles peuvent être observées, elles sont influencées par divers facteurs tels que les conditions de culture, la période de récolte, la méthode d'extraction, le type de variété de la plante et son origine géographique. Par exemple pour la sauge officinale : en France, le rendement est de 2,05%, en Hongrie de 2,50%, au Portugal de 2,90% et en Roumanie de 2,30% [167]. En Tunisie, on observe un rendement de 2,55% pour la variété de la région de Djebel ouest et de 1,80% pour celle de Marsa [13]. En Serbie, les espèces *Salvia pratensis* et *Salvia berolonii* présentent des rendements encore plus bas, respectivement de 0,073% et de 0,0016% [168]. En Turquie, une étude a montré des rendements de 0,5% pour l'espèce *S. heldreichiana* et de 0,4% pour *S. cryptantha* [169]. D'autres espèces de sauge récoltées en Turquie, telles que *S. aramiensis* et *S. cyanescens*, présentent des rendements de 2,2% et 0,04% respectivement [170].

1.6 Analyse de l'huile essentielle par CG/MS

La composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia chudaei* a été déterminée par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse (CG/MS). L'identification des différents constituants chimiques des huiles essentielles est réalisée selon l'ordre d'élution, leurs teneurs relatives et grâce à la comparaison de leurs indices de rétention de Kovats avec ceux donnés dans la littérature. Les spectres de masse obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées. Cette analyse a fait ressortir 26 composés en totale. Ils sont représentés en tableau VI.

Tableau 2.VIII : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia chudaei*

N	Temps de rétention (min)	Composé identifié	%	Nature chimique
1	5,819	alpha.-pinéne	24,22	Monoterpène
2	6,231	Camphène	1,75	Monoterpène
3	6,964	l-.beta.-Pinéne	1,04	Monoterpène
4	8,056	Alpha.-Terpinéne	0,37	Monoterpène
5	8,285	PARA Cymène	1,09	Monoterpène
6	8,414	l-Limonéne	0,38	Monoterpène
7	9,276	gamma.-Terpinéne	2,31	Monoterpène
8	10,088	Terpinolène	0,53	Monoterpène
9	12,784	L Bornéol	0,89	Alcool monoterpène
10	13,035	Terpine-4-OL	0,34	Alcool monoterpène
11	16,204	Bornyl acetate	34,09	Ester monoterpène
12	17,833	Acétate de trans-Pinocarvyl	1,51	Ester monoterpène
13	19,508	NI	1,61	-
14	19,738	Acétate de Limonén-10-yl	0,35	Ester monoterpène
15	20,048	trans-Caryophyllène	4,21	Sesquiterpène
16	20,225	Mentha-1,4,8-triéne	1,75	Monoterpène
17	21,133	DELTA.-cadinéne	0,27	Sesquiterpène
18	21,908	Valencène	3,78	Sesquiterpène
19	22,132	Isolédène	0,7	Sesquiterpène
20	22,324	(A)germacréne	0,29	Sesquiterpène
21	22,583	gamma.-Cadinéne	2,99	Monoterpène

NI : non identifié

Tableau 2.VIII : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia chudaei* (Suite 1)

N	Temps de rétention (min)	Composé identifié	%	Nature chimique
22	22,763	1S, CIS-Calamenène	0,3	Monoterpène
23	24,391	NI	0,32	-
24	25,229	Alpha. –Cubebène	0,87	Sesquiterpène
25	25,91	NI	5,69	-
26	26,253	Elémol	8,36	Alcool sesquiterpène

NI : non identifié

L'analyse de l'huile essentielle de *Salvia chudaei* a mis en évidence deux principales classes de composés, les monoterpènes qui représentent 73,9% de la masse totale, et les sesquiterpènes qui représentent 18,48%.

Parmi les monoterpènes identifiés, les hydrocarbures mono-terpéniques sont les plus abondants et comprennent des composés tels que : l'alpha Pinène (24,22%), le gamma-Cadinène (2,99%), le gamma-Terpinène (2,31%), le Camphène (1,75%), le Mentha-1,4,8-triene (1,75%), le Para cymène (1,09%), le l-beta.-pinène (1,04%), le terpinolène (0,53%), le l-limonène (0,38%) et l'Alpha terpinène (0,37%). On trouve également des alcools mono-terpéniques comme le Terpene-4-ol (0,34%) et le L-Bornéol (0,89%), ainsi que trois esters ; l'acétate de bornyl (34,09%), l'acétate de trans-Pinocarvyl (1,51%) et l'acétate de Limonen-10-yl (0,35%).

Quant aux composés sesquiterpènes, ils comprennent principalement des hydrocarbures tels que le trans-caryophyllène (4,21%), la Valencène (3,78%), l'alpha-Cubebène (0,87%), le (-)-Isolidène (0,7%), l'A-germacrène (0,29%) et le Delta.-cadinène (0,27%). On trouve également un alcool sesquiterpénique, l'elemol (8,36%).

En résumé, l'huile essentielle de *Salvia chudaei* est dominée par les monoterpènes, avec une forte présence d'hydrocarbures mono-terpéniques, suivis des sesquiterpènes, principalement sous forme d'hydrocarbures sesquiterpéniques.

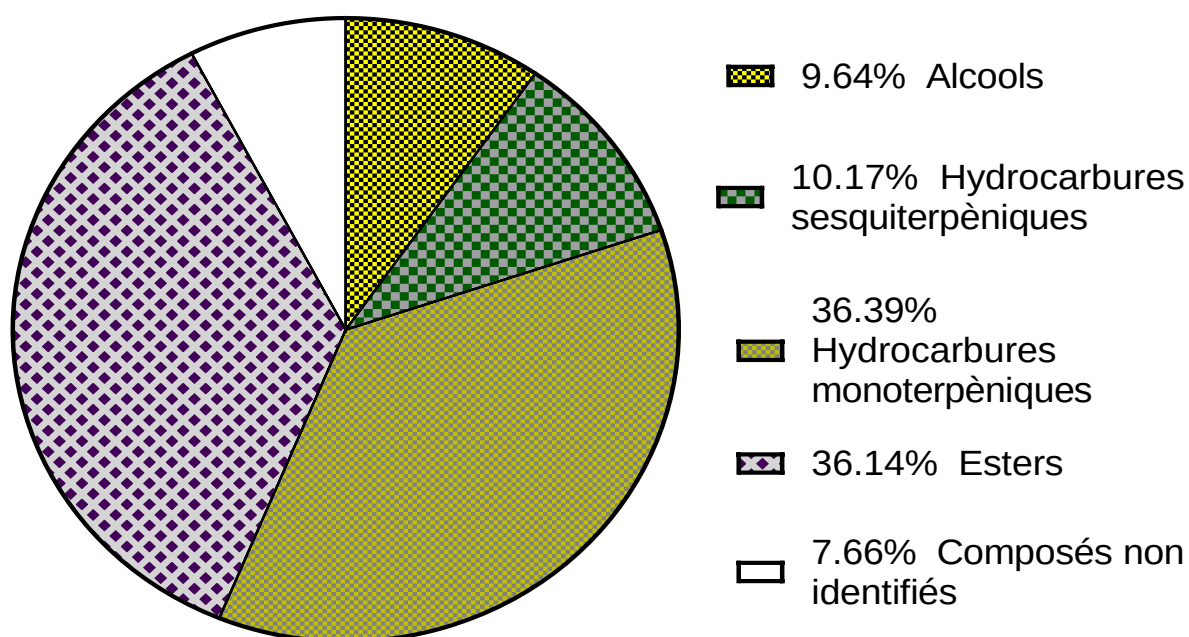


Figure 2.7 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia chudaei*

Les composés majoritaires caractérisant cette huile sont : bornyl acetate (34.09%), alpha Pinene (24.22 %), trans-caryophyllene (4.21 %) et Valencène (3.78 %). Des études similaires sur la même espèce, ont rapporté la présence de ces composés mais avec des teneurs différentes, elles sont de 20.5 %, 6.9%, 10.6 %, 9.3 % respectivement [141].

Selon l'analyse phytochimique des espèces *Salvia*, les principaux constituants sont des monoterpènes, des sesquiterpènes et des composés phénoliques [171]; [172];[173]; [159] ; [174]. Plusieurs travaux antérieurs ont signalé, que les principaux composants de l'huile essentielle de *Salvia* sont le 1,8-cinéole (eucalyptol), l' α et β -thuyone, l' α et β -pinène et le bornéol. Cependant, certains auteurs ont noté qu'il existe des variations significatives spécifiques à chaque espèce dans la concentration de ces composés en présence d'autres. De plus, comme c'est le cas avec d'autres plantes médicinales et aromatiques, la composition de l'huile essentielle des espèces *Salvia* est grandement influencée par des facteurs génétiques et environnementaux [175] ; [162] ;[176].

Parmi les espèces *Salvia* partageant la même prédominance de composés monoterpéniques mais à des proportions différentes, nous citons: *Salvia hydrangea*, dont l'huile essentielle a été également caractérisée par une quantité relativement élevée en monoterpènes oxygénés (69.6%) et avec le camphre (54.2%), l' α -humulène (4.0%), le Cis-sesquisabinène hydraté (2.8%), le myrténol (2.6%), le β -bisabolol (2.2%) et le 1,8 -cinéole (2.1%) comme composés majoritaires [176].

L'étude réalisée par Akin et al., (2010) a montré que le camphre (19.1%), le 1,8-cinéole (16.4%), le bornéol (11.9%), et l'acétate de bornyle (2.4%) sont les principaux constituants de l'huile de *Salvia cryptantha*. Alors que le linalool (9.4%), l' α -pinène (5.6%), le 1,8-cinéole (5.6%), le bornéol (5.6%), la cryptone (5.3%), l'acétate de linalyle (4.9%), l' α -terpinéol (4.4%) sont les principaux constituants de l'huile de *Salvia heldreichiana* [169].

Ibrahim kivrak et al., (2009) rapportent que l'huile essentielle de *Salvia potentillifolia* affichait une prédominance de composés monoterpéniques avec : l' α -pinène (29.2%), le β -pinène (14.9%), le 1,8 cinéole (7,44%) et le limonène (2,64%) comme composé majoritaires [177].

II. Résultats de l'étude des activités biologiques des extraits de *Salvia chudaei*

L'objectif principal de cette étude était de mener une évaluation complète des propriétés biologiques des extraits de *Salvia chudaei*, à savoir l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire, et analgésique, tout en examinant leur toxicité. Ces investigations visaient à apporter une contribution significative à la reconnaissance et à la validation des vertus thérapeutiques de la plante. Ce faisant, elles cherchaient à étayer l'usage traditionnel de cette plante en médecine en mettant en lumière ses bénéfices potentiels pour la santé.

II.1. Activité antibactérienne

Les extraits de *Salvia chudaei* ont été soumis à des tests d'activité antibactérienne contre un total de 12 souches bactériennes, comprenant des Gram positifs et des Gram négatifs, ainsi que 2 levures. Ces micro-organismes sont connus pour être les agents responsables d'infections affectant divers systèmes, notamment les voies respiratoires, gastro-intestinales, urinaires et la peau. Pour évaluer cette activité, deux méthodes ont été utilisées : la diffusion sur milieu solide et la méthode de dilution pour déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VIII : Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)				CMI mg/ml
	Huile essentielle	Extrait ethanolique	Extrait aqueux	AMP 10 µg	
Gram +					
<i>Bacillus subtilis</i> ATTC 6633	16 ± 2.13	10 ±0.55		-	1.75
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 6538	23.33 ± 1.52	14.5 ±1.32	7 ± 1,00		1.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATTC 12228	20.16 ± 2.02	10.33 ±0.57		-	1.5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATTC 29122	30 ± 2.56	6.5 ±0.50		30	1.25
<i>Sarcina lutea</i>	38.25 ± 1.52	15 ±2.00			0.5
Gram-					
<i>Echerichia coli</i> ATTC 10536	-	8 ±1.00	7.66 ±1,00	-	
<i>Echerichia coli</i> ATTC 2378	-	-		24	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC 27853	-	-		-	
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATTC2372	-	6.5 ±0.5	6,5 ± 0,86	18	
<i>Citrobacter diversus</i>	-	7.16 ±1.00		20	
<i>Shigella flexneri</i>	-	6.5 ±1.3		22	
Levure					
<i>Candida albicans</i> ATTC 10231	-	-	-	-	
<i>Candida tropicalis</i>	8 ± 1	-	-	-	2.5

Résultats sont exprimés en moyenne ± écart type; AMP : Ampicilline ; CMI: concentration minimale d'inhibition .

L'huile essentielle de *Salvia chudaei* a démontré une action antimicrobienne significative, avec des variations notables entre les différentes souches testées ($p < 0,001$). Elle a réussi à entraver la croissance de cinq souches distinctes : *Sarcina lutea*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* et *Candida tropicalis*, avec des zones d'inhibition respectives de 38,25 mm, 30 mm, 23,33 mm, 20 mm, 16 mm et 8 mm.

Les hydrocarbures monoterpéniques, qui représentent 36,55% de la composition totale, comprenant notamment l'acétate de bornyle et l' α -pinène (24,2%), sont bien connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [178];[179]. En effet, le bornyl acétate extrait des huiles essentielles de diverses espèces a manifesté une forte activité antimicrobienne contre plusieurs souches bactériennes, y compris *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *E. coli*, avec une décroissance séquentielle de l'activité inhibitrice [180].

L'équilibre microbien intestinal a été étudié par Zhang et al., (2017), qui ont constaté que la thérapie au bornyl acétate réduisait significativement les bactéries pathogènes dans l'intestin, notamment *Escherichia*, *Helicobacter*, *Desulfovibrio*, *Ruminococcus*, *Parabacteroides*, *Clostridium*, et rétablissait l'abondance des probiotiques de la famille des Lactobacillaceae [181]. Cette rééquilibration pourrait contribuer à réduire les maladies inflammatoires de l'intestin provoquées par des agents pathogènes. L'analyse en grappes a également suggéré que le traitement au bornyl acétate rétablissait partiellement l'équilibre microbien intestinal

L' α -pinène, qui est également abondant dans les huiles essentielles de nombreuses plantes, y compris celles du genre *Salvia* [182], a démontré un effet inhibiteur sur *S. aureus* et *B. subtilis*, comme rapporté par [183]. De plus, Yang et al. (2015) ont signalé l'effet inhibiteur de l' α -pinène sur diverses espèces bactériennes, notamment *Streptococcus pyogenes* (CMI : 132 $\mu\text{g/ml}$), *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (CMI : 210 $\mu\text{g/ml}$), *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et à la gentamicine (MGRSA) (CMI : 256 $\mu\text{g/ml}$), *Streptococcus pneumoniae* (CMI : 172 $\mu\text{g/ml}$), *Klebsiella pneumoniae* (CMI : 178 $\mu\text{g/ml}$), *Haemophilus influenzae* (CMI : 126 $\mu\text{g/ml}$) et *Escherichia coli* (CMI : 98 $\mu\text{g/ml}$).

Nobrega et *al.*, (2021) ont également noté l'effet inhibiteur de l' α -pinène sur la croissance de *Candida albicans* (CMI : 64–128 μ g/ml), *Candida parapsilosis* (CMI : 64 μ l/ml) et *Candida tropicalis* (CMI : 1.024–64 μ g/ml) [184].

En outre, la présence de caryophyllène (4,21%), de limonène (0,38%) et de germacrène (0,29%) pourrait également contribuer partiellement à l'activité antimicrobienne, même si leurs concentrations sont inférieures. En effet, plusieurs études antérieures ont confirmé les propriétés antimicrobiennes de ces composés [185-189].

Cependant, il convient de noter que cette activité antimicrobienne pourrait être aussi expliquée par le phénomène de synergie entre tous les composants volatils. Selon plusieurs études, les interactions synergiques ou antagonistes entre les différents composés, même en proportions réduites, pourraient jouer un rôle significatif. En effet, ces interactions pourraient donner lieu à une activité antimicrobienne bien plus marquée que celle prévue en se basant uniquement sur les composés majoritaires [190-192].

L'huile essentielle de *Salvia chudaei* semble avoir un effet antimicrobien puissant contre les bactéries Gram+. En revanche, aucun effet n'a été observé sur les bactéries Gram- . Ces résultats concordent avec ceux présentés par Krinat et *al* (2015). Ils ont constaté que l'huile essentielle de *Salvia chudaei* peut avoir un effet inhibiteur sur la croissance de souches Gram+ mais pas sur les souches Gram- [23].

Cependant les travaux de Hammoudi et *al.*, (2015) ont rapporté un effet inhibiteur sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *E coli* avec des diamètres de 16 et 19 respectivement. Ceci peut être expliqué par le fait que leur huile essentielle présente une composition chimique très différente de la nôtre et avec une prédominance de composés sesquiterpéniques oxygénés [119].

Plusieurs études rapportent que les bactéries Gram-négatives semblent être plus résistantes que les bactéries Gram-positives aux huiles essentielles [193]. Cette caractéristique est en partie due à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces micro-organismes, qui contient une double membrane [191],[194]. En fait, les bactéries Gram- ont une membrane qui présente une perméabilité sélective ; la surface des lipopolysaccharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des

molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules de poids moléculaire élevé[195].

Contrairement aux bactéries Gram+, l'absence de cette barrière permet un contact direct entre les constituants hydrophobes de l'huile essentielle et la bicouche de phospholipides de la membrane bactérienne, ce qui leur permet de pénétrer dans cette dernière. Cela peut induire un changement dans la conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique ou une fuite d'ions, libérant ainsi les constituants intracellulaires vitaux [196].

L'extrait éthanolique de *Salvia chudaei* a démontré la capacité d'inhiber la croissance de neuf souches bactériennes, à savoir *Sarcina lutea*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *Citrobacter diversus*. Les zones d'inhibition obtenues étaient de 15 mm, 14,5 mm, 10,33 mm, 10 mm, 9,66 mm et 7,16 mm, respectivement. En revanche, l'extrait aqueux a présenté un effet inhibiteur uniquement sur *S. aureus*, *E. coli* et *Klebsiella pneumonia* avec des zones d'inhibition mesurant 7 mm, 7,66 mm et 6.5 mm respectivement.

Le potentiel antimicrobien des extraits semble découler des diverses catégories de métabolites secondaires qui ont été identifiées lors du screening phytochimique initial. Les espèces *Salvia* sont particulièrement riches en polyphénols, incluant des acides phénoliques et des flavonoïdes [39]. Les flavonoïdes tels que la quercétine, l'apigénine et la lutéoline, ainsi que les acides phénoliques tels que les acides gallique, rosmarinique, chlorogénique et caféique [65], ont été identifiés dans les espèces *Salvia*.

Les propriétés antimicrobiennes des acides phénoliques, des flavonoïdes et des terpénoïdes ont également été rapportés. Cowan (1999) a suggéré que différentes catégories de polyphénols, en particulier les tanins et les flavonoïdes, sont en mesure d'accentuer la toxicité des extraits envers les microorganismes [197]. Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets antimicrobiens des polyphénols. Parmi ceux-ci, on retrouve l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques, la perturbation des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne, ainsi que l'altération du métabolisme énergétique des micro-organismes. À titre d'exemple, les tanins sont

capables d'inhiber les enzymes microbiennes, d'induire une lyse membranaire directe, ou de former des complexes avec des ions métalliques cruciaux pour leur survie, notamment le fer. La toxicité varie en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles dans le composé phénolique [198].

En outre, on a également noté que l'activité antimicrobienne de plusieurs plantes est attribuable à la présence d'anthraquinones [199];[200]. Les saponosides, déjà reconnus comme des agents antimicrobiens par divers auteurs, jouent également un rôle important [201].

En somme, l'efficacité optimale d'un extrait ne repose pas uniquement sur ses composés phénoliques, mais plutôt sur l'interaction combinée (synergie) de divers composés présentant des effets antibactériens [202].

Des études ont rapportés le pouvoir antimicrobien de plusieurs espèces *Salvia*, : les travaux de Tepe et al., (2004) sur les extraits de *S.crypntantha* et *S. multicaulis* et *S.tomentosa* Ils ont noté une activité antimicrobienne importante avec plus d'inhibition sur la croissance de *Candida albicans*, qui présente une zone d'inhibition de 25mm [203],[204].

Alors que les études de Kivrak et al., (2009) sur *S.potentillipholia* de la Turquie, ont montré que l'huile essentielle possédait un pouvoir antimicrobien plus important que l'extrait éthanolique, avec des zones d'inhibition variant de 8 à 40 mm de diamètre [205].

II.2. Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits de *Salvia chudaei* sur quatre souches fongiques a été testée par la méthode de contact direct. Les pourcentages d'inhibition obtenus sont représentés dans les figures suivantes.

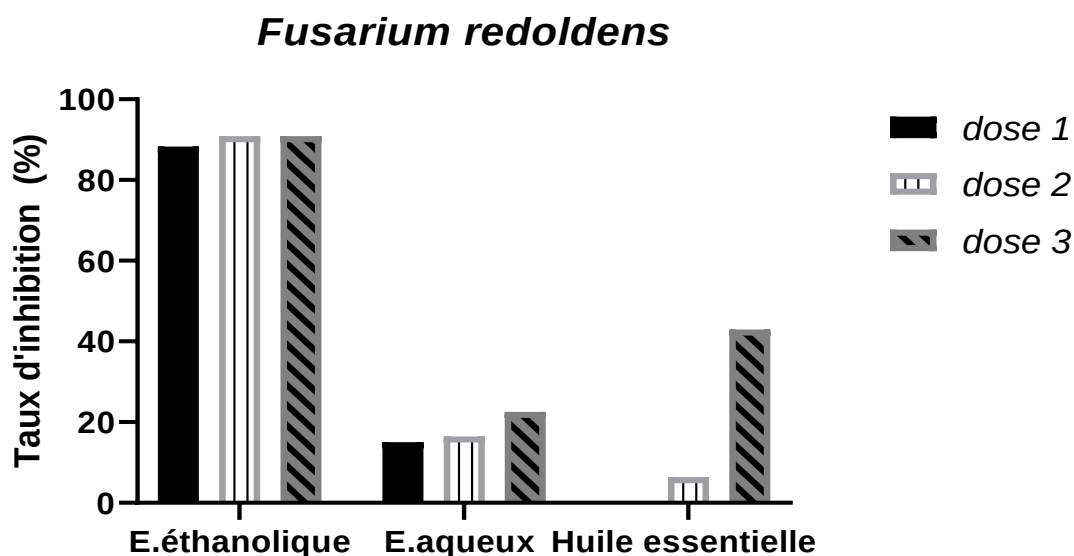


Figure 2.8 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium redolens* sous l'effet des différentes doses des extraits de *Salvia chudaei*

D'après les données présentées dans les figures 2.8, il est observé que la croissance mycélienne de *Fusarium redolens* présente une diminution proportionnelle aux concentrations des extraits utilisés. Des taux d'inhibition très significatifs sont obtenus pour l'extrait éthanolique (88,31%, 90,90%, 90,90%) ainsi que pour l'extrait aqueux (15,06%, 16,43%, 22,53%) à des concentrations de 5 mg/ml, 10 mg/ml et 20 mg/ml respectivement. L'huile essentielle présente un effet inhibiteur modéré sur la croissance de *Fusarium redolens*, avec un taux d'inhibition maximum de 42,85%.

L'extrait éthanolique a démontré une activité notable contre le développement mycélien de *Fusarium solani*, entraînant des taux d'inhibition variant de 61,25% à 90,54%. En comparaison, les extraits aqueux et l'huile essentielle ont manifesté un effet plus modéré, avec des taux d'inhibition respectifs de 17,14% et 21,42%.

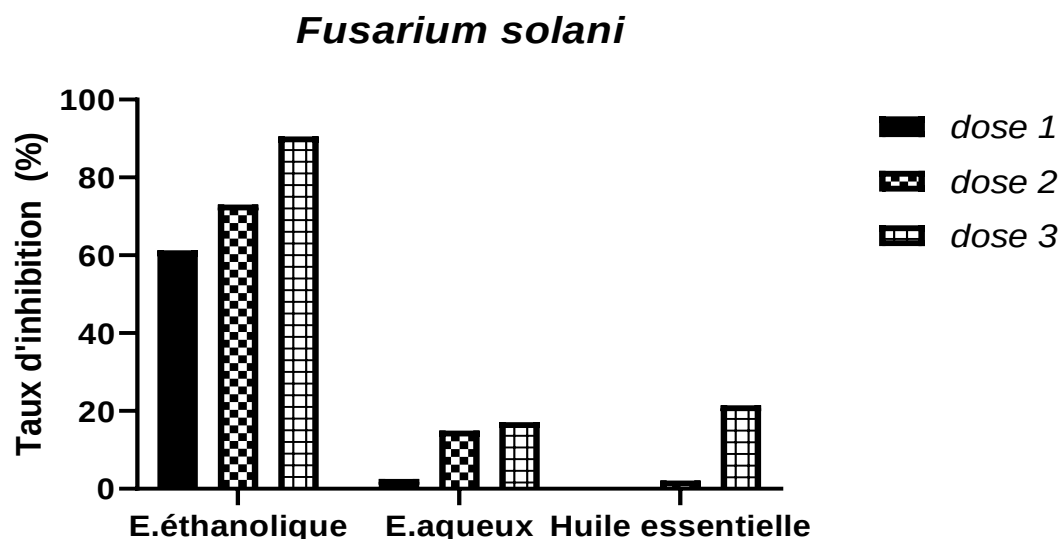


Figure 2.9 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium solani* sous l'effet des différentes doses des extraits de *Salvia chudaei*.

En observant la figure suivante, il devient évident que le taux de développement mycélien de *Fusarium oxysporum* décroît à mesure que les concentrations des extraits augmentent. En effet, l'extrait éthanolique, l'extrait aqueux et l'huile essentielle affichaient des taux d'inhibition de 90%, 54.14% et 39.5% respectivement.

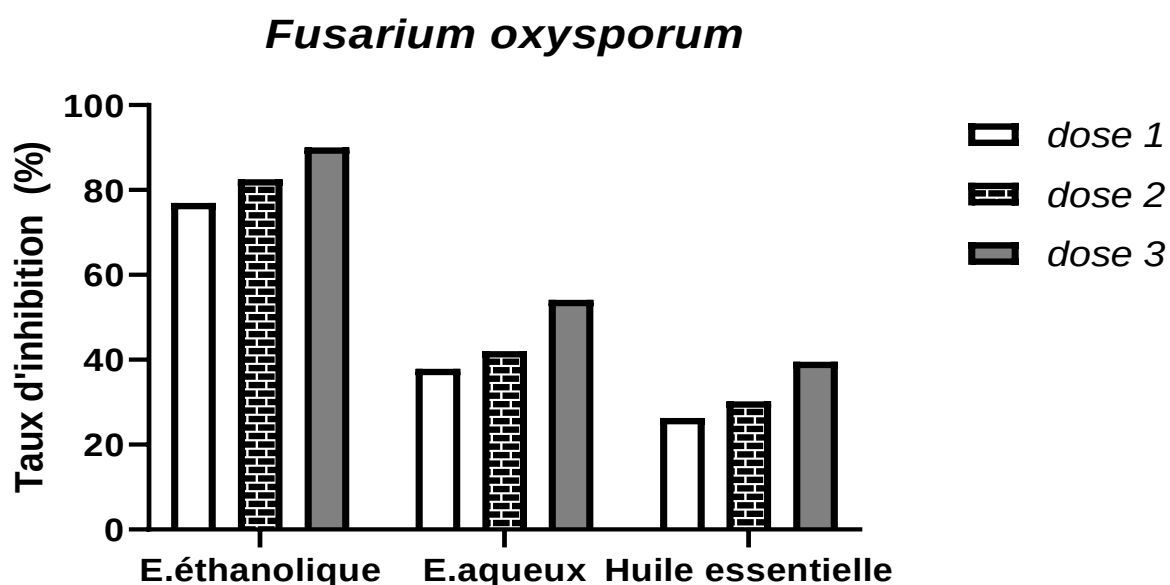


Figure 2.10 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* sous l'effet des différentes doses des extraits de *Salvia chudaei*.

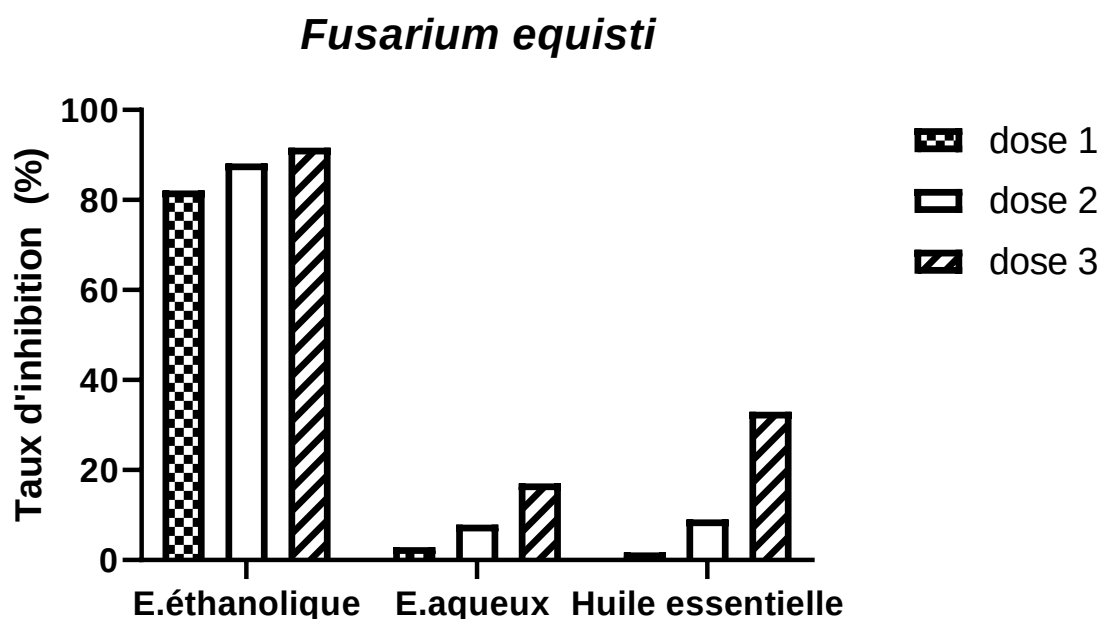


Figure 2.11 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium equiseti* sous l'effet des différentes doses des extraits de *Salvia chudaei*

D'après la figure 2.11, il est apparent que l'extrait éthanolique présente l'effet inhibiteur le plus significatif, avec des taux d'inhibition de 82,14%, 88,09% et 91,66% pour les différentes concentrations utilisées (5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml) respectivement. En revanche, l'huile essentielle et l'extrait aqueux affichent des taux d'inhibition plus modestes, ils sont de 32,94% et 17,07% respectivement.

II.2.1. Evaluation de l'effet fongicide ou fongistatique des extraits

Après avoir évalué l'activité antifongique des extraits, nous avons réalisé un test pour déterminer la nature de cette activité (fongicide ou fongistatique). Les résultats obtenus sont représentés en tableau

Tableau 2.X : Effet fongicide ou fongistatique des extraits.

Souches	Extraits	Nature de l'activité
<i>Fusarium redolens</i>	Aqueux	Fongistatique
	Ethanolique	Fongicide
	HE	Fongicide
<i>Fusarium solani</i>	Aqueux	Fongistatique
	Ethanolique	Fongicide
	HE	Fongicide
<i>Fusarium oxysporum</i>	Aqueux	Fongistatique
	Ethanolique	Fongicide
	HE	Fongicide
<i>Fusarium equiseti</i>	Aqueux	Fongistatique
	Ethanolique	Fongicide
	HE	Fongistatique

L'étude du suivie de la croissance mycélienne des différentes souches fongiques testées (*Fusarium redolens*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium equiseti*) en présence d'extraits éthanoliques, aqueux et l'huile essentielle issus de la partie aérienne de *Salvia chudaei* a révélé une réduction de la croissance mycélienne qui était proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits.

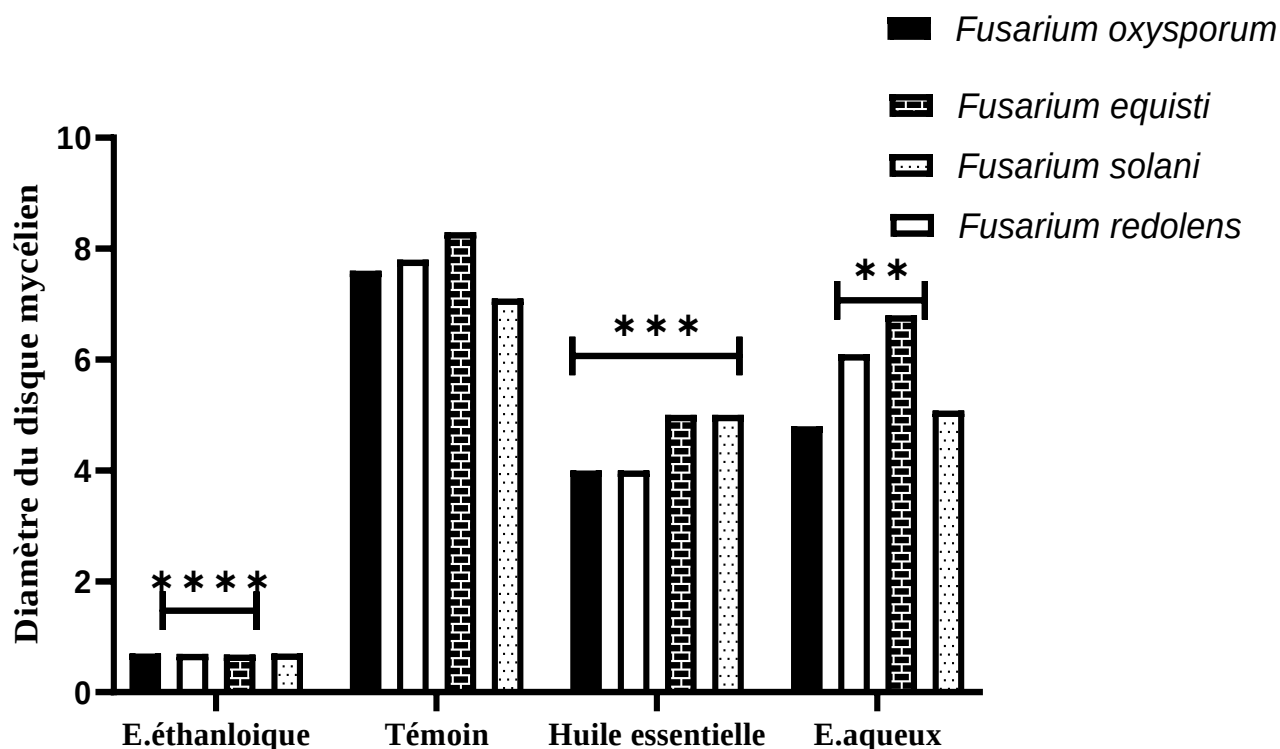


Figure 2.12 : Activité antifongique des extraits sur les souches testés.

Il est important de souligner que, à mesure que la concentration des extraits augmentait, l'inhibition de la croissance mycélienne devenait significativement plus marquée que dans les boîtes témoins. L'analyse statistique (Tukey's multiple comparisons test) a montré une différence hautement significative ($p < 0.0001$) entre la croissance mycélienne dans les boîtes témoins et les boîtes additionnées d'extrait éthanolique et une différence significative ($p < 0.05$) entre les boîtes témoins et les boîtes contenant l'huile essentielle et l'extrait aqueux. Ces résultats démontrent de manière convaincante que la croissance mycélienne et le taux d'inhibition, étaient fortement influencés par l'introduction d'extraits riches en composés actifs dans le milieu de culture. En outre, les extraits testés ont inhibé la croissance des quatre souches fongiques étudiées, avec une sensibilité plus élevée observée chez la souche *Fusarium redolens*. Cette dernière a présenté un taux d'inhibition moyen dépassant les 90%, 40% et 20% pour les extraits éthanoliques, l'huile essentielle et l'extrait aqueux respectivement.

À mesure que la concentration augmentait, des changements morphologiques étaient observés, incluant une augmentation des déformations et une diminution notable de la présence de la matrice cellulaire [206].

Selon Chung (2019), l'activité antifongique des extraits semble être associée à une inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la croissance et la sporulation des champignons filamenteux, tels que les gènes de régulation *abaA* et *wetA*. L'inactivation de ces gènes pourrait induire des anomalies significatives dans la morphologie des conidiophores [207].

Une autre étude qui a été menée sur l'activité antifongique du camphre contre des champignons phytopathogènes courants : *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani*. Elle rapporte que le camphre pouvait causer la destruction de la cytomembrane et libérer des macromolécules intracellulaires, telles que les acides nucléiques et les protéines [185].

II.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs approches disponibles pour évaluer l'activité antioxydante in vitro. Certaines de ces méthodes se basent sur la capacité réductrice d'un composé, considérée comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant, tandis que d'autres se fondent sur la capacité d'une molécule à neutraliser les composés radicalaires [208]. Les méthodes que nous avons employées dans notre étude comprennent la détermination de la capacité antioxydante totale, la méthode de piégeage du radical libre DPPH, la méthode du blanchiment du bêta-carotène, ainsi que la méthode de réduction du fer FRAP.

Tableau 2.XI : Activité antioxydante des extraits de *Salvia chudaei*

	Capacité antioxydante totale ($\mu\text{g/ml}$ équivalent d'acide ascorbique)		Test DPPH (IC50 en $\mu\text{g/ml}$)	FRAP (%)	Test du blanchiment β -carotène (%)
Huile essentielle	15.18 $\pm$ 1.1		932 $\pm$ 0.36	59.96 $\pm$ 1.00	91 $\pm$ 0.50
Extrait aqueux	25 $\mu\text{g/ml}$	20.56 $\pm$ 0.96	2240 $\pm$ 1.12	41.32 $\pm$ 0.98	65.32 $\pm$ 1.01
	50 $\mu\text{g/ml}$	28.12 $\pm$ 1.42			
	100 $\mu\text{g/ml}$	41.86 $\pm$ 1.32			
Extrait ethanolique	25 $\mu\text{g/ml}$	23.52 $\pm$ 0.53	740 $\pm$ 0.95	69.71 $\pm$ 0.75	95.56 $\pm$ 0.85
	50 $\mu\text{g/ml}$	35.96 $\pm$ 1.25			
	100 $\mu\text{g/ml}$	59.68 $\pm$ 0.98			
α-tocopherol	56.19 $\pm$ 0.23		39.4 $\pm$ 0.55	53.45 $\pm$ 0.6	59.86 $\pm$ 0.51
Acide ascorbique			4.01 $\pm$ 0.12	43.21 $\pm$ 0.94	51.58 $\pm$ 0.70

II.3.1 Capacité antioxydante totale

Le transfert des électrons et des hydrogènes du composé antioxydant au complexe molybdène (VI), dépend des différents potentiels redox et de la structure de l'antioxydant. L'habilité de céder un électron ou un hydrogène par des composés tel que : l'acide ascorbique, glutathionne, cystéine, tocophérols, poly phénols et des amines aromatiques, peut être détectée par la méthode de phospho-molybdène [148][58].

Les différents extraits de *Salvia chudaei* ont présenté une importante capacité antioxydante globale, surpassant celle de l'étalon utilisé (α -tocophérol). Cette capacité antioxydante dépend de la dose, comme en témoigne son augmentation proportionnelle à l'augmentation des concentrations pour les deux extraits (l'extrait aqueux et éthanolique). Plus précisément, les valeurs sont de 59.68 ± 0.98 , 41.86 ± 1.32 et 15.18 ± 1.1 $\mu\text{g/ml}$ équivalent d'acide ascorbique pour l'extrait éthanolique, l'extrait aqueux et l'huile essentielle, respectivement.

Il convient de noter que dans une étude antérieure menée par Hammoudi et al. (2015), l'extrait éthanolique de *Salvia chudaei* avait montré une capacité antioxydante totale de 11.62 ± 0.55 $\mu\text{g/ml}$ équivalent d'acide ascorbique, une valeur inférieure à celle que nous avons obtenue.

II.3.2 Test du DPPH

Le test du piégeage des radicaux DPPH est largement utilisé pour évaluer la capacité des composés à agir en tant que piégeurs de radicaux libres ou donneurs d'hydrogène, ainsi que pour évaluer l'activité antioxydante de nombreux extraits végétaux ou composés. Le DPPH est un radical libre stable qui présente une couleur violette profonde avec une absorption maximale à 517 nm. Les molécules antioxydantes réagissent avec le radical libre en donnant de l'hydrogène ou des électrons, ce qui entraîne la décoloration du DPPH en raison de leur conversion en diphenylpicryl hydrazine de couleur jaune [209].

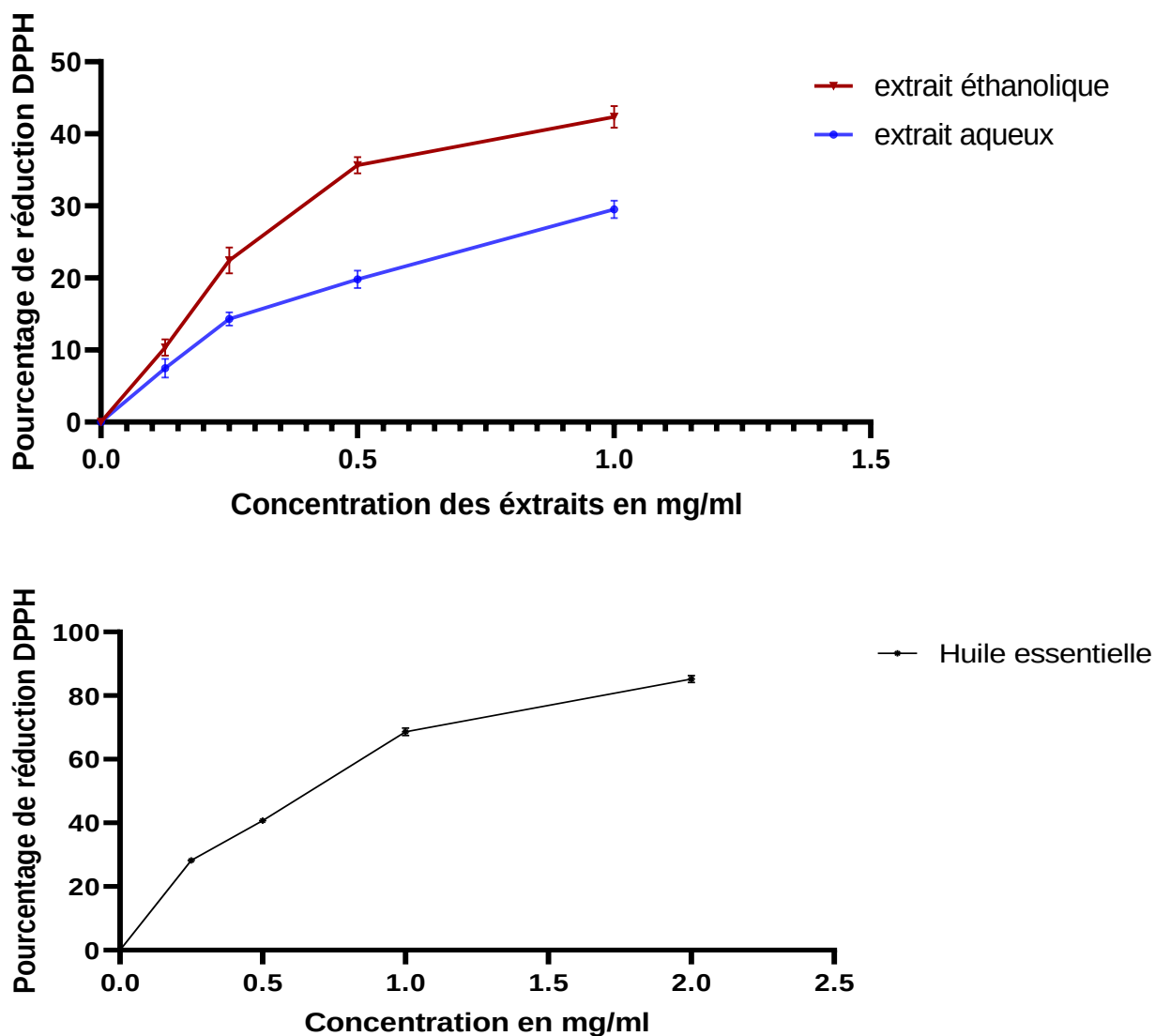


Figure 2.13 : Pourcentages de réduction du DPPH par les différents extraits de *Salvia chudaei*

Selon les données présentées dans la figure 2.13, il est observé que tous les extraits de *Salvia chudaei* démontrent une réduction significative ($p < 0.001$) du taux de radicaux libres DPPH de manière dose-dépendante. En effet, on peut remarquer que plus les concentrations des extraits augmentent, plus le pourcentage de réduction des radicaux DPPH augmente, ce qui souligne une corrélation dose-effet.

Cependant, il est important de noter que malgré cette activité antiradicalaire, les extraits testés présentent une efficacité qui demeure inférieure à celle des standards utilisés comme référence. Les valeurs d'IC₅₀ pour les extraits (tableau 2.XI) sont d'environ 740 ± 0.95 µg/ml pour l'extrait éthanolique, 932 ± 0.36 µg/ml pour l'huile

essentielle, et $2240 \pm 1.12 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux, respectivement. En comparaison, les standards tels que le tocophérol et l'acide ascorbique affichent des IC50 de $39.4 \pm 0.55 \mu\text{g/ml}$ et $4.01 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$, respectivement.

Notamment, une étude antérieure menée par Krimat et al en 2015 [23] rapporte une IC50 de $3250 \mu\text{g/ml}$ pour l'huile essentielle de *Salvia chudaei*. Cette valeur est inférieure à la nôtre, ce qui suggère une activité antiradicalaire plus prononcée que celle de notre échantillon.

En contraste, une autre étude réalisée par Hammoudi et al en 2015 [119] indique des IC50 de $4.22 \pm 0.105 \text{ mg/ml}$ pour l'huile essentielle et $5.33 \pm 0.31 \text{ mg/ml}$ pour l'extrait éthanolique, respectivement. Ces valeurs sont supérieures aux nôtres, suggérant donc un effet antioxydant moins marqué dans leur échantillon. Ces différences pourraient s'expliquer par les variations dans la composition chimique des huiles essentielles obtenues dans les trois études. Même si la composition de l'huile essentielle de Krimat et al (2015) présente certaines similitudes avec la nôtre, les teneurs en composés spécifiques diffèrent. D'autre part, l'étude de Hammoudi et al (2015) révèle un profil chimique totalement distinct, comme mentionné précédemment dans la section sur l'étude phytochimique.

II.3.3. Test du blanchiment du β -carotène

Le β -carotène subit une décoloration rapide en l'absence d'un antioxydant, ce qui entraîne une réduction de l'absorbance de la solution d'essai au fil du temps de réaction. Cela est dû à l'oxydation de l'acide linoléique qui génère des radicaux libres attaquant les molécules fortement insaturées de β -carotène dans le but de récupérer un atome d'hydrogène. Lorsque cette réaction se produit, la molécule de β -carotène perd sa conjugaison et, par conséquent, la couleur orange caractéristique disparaît. La présence d'un antioxydant empêche la destruction du système conjugué du β -carotène, maintenant ainsi la couleur orange [210].

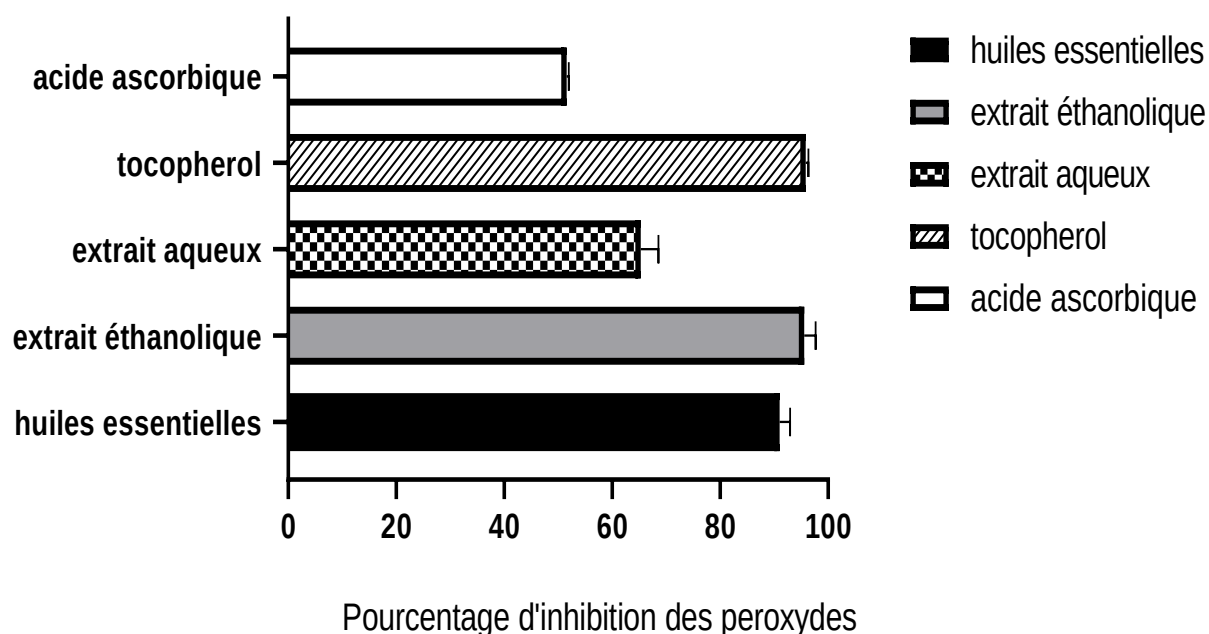


Figure 2.14 : Activité antiperoxydase des extraits de *Salvia chudaei*

Comme le met en évidence la Figure 2.14, tant les extraits que les standards utilisés ont manifesté leur capacité à réduire de manière substantielle le taux de dégradation du β -carotène en neutralisant les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique. Il est à noter que l'extrait éthanolique et l'huile essentielle se sont démarqués avec des taux d'inhibition remarquablement élevés, atteignant respectivement les 95,56 % et 91 %. Ces valeurs sont nettement supérieures ($P < 0,001$) à celles obtenues avec l'extrait aqueux et l'acide ascorbique, bien que l'effet soit similaire à celui de l' α -tocophérol, sans différence significative ($P = 0,56$).

Par ailleurs, il convient de noter que l'extrait aqueux présente également une activité antioxydante modérée, avec un pourcentage d'inhibition de 65,32 %, qui demeure significativement supérieur ($P < 0,005$) à celui de l'acide ascorbique, lequel a montré le taux de réduction des peroxydes le plus faible.

De manière complémentaire, une étude antérieure menée par Krmat et al en 2022 [141] a également observé un taux d'inhibition significatif des peroxydes par l'extrait méthanolique de *Salvia chudaei*, atteignant le 76,58 %. Ces résultats corroborent notre constatation d'une forte activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *Salvia chudaei*.

II.3.4. Test FRAP

L'effet chélateur des extraits de la plante testés est mesuré par la réduction directe de Fe^{3+} en une forme ferreuse $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$ qui est déterminée par détection spectrophotométrique du complexe $(\text{Fe}^{3+})_4 [\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6]_3$ ayant une forte absorption à 700 nm . La couleur du milieu réactionnel passe du jaune au vert selon l'intensité du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié [210].

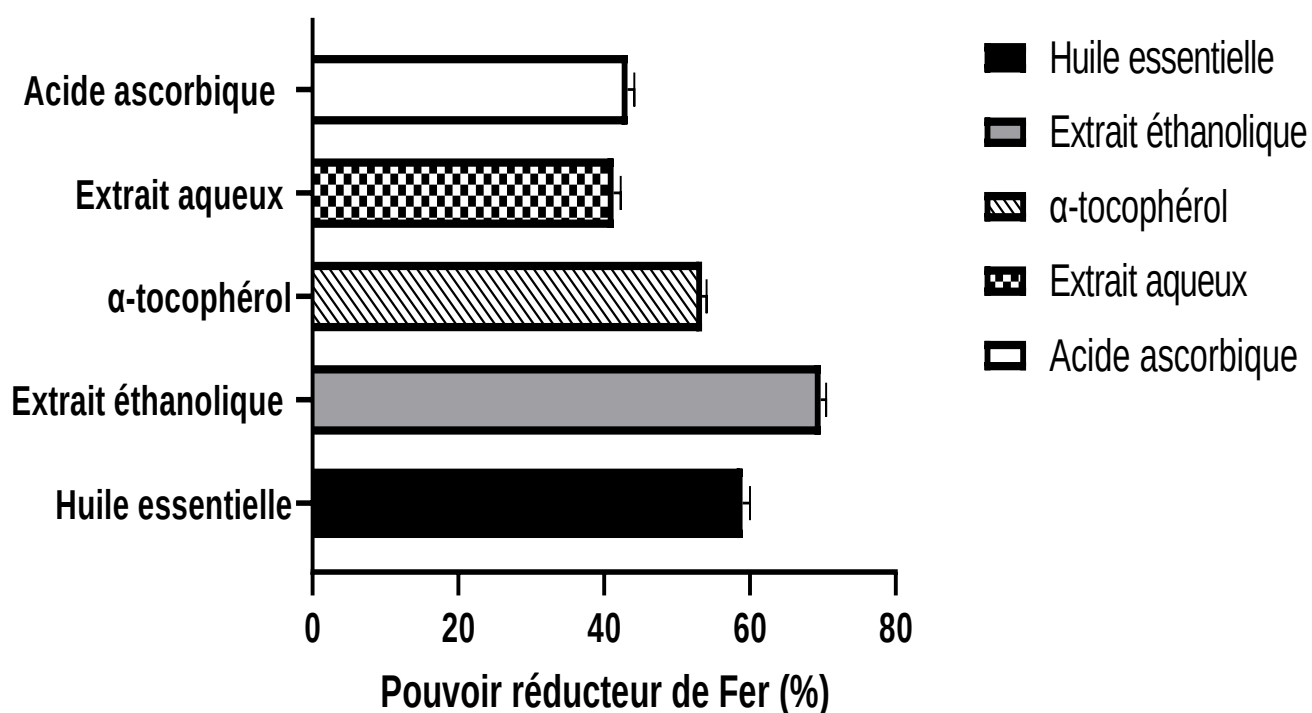


Figure 2.15 : Pouvoir réducteur du fer des différents extraits de *Salvia chudaei* et les standards

Selon les données présentées dans la figure 2.15, il est clair que les extraits de *Salvia chudaei* ont démontré des capacités de réduction des ions Fe^{+3} avec des pourcentages variables. Plus précisément, l'extrait éthanolique s'est avéré être le plus puissant en termes de pouvoir réducteur, atteignant un impressionnant taux de 69,71 %. En comparaison, l'huile essentielle a également montré une capacité significative de réduction, atteignant un pourcentage de 59 %. Ces deux valeurs nettement supérieures ($p < 0,001$) aux résultats obtenus avec les deux standards utilisés, à savoir le tocophérol et l'acide ascorbique, qui ont présenté des taux de 59,45 % et 43,21 % respectivement.

Il convient de souligner que l'extrait aqueux affiche le taux de réduction le plus faible parmi les échantillons testés, avec un pourcentage de 41,32 %. Il est important de noter que ce résultat est similaire ($p=0,63$) à celui obtenu avec l'acide ascorbique. Cette variation significative des capacités de réduction entre les extraits éthanolique, d'huile essentielle, aqueux, et les standards met en évidence l'intérêt potentiel des extraits de *Salvia chudaei* en tant que sources naturelles de composés réducteurs, qui peuvent jouer un rôle important dans divers contextes, notamment en tant qu'antioxydants.

Des recherches approfondies menées au cours des dernières décennies ont permis d'établir la pertinence des réactions redox dans les systèmes biologiques. Ainsi, la consommation constante d'oxygène chez les organismes aérobies conduit à la production de substances chimiques résultant de la réduction partielle de l'oxygène, c'est-à-dire $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et le radical hydroxyle, généralement appelés oxydants. Ces substances peuvent interagir chimiquement avec des cibles biologiques, telles que les protéines, les lipides, les acides nucléiques et les glucides, provoquant leur oxydation et une éventuelle perte de leur fonction biologique. Dans le cas des protéines, leur oxydation réversible peut entraîner des événements redox, y compris la modulation de la signalisation redox [3].

Les défenses antioxydantes non enzymatiques peuvent agir de plusieurs manières :

- en réagissant directement avec les oxydants par le biais de réactions redox, puis en diminuant ou annulant leur réactivité oxydante ;
- en séquestrant directement les ions métalliques de transition impliqués dans la catalyse de la production d'oxydants ;
- en inhibant indirectement la production d'oxydants par leur interaction avec les enzymes productrices d'oxydants.

Le mécanisme d'action des antioxydants est complexe ; ils agissent selon plusieurs mécanismes, ce qui nécessite l'utilisation de nombreuses méthodes différentes pour évaluer leur activité antioxydante [211].

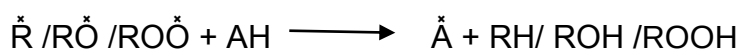
Comme il est bien établi que la capacité de réduction dépend généralement de la présence de composés bioactifs, il est raisonnable de conclure que les extraits riches en phénols présentent une activité antioxydante élevée. En effet, l'extrait éthanolique a manifesté une activité antioxydante plus marquée que l'extrait aqueux, comme en

témoignent les résultats des quatre tests réalisés pour évaluer leur activité antioxydante. De plus, cet extrait éthanolique présente une teneur en composés phénoliques plus élevée ($556,72 \pm 2,56 \mu\text{g EAG/mg}$) par rapport à l'extrait aqueux ($401,11 \pm 1,78 \mu\text{g EAG/mg}$).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERAN) sont des sous-produits des processus redox cellulaires qui génèrent de l'adénosine triphosphate (ATP) pour fournir de l'énergie aux cellules via l'oxygène. Lorsque les ERO et les ERAN sont en déséquilibre dans la cellule, ceci génère un stress oxydatif, qui peut conduire à des maladies chroniques et dégénératives. De nombreux composés polyphénoliques sont connus pour avoir des propriétés antioxydantes. Les polyphénols peuvent lutter contre les ERO de plusieurs manières en tant qu'antioxydants exogènes [212]. Tout d'abord, en raison de la présence de groupes hydroxyle phénoliques sur leurs molécules, les polyphénols peuvent directement piéger les ERO. Le nombre et la position des groupes hydroxyle, ainsi que les motifs de substitution, ainsi que la glycosylation des molécules phytochimiques, affectent tous la capacité des polyphénols à piéger les ERO, de plus de nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité antioxydante. L'activité de ces molécules à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leurs structures, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4'dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3'OH sur le cycle C [213].

Basli et al (2017) ont démontré que les polyphénols peuvent inhiber l'enzyme xanthine oxydase impliquée dans la production d'ions superoxyde ; par conséquent, ils peuvent modifier l'état redox d'une cellule souffrant d'un stress oxydatif [214]. Dans d'autres études, il a été confirmé que le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est déterminé par le nombre et la position des groupes hydroxyle dans un composé phénolique particulier [215].

Les antioxydants phénoliques (AH) peuvent donner des atomes d'hydrogène aux radicaux lipidiques et produire des dérivés lipidiques et des radicaux antioxydants, qui sont plus stables et moins disponibles pour favoriser l'autoxydation [211].



L'effet de la concentration d'antioxydants sur les taux d'autoxydation dépend de nombreux facteurs, notamment la structure de l'antioxydant, les conditions d'oxydation et la nature de l'échantillon soumis à l'oxydation. Souvent, Les antioxydants phénoliques sont plus efficaces pour prolonger la période d'induction lorsqu'ils sont ajoutés au début. Cependant, ils sont inefficaces pour retarder la décomposition de lipides déjà détériorés [216].

L'huile essentielles de *Salvia chudaei* a exhibé un important pouvoir réducteur des peroxydes de 91%, une EC50 de 932 µg/ml par le test DPPH, un pouvoir réducteur de fer modéré (59,96%) et une capacité antioxydante totale de 15.18 µg/ml équivalent d'acide ascorbique. Cet effet antioxydant remarquable évalué par les quatre tests précédemment illustré, peut être attribué aux composés majoritaires de cette huile essentielle : bornyl acétate (%), α-pinène (%), élemol (%)et le caryophyllène (%)

Bouzenna et al. ont montré que l'α-pinène avait un potentiel effet antioxydant dans les cellules IEC-6 évaluées avec le test DPPH avec une EC50 : 310 ± 10 µg/ml, et le test FRAP avec une EC50 : 238 ± 18,92 µg/ml), respectivement [217].

II.4.Toxicité aigue

L'évaluation de la toxicité aiguë des divers extraits de *Salvia chudaei* a été réalisée au moyen d'un test d'innocuité visant à administrer des doses croissantes de ces extraits aux animaux et à observer tout signe de mortalité ou de changement de comportement au cours de la période de quinze jours du test. Il est important de noter qu'aucun décès n'a été observé dans l'ensemble des groupes testés tout au long de la période du test, même après l'administration des doses.

De plus, aucun changement notable dans le comportement des animaux n'a été signalé pour tous les extraits testés, qu'il s'agisse de l'extrait éthanolique, de l'extrait aqueux ou de l'huile essentielle. Ces résultats indiquent que les extraits de *Salvia chudaei* utilisés dans l'étude ne présentent pas de toxicité aiguë aux doses testées, qu'ils n'ont pas eu d'effet néfaste sur le comportement des animaux soumis au test et que leurs DL50 est supérieur à la dose de 5 g/kg.

Ainsi, ces extraits suggèrent qu'ils pourraient être considérés comme sûrs pour une utilisation potentielle, du moins à court terme. Cependant, il est important de

souligner qu'en raison de l'absence de données bibliographiques sur la toxicité de *Salvia chudaei*, il peut être nécessaire de mener d'autres études de toxicité à plus long terme et des évaluations de sécurité plus approfondies avant de parvenir à une conclusion définitive concernant leur innocuité.

L'Agence européenne des médicaments a récemment publié des rapports d'évaluation sur *Salvia officinalis* et *Salvia fruticosa* avec un aperçu des données toxicologiques disponibles. Ces rapports indiquent que l'utilisation de la sauge officinale aux doses recommandées est considérée comme sûre. Cependant, les informations actuelles concernant la sécurité et la toxicité de *S. fruticosa* restent limitées. Pour ce qui est de la dose létale médiane (DL50) aiguë de l'huile de sauge, elle est de 2,6 g/kg chez les rats lorsque administrée par voie orale. Cela s'explique par la présence de la thuyone, une substance réputée pour sa neurotoxicité à des concentrations élevées [218]. Il est important de noter que la thuyone n'est pas présente dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia chudaei*.

Dans un contexte différent, bien que les informations toxicologiques sur certaines espèces *Salvia*, issues d'études sur les animaux et d'essais contrôlés chez l'homme, soient encore limitées, leurs antécédents d'utilisation à des fins alimentaires dans d'autres pays peuvent être considérés comme une preuve favorable de leur sécurité. C'est le cas, par exemple, de *S. miltiorrhiza*, une plante chinoise traditionnelle bien connue qui n'a pas été associée à des effets indésirables graves. Les DL50 de plusieurs extraits de cette plante étaient supérieures à 2,5 g/kg dans des modèles animaux [218]. Par conséquent, ces considérations générales devraient être prises en compte lors de l'évaluation de la sécurité des nouveaux extraits bioactifs issus de ces plantes et d'autres espèces de *Salvia*.

II.5. Activité analgésique et anti-inflammatoire

L'activité antispasmodique des différents extraits de *salvia chudaei* a été évaluée par le test de contorsion induite par l'acide acétique. Ce test, après l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique, une augmentation du nombre de neutrophiles polymorphonucléaires dans le liquide péritonéal a été détectée. Cela peut entraîner la libération de plusieurs médiateurs inflammatoires, conduisant à la douleur inflammatoire sur le site de l'inflammation par la stimulation des neurones nociceptifs.

L'acide acétique active directement les nocicepteurs viscéraux et somatiques, en tant que modèle nociceptif général (non sélectif). Il s'agit d'un test sensible pour évaluer l'action analgésique périphérique des médicaments [219] ; [220].

L'effet analgésique des extraits a été déterminé en mesurant le nombre de torsions abdominales induites par l'injection intra-péritonéale (IP) de l'acide acétique pendant 30 min après l'injection. Le nombre de contractions exprimé en moyenne $\pm$ écart type de chaque groupe est représenté en figure 2.14.

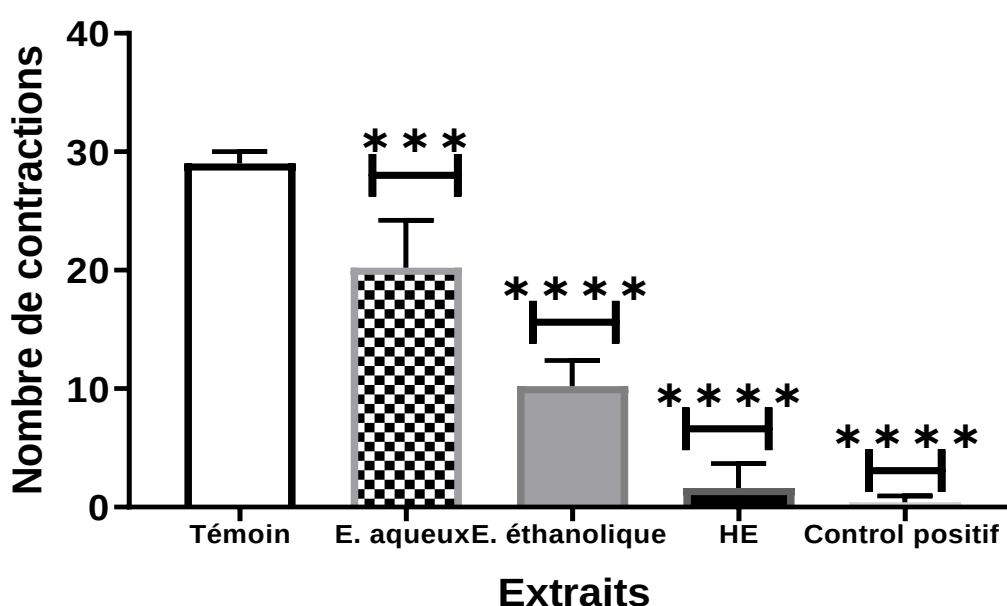


Figure 2.16 : Réduction du nombre des contractions entre le lot témoin et les lots traités

Tous les extraits testés ont considérablement réduit le nombre de contractions par rapport au groupe témoin non traité. En effet, l'huile essentielle a réussi à réduire le nombre de contractions de manière significative ($p < 0.001$), passant de $29 \pm 0,89$ contractions à seulement $1,6 \pm 1,85$ contractions. Il est intéressant de noter que ce taux de réduction est très proche de celui obtenu avec le paracétamol, qui est de $0,2 \pm 0,4$ contractions.

De plus, les extraits éthanolique et aqueux ont également démontré leur efficacité en réduisant le nombre de contractions à des niveaux significatifs. L'extrait

éthanolique a réussi à diminuer le nombre de contractions jusqu'à $10,2 \pm 1,9$, tandis que l'extrait aqueux a atteint une réduction notable avec $20,2 \pm 3,6$ contractions. Ces observations confirment que les différents extraits testés possèdent un effet analgésique remarquable.

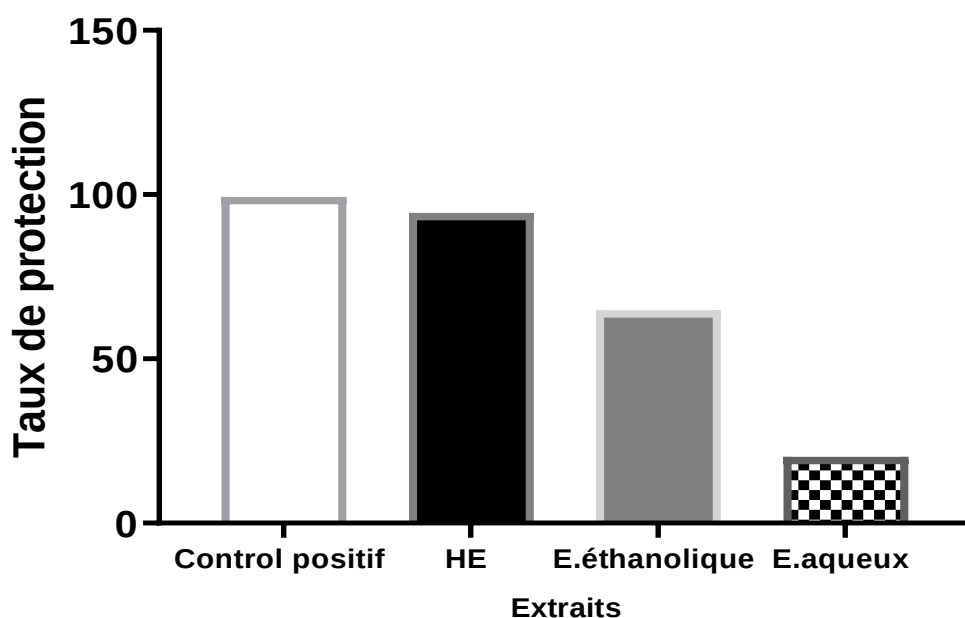


Figure 2.17 : Taux de protection des différents extraits testés

En effet, ces extraits ont démontré des pourcentages de protection remarquables (figure 2.17). L'huile essentielle a affiché un taux de protection de 94,48%, l'extrait éthanolique a atteint 64,82%, et l'extrait aqueux a montré un pourcentage de protection de 20,34%.

L'analyse statistique, qui comparait l'effet protecteur du traitement standard (le paracétamol) avec les différents extraits de *Salvia chudaei*, a révélé l'absence de différence significative ($p=0,72$) entre l'effet protecteur du paracétamol (99,31%) et celui de l'huile essentielle (94,48%). En d'autres termes, l'huile essentielle a montré une efficacité de protection similaire à celle du paracétamol, ce qui est un résultat prometteur.

Concernant l'étude de l'activité anti-inflammatoire, l'expérience a été menée en utilisant un modèle d'œdème aigu à la patte de la souris provoqué par l'administration de carragénine. Cette substance déclenche la libération de médiateurs responsables

du processus inflammatoire. L'œdème provoqué par cette substance est considéré comme un indicateur caractéristique de l'inflammation. Il est considéré comme un paramètre essentiel pour évaluer l'efficacité anti-inflammatoire de divers extraits. Cette méthode a été choisie en raison de sa simplicité d'exécution et de la rapidité avec laquelle elle induit l'œdème.

La Figure 2.18 illustre la variation du volume de l'œdème provoqué par la carragénine en l'absence et en présence de différents traitements

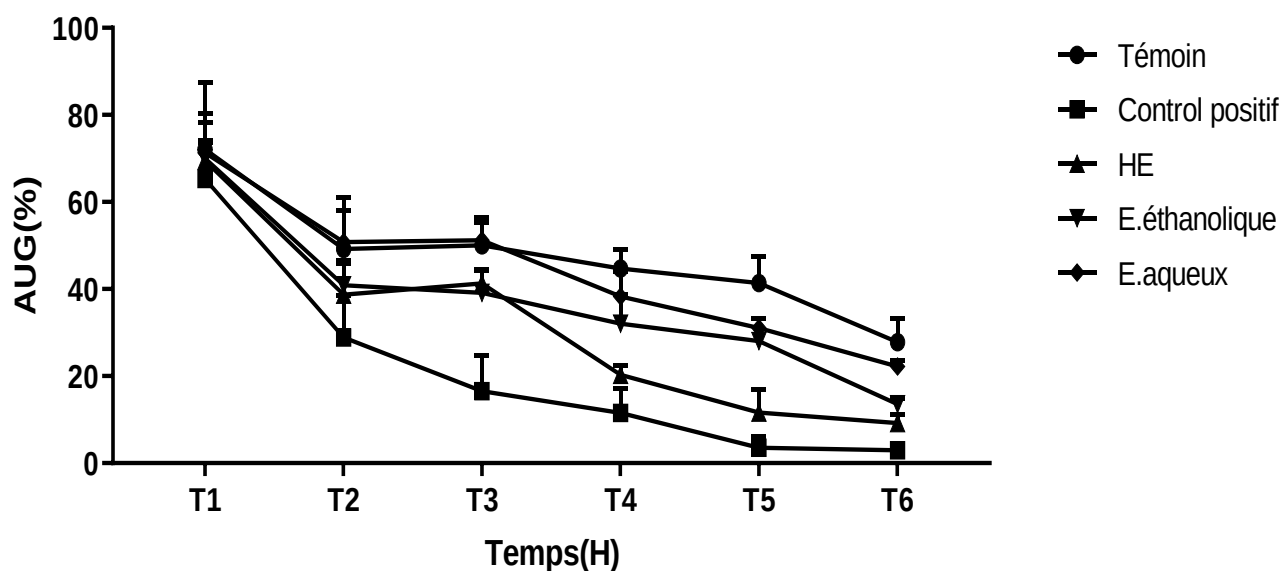


Figure 2.18 : Activité antiinflammatoire des extraits de *Salvia chudaei*.

Lorsque de la carragénine est injectée dans la face plantaire des pattes de souris, une augmentation du volume des pattes est observée dans tous les groupes. Après deux heures, on note une diminution significative du volume de l'œdème. Toutefois, cette diminution demeure stable jusqu'à la troisième heure dans les groupes témoins, ainsi que dans les groupes traités avec l'huile essentielle et les extraits éthanoliques et aqueux. En contraste, dans le groupe standard, la réduction du volume de l'œdème se poursuit progressivement jusqu'à la dernière heure.

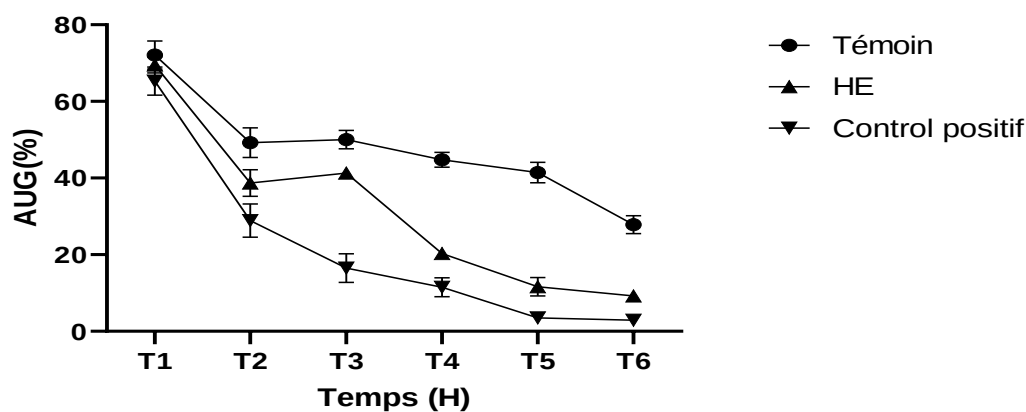
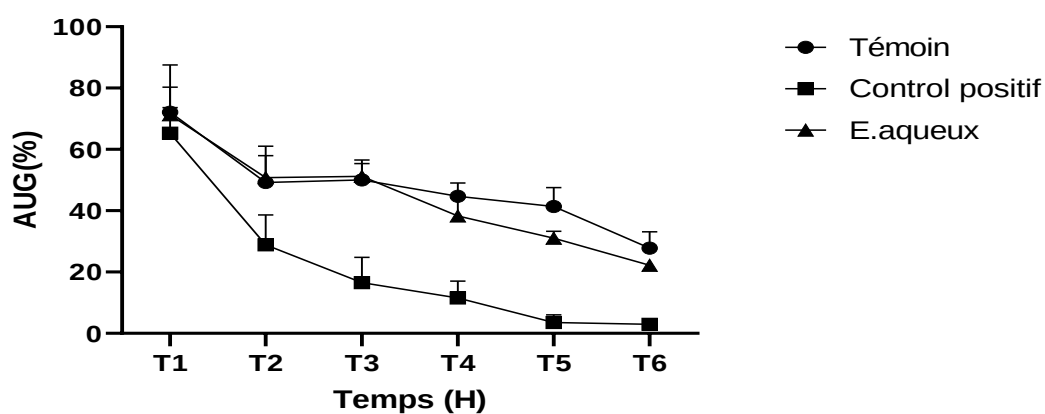
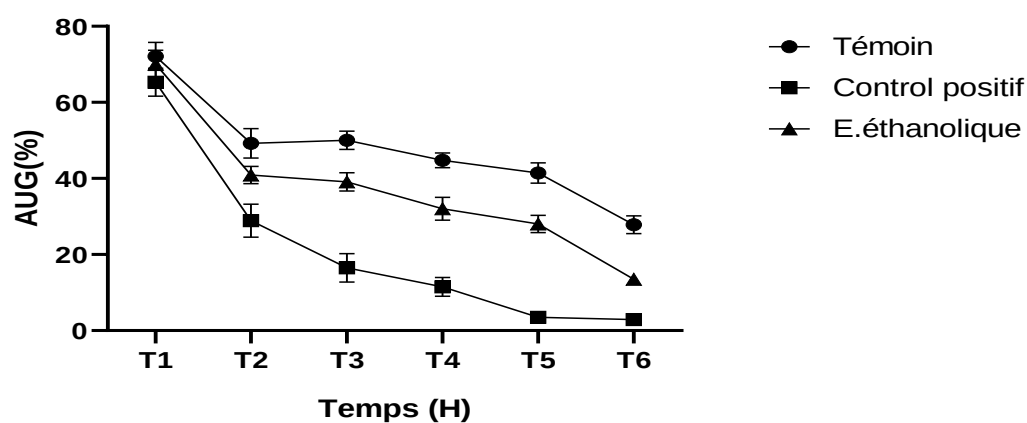
Activité antinflammatoire de l'huile essentielle**A****Activité antinflammatoire de l'extrait aqueux****B****Activité antinflammatoire de l'extrait éthanolique****C**

Figure 2.19 : Evolution de l'œdème chez le lot témoin et les lots traités par les différents extraits et le Diclofénac (50 mg/kg) : (A) chez le lot traité par l'huile essentielle ;(B) chez le lot traité par l'extrait aqueux; (C) chez le lot traité par l'extrait éthanolique

Il est à noter qu'après la troisième heure, une réduction substantielle du volume de l'œdème est spécifiquement observée dans le groupe traité avec l'huile essentielle.

Toutefois, au bout de six heures, on observe une diminution significative du volume dans les groupes traités avec de l'huile essentielle ($p=0.013$), de l'extrait éthanolique ($p=0.0026$), et du diclofénac ($p=0.0025$), par rapport au groupe témoin. Plus précisément, l'huile essentielle réduit le volume de l'œdème à 9.23 ± 2.10 , l'extrait éthanolique provoque une diminution de 13.50 ± 1.38 , tandis que le Diclofénac (standard) montre une réduction de 2.93 ± 0.85 .

En revanche, l'extrait aqueux présente une réduction du volume de l'œdème de 22.2 ± 1.38 , qui ne présente pas de différence significative ($p=0.14$) par rapport au groupe témoin. Cette observation suggère que l'huile essentielle, l'extrait éthanolique et le diclofénac ont des effets significatifs dans la réduction de l'œdème, tandis que l'extrait aqueux n'a pas montré une efficacité notable à cet égard.

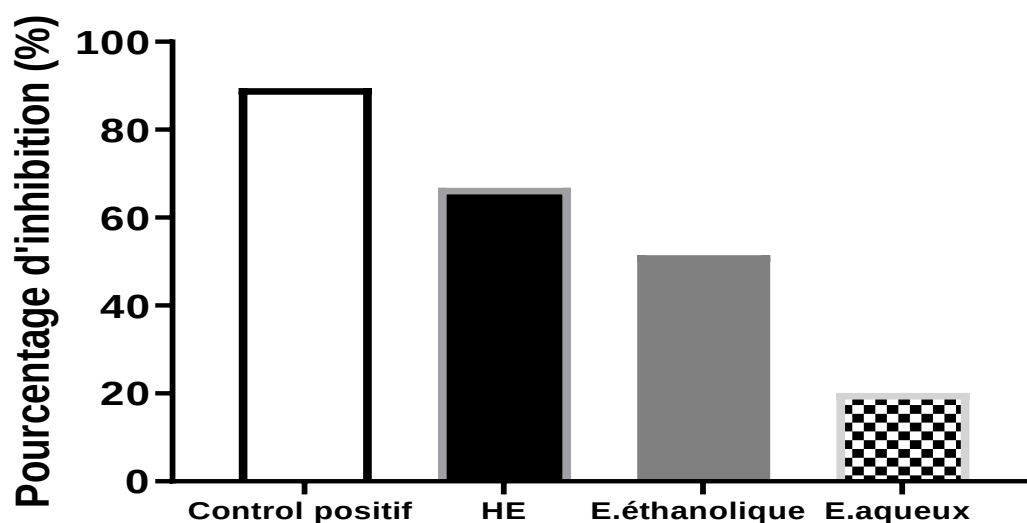


Figure 2.20 : Pourcentage d'inhibition de l'inflammation INH% des différents extraits.

Après une durée de six heures de l'évolution de l'œdème provoqué, nous avons procédé au calcul des pourcentages d'inhibition de l'inflammation pour les différents groupes de traitement, à savoir l'huile essentielle, l'extrait éthanolique, l'extrait aqueux et le Diclofénac. Les résultats obtenus ont été représentés en figure 2.19.

Il est important de noter que l'huile essentielle, l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux ont tous montré une capacité à réduire l'inflammation, bien que leurs

pourcentages d'inhibition aient varié. En particulier, l'huile essentielle a présenté un effet anti-inflammatoire impressionnant, affichant un taux d'inhibition de 66,79 %. En revanche, l'extrait éthanolique a montré un pourcentage d'inhibition de 51,43 %, tandis que l'extrait aqueux a donné le taux le plus bas, avec seulement 20,14 % d'inhibition.

Il est intéressant de noter que tous ces pourcentages demeurent inférieurs à celui du médicament standard, le Diclofénac, qui a atteint un pourcentage d'inhibition de l'inflammation de 89,46 %. Cette différence est cohérente avec le fait que nos extraits sont des préparations brutes, contrairement au Diclofénac, qui est une molécule purifiée.

L'impressionnante propriété analgésique et anti-inflammatoire de l'huile essentielle peut être attribuée principalement à la présence de l'acétate de bornyl et de l'alpha-pinène en tant que composants prédominants de cette huile essentielle selon la littérature. En effet, ces deux constituants affichent des concentrations de 34,09 % pour l'acétate de bornyl et de 24,22 % pour l'alpha-pinène.

Le système immunitaire humain se caractérise par la présence à la fois de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, qui sont étroitement équilibrées pour réguler la réponse inflammatoire ; Les premières, comprenant des cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , favorisent la cascade inflammatoire, tandis que les secondes, notamment l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-11, agissent pour inhiber ce processus en régulant la réponse des cytokines pro-inflammatoires [221]. Le déséquilibre de la balance des cytokines pro-inflammatoire et anti-inflammatoire représente l'un des aspects clé d'inflammation. Lorsque des facteurs inflammatoires sont présents, à l'exemple du LPS et la flagéline, ils stimulent l'activation des TLR qui représentent les récepteurs de la réponse immunitaire innée. Cette activation a pour conséquence l'induction du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) qui entraîne une augmentation de l'expression du TNF- α et de l'IL-1 β , ce qui peut déclencher un stress oxydatif qui perturbe la fonction cellulaire normale et provoque des dommages cellulaires et la douleur [222].

Il a été démontré que l'acétate de bornyl (BA) a des effets anti-inflammatoires dans divers modèles. Yang et *al.*, (2014) ont montré que le BA présente une activité anti-inflammatoire dans les chondrocytes humains induits par l'IL-1 β en régulant à la

hausse l'expression de l'IL-11 via l'activation de l'activité transcriptionnelle du c-Fos, qui est un composant d'AP-1[223].

Chen et *al.*, (2014) ont évalué les effets anti-inflammatoires du l'acétate de bornyl (AB) sur un modèle murin, ils ont constaté que le prétraitement et le post-traitement par le AB réduisaient de manière significative les niveaux de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 de manière concentration-dépendante [224]. De manière similaire, Zhang et *al.*, (2017) ont démontré que le BA réduisait les niveaux d'IL-6 et de TNF- α dans un modèle de mucosité intestinale induit par la 5-fluorouracile [181].

La bibliographie rapporte divers études sur l'effet anti-inflammatoire gratifiant de l'acétate de bornyl (AB). Cela signifie que ce dernier joue un rôle dans les maladies dominées par l'inflammation, notamment, mais sans s'y limiter, la pneumonie, l'entérite, l'ostéoarthrite, l'athérosclérose et la neuroinflammation. Compte tenu de l'affinité élevée de l'acétate de bornyl pour la COX-2 démontrée par une expérience de docking moléculaire [225], il est probable que l'acétate de bornyl produise des effets anti-inflammatoires et analgésiques similaires à ceux des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). En tant que médicaments anti-inflammatoires classiques, les effets secondaires des AINS se manifestent principalement au niveau du système gastro-intestinal et cardiovasculaire [95] ;[226].

En plus des preuves de l'effet anti-inflammatoire de l'acétate de bornyle, notamment l'inhibition des voies NF- κ B et MAPK, l'AB a également un effet protecteur sur l'intestin en améliorant l'expression des protéines de jonction serrée et l'abondance de probiotiques intestinaux [181], régulant ainsi la fonction de l'épithélium intestinal [227] et réduisant l'inflammation [228].

Une étude de Rahbar et *al.* (2019) a examiné l'effet de l' α -pinène administré directement dans le cerveau sur la douleur dentaire induite par la capsaïcine chez des rats. Différentes doses d' α -pinène ont été injectées, et les résultats ont montré une réduction de la douleur aux doses de 0,2 et 0,4 μ mol/L.[229].

Him et *al.*, (2008) ont également mené une étude sur les effets antinociceptifs de l' α -pinène, du limonène, du fénone et d'autres composés monoterpéniques chez les souris BALB/C. L' α -pinène a été administré par voie intrapéritonéale à des doses de 0,05, 0,1 et 0,2 mg/kg de poids corporel, et la réponse à la nociception

comportementale a été évaluée à l'aide du test du retrait de la queue. Les résultats ont indiqué que l' α -pinène augmentait le délai dans le test du retrait de la queue, démontrant ainsi son effet antinociceptif. De plus, il a été constaté que l' α -pinène avait des effets antinociceptifs plus puissants que les autres monoterpènes [230].

Une étude menée par Bae et *al.*, (2011) a montré aussi que le prétraitement à l' α -pinène réduisait la production de facteur de nécrose tumorale (TNF- α), d'interleukine (IL)-1 et d'IL-6 pancréatiques chez des rats atteints de pancréatite aiguë induite par la céruléine [231].

Kim et *al.*, (2015) ont testé l' α -pinène dans des macrophages péritonéaux de souris induits par LPS. Les auteurs ont rapporté que le traitement avait inhibé les kinases activées par les mitogènes (MAPKs) et la voie NF- κ B, ce qui indique deux mécanismes possibles de cette molécule. De plus, les auteurs ont signalé une diminution significative de la production d'IL-6, de TNF- α , d'oxyde nitrique et une inhibition des enzymes iNOS et COX-2 [232].

En outre, l' α -pinène présente des activités anti-inflammatoires dans divers types de cellules, tels que les mastocytes péritonéaux de rat, les mastocytes humains et les chondrocytes [233].

Les extraits éthanoliques et aqueux de *Salvia chudaei* ont démontré une certaine capacité à soulager la douleur et diminuer l'inflammation, bien que leur efficacité se soit révélée inférieure à celle de l'huile essentielle et des standards utilisés. Plus précisément, l'extrait éthanolique a affiché un taux de protection de 64,82 %, et un pourcentage d'inhibition de l'inflammation de 51,79% indiquant un niveau d'efficacité plus élevé que celui de l'extrait aqueux, qui a montré un taux de protection et d'inhibition de seulement 20,34 % et 20,14% respectivement . En d'autres termes, l'extrait éthanolique a été plus efficace pour réduire la douleur et l'inflammation par rapport à l'extrait aqueux, bien que les deux extraits aient été moins efficaces que l'huile essentielle.

Cet effet observé peut être attribué aux composés phénoliques, notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes, présents dans les extraits de *Salvia chudaei*. Cela est appuyé par le fait que l'extrait éthanolique contenait des teneurs plus élevées en polyphénols totaux (TPC) de 765.85 ± 1.20 mg d'équivalent d'acide gallique par

gramme d'extrait, ainsi que des teneurs en flavonoïdes (TFC) de 84.32 ± 1.98 mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait. En comparaison, l'extrait aqueux avait des teneurs en TPC moins élevées, soit $401,11 \pm 1,78$ mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait, et des teneurs en TFC moins importantes, soit $36,60 \pm 2,32$ mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait, respectivement. Ces composés phénoliques peuvent jouer un rôle dans les propriétés analgésiques des extraits, avec l'extrait éthanolique affichant une activité analgésique potentiellement renforcée en raison de ses niveaux plus élevés de ces composés.

Boonyarikpunchai et *al.*, (2014) rapportent que les dérivés d'acide hydroxy cinnamique peuvent atténuer à la fois la douleur centrale et périphérique, ils peuvent réduire la libération de médiateurs inflammatoires ou bloquer directement les récepteurs opioïdes [234].

De plus, l'administration orale de ces dérivés d'acide hydroxy cinnamique produit une inhibition significative de la réponse nociceptive dose-dépendante dans le test de la nociception induite par le glutamate chez la souris, avec une diminution importante des marqueurs inflammatoires et oxydatifs tel que le COX-2, PGE-2, NO et IL-1 β [235, 236].

D'après l'étude de De Melo et *al.*, (2009), il a été mis en évidence que les flavonoïdes, tels que les glycosides de kaempférol, peuvent également posséder des propriétés analgésiques. Leur administration par voie orale a produit des effets notables à la fois dans le soulagement de la douleur et dans la réduction de l'inflammation chez la souris [237].

CONCLUSION

Ce travail a porté sur deux volets distincts. Le premier volet a été consacré à la caractérisation chimique des différents extraits obtenus à partir des parties aériennes de *Salvia chudaei*. Le deuxième volet s'est focalisé sur l'évaluation des activités biologiques de ces extraits, notamment leur potentiel antibactérien, antifongique, antioxydant, analgésique et anti-inflammatoire, ainsi que la détermination de leur DL50.

L'analyse phytochimique de la plante a permis de détecter qualitativement la présence de divers composés tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins catéchiques, les anthocyanes, les coumarines, les hétérosides et les saponosides.

Les dosages teneurs de *Salvia chudaei* (extrait éthanolique et aqueux respectivement) en polyphénols totaux (765.85 ± 1.20 , 401.11 ± 1.78 μg équivalent d'acide gallique /mg d'extrait), de flavonoïdes (84.32 ± 1.98 , 36.60 ± 2.32 μg équivalent de quercétine/mg d'extrait) et de tanins (16.15 ± 3.9 , 9.21 ± 1.94 μg d'acide tanique/ mg d'extrait) démontrent la richesse de cette plante en polyphénols et son fort potentiel antioxydant.

L'analyse effectuée pour la première fois par HPLC-UV/VIS de l'extrait éthanolique, a permis de constater la présence d'acide dihydroxy caféique (4.65 mg/g d'extrait), tert-butyl hydroquinone (1.74 mg/g d'extrait), acide caféique (1.591 mg/g d'extrait) et acide chlorogénique (1.08 mg/g d'extrait). Pour l'extrait aqueux, l'analyse a révélé la présence d'acide hydrocinnamique (5.69 mg/g d'extrait), acide dihydroxy caféique (4.578 mg/g d'extrait), acide trans cinnamique (2.97 mg/g d'extrait), tert-butyl hydroquinone (1.59 mg/g d'extrait) et acide férulique (1.02 mg/g d'extrait) .

Par ailleurs, l'analyse de l'huile par CG/MS a identifié au total 26 composés, principalement des monoterpènes, parmi lesquels le bornyl acétate (34.09%), l'alpha-pinène (24.22%), élemol (8.36%), trans-caryophyllène (4.21%) et le valencène (3.78%) prédominent.

En matière d'activité antimicrobienne, les extraits de *Salvia chudaei*, comprenant l'huile essentielle, l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux, ont démontré leur capacité à freiner la croissance de différentes souches microbiennes. Les bactéries Gram+ ont affiché une sensibilité accrue par rapport aux bactéries Gram–, avec une sensibilité particulièrement marquée de la souche *Sarcina lutea* à l'huile essentielle, illustrée par un diamètre de zone d'inhibition de $38,25 \pm 1,52$ mm.

En ce qui concerne l'activité antifongique l'extrait éthanolique a présenté l'effet antifongique le plus prononcé, atteignant une inhibition dépassant les 90% pour l'ensemble des souches fongiques testée.

L'évaluation du potentiel antioxydant des extraits, à travers diverses méthodes telles que la capacité antioxydante totale, le test du piégeage du radical libre DPPH, le test du blanchiment de la β -carotène et la méthode FRAP, a révélé leur capacité à neutraliser les radicaux libres et à prévenir les dommages oxydatifs.

Les tests d'innocuité ont indiqué l'absence de toxicité pour l'ensemble des extraits testés, avec une DL50 supérieure à 5g/Kg.

En ce qui concerne l'effet analgésique, l'huile essentielle de *Salvia chudaei* a présenté le taux de protection le plus élevé (94,48%), suivi de l'extrait éthanolique (64,82%) et de l'extrait aqueux (20,34%).

Enfin, les extraits de *Salvia chudaei* ont également montré une capacité à réduire l'inflammation, avec des pourcentages d'inhibition de 66,79%, 51,43% et 20,14% respectivement pour l'huile essentielle, l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux.

En conclusion, cette étude ouvre des perspectives prometteuses pour l'exploitation de *Salvia chudaei* en raison de ses propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, analgésiques, et anti-inflammatoires. Pour une analyse plus approfondie, l'utilisation de techniques plus avancées telles que la LC/MS et HPLC/ESI-MS pourrait permettre l'identification et la quantification plus précises des composés présents dans la plante. Une approche plus approfondie consisterait à explorer le docking moléculaire, qui permettrait de mieux comprendre les interactions moléculaires spécifiques entre les composés identifiés dans *Salvia chudaei* et les protéines cibles ou enzymes associées à ces activités pharmacologiques.

De plus, l'intégration de ces avancées dans le domaine de la micropropagation offrira des perspectives encore plus vastes. En procédant avec des techniques de culture *in vitro* efficaces, il devient possible de multiplier *Salvia chudaei* à grande échelle, ce qui non seulement faciliterait son accès, mais également permettrait une utilisation plus large dans divers secteurs tels que la phytothérapie, cosmétique ou l'industrie alimentaire. Ainsi, cette convergence entre la recherche analytique avancée et les techniques de culture innovantes pourrait ouvrir la voie à une exploitation plus efficiente et durable de cette plante.

RECOMMANDATIONS

Voici quelques recommandations pour poursuivre et approfondir ce travail :

- Optimisation des méthodes d'extraction : Tester différentes méthodes d'extraction (ultrasons, micro-ondes, extraction assistée par enzymes) pour maximiser le rendement des composés bioactifs, en particulier les polyphénols et monoterpènes.
- Identification approfondie des composés bioactifs : Compléter les analyses avec des techniques plus avancées telles que la LC-MS/MS ou la HPLC/ESI-MS pour identifier et quantifier précisément les composés présents.
- Tests biologiques supplémentaires : Élargir les tests d'activité biologique, notamment en incluant des essais antiviraux ou anticancéreux, pour évaluer d'autres potentialités thérapeutiques.
- Approfondissement des tests *in vivo* : Étudier l'efficacité des extraits en conditions *in vivo* sur des modèles de maladies chroniques ou aiguës afin de valider leur potentiel thérapeutique.
- Exploration des mécanismes d'action : Utiliser le docking moléculaire pour comprendre les interactions spécifiques des composés avec leurs cibles moléculaires (enzymes, récepteurs) impliquées dans les activités biologiques observées.
- Développement de formulations : Envisager de formuler des extraits ou huiles essentielles de *Salvia chudaei* dans des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou nutraceutiques, en tenant compte de la stabilité et de la biodisponibilité.
- Micropropagation et conservation : Poursuivre les travaux sur la culture *in vitro* pour assurer une production durable à grande échelle de la plante, tout en protégeant ses ressources naturelles.

Cela permettra d'approfondir l'exploitation du potentiel de *Salvia chudaei* tout en explorant de nouvelles voies d'application.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bruneton, J.J.H., *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept Ltd. 1999: p. 385-386.
2. Kasilo, O.M., J.B.J.N.P.B.A.i.F. Nikiema, Medicine, and Cosmetics, *World Health Organization perspective for traditional medicine*. 2014: p. 23-42.
3. Fabricant, D.S. and N.R.J.E.h.p. Farnsworth, *The value of plants used in traditional medicine for drug discovery*. 2001. **109**(suppl 1): p. 69-75.
4. Ihaddaden, A., et al., *Climate and vegetation structure determine plant diversity in Quercus ilex woodlands along an aridity and human-use gradient in Northern Algeria*. 2013. **208**(4): p. 268-284.
5. Van Wyk, B.-E. and M. Wink, *Medicinal plants of the world*. 2018: Cabi.
6. Hadjadj, S., et al., *Ethnobotanical study and phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine in the Northeastern Sahara of Algeria (area of Ouargla)*. 2015. **9**(41): p. 1049-1059.
7. Ozenda, P., *Flora and vegetation of the Sahara*. 1991: CNRS.
8. Naghibi, F., et al., *Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology*. 2005. **4**(2): p. 63-79.
9. Messaili, B., *Systematics of spermaphytes*. Ed. 1995, Office des Publications Universitaire, Algiers. 127p.
10. Quezel, P., S.J.N.f.o.A. Santa, and s.d. regions., *New flora of Algeria and southern desert regions*. 1962.
11. Ozenda, P.J.F.o.t.S., *Flora of the Sahara*. 1977(ed. 2).
12. Piccaglia, R., et al. *Modifications over years of volatile compounds and agronomic features in a Sicilian Clary sage biotype*. in *I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation* 723. 2006.
13. Fellah, S., et al., *Chemical composition and antioxidant properties of Salvia officinalis L. oil from two culture sites in Tunisia*. 2006. **18**(5): p. 553-556.
14. Walker, J.B., et al., *Salvia (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of Salvia and tribe Mentheae*. 2004. **91**(7): p. 1115-1125.
15. Karousou, R., D.N. Koureas, and S.J.P. Kokkini, *Essential oil composition is related to the natural habitats: Coridothymus capitatus and Satureja thymbra in NATURA 2000 sites of Crete*. 2005. **66**(22): p. 2668-2673.
16. Rajabi, Z., et al., *Compositions and yield variation of essential oils among and within nine Salvia species from various areas of Iran*. 2014. **61**: p. 233-239.
17. Ulubelen, A., G. Topcu, and U.J.S.i.n.p.c. Kolak, *Labiatae flavonoids and their bioactivity*. 2005. **30**: p. 233-302.
18. Bartol, T., et al., *Medicinal and aromatic plants in scientific databases*. 2015: p. 359-373.
19. Liu, B.-L., et al., *Comparison of phytochemical and antioxidant activities in micropropagated and seed-derived Salvia miltiorrhiza plants*. 2018. **53**(7): p. 1038-1044.
20. Sharifi-Rad, J., et al., *Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems*. 2017. **22**(1): p. 70.
21. Ghorbani, A., M.J.J.o.t. Esmaeilzadeh, and c. medicine, *Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components*. 2017. **7**(4): p. 433-440.
22. Georgiev, V., et al., *Chemical compositions of essential oils from leaves and flowers of Salvia ringens Sibth. et Sm. growing wild in Bulgaria*. 2013. **16**(5): p. 624-629.

23. Krimat, S., et al., *Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of Salvia chudaei Batt. et Trab. endemic plant from Algeria*. 2015. **27**(5): p. 447-453.
24. Li, B., et al., *Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected Salvia species measured by GC–MS and HPLC methods*. 2015. **69**: p. 329-334.
25. Tosun, A., et al., *Essential oil composition and anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L (Lamiaceae) in murin macrophages*. 2014. **13**(6): p. 937-942.
26. Sonboli, A., P. Salehi, and S.J.J.o.E.o.r. Ghareh-naghadeh, *Chemical variability in the essential oil composition of Salvia hypoleuca, an endemic species from Iran*. 2016. **28**(5): p. 421-427.
27. Yousefi, M., V. Nazeri, and M.J.J.o.E.O.B.P. Mirza, *Essential oil variation in natural populations of Salvia leriifolia Benth*. 2012. **15**(5): p. 755-760.
28. Porres-Martínez, M., et al., *Influence of phenological stage on chemical composition and antioxidant activity of Salvia lavandulifolia Vahl. essential oils*. 2014. **53**: p. 71-77.
29. Tenore, G.C., et al., *Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of Salvia lanigera from Cyprus*. 2011. **49**(1): p. 238-243.
30. AbouZid, S.F., A.A.J.J.o.e. Mohamed, and ethnomedicine, *Survey on medicinal plants and spices used in Beni-Sueif, Upper Egypt*. 2011. **7**: p. 1-6.
31. Kadhim, S.M., et al., *Study of some Salvia officinalis L.(sage) components and effect of their aqueous extract on antioxidant*. 2016. **14**(2): p. 711-719.
32. Arnold, N., et al., *A contribution to the flora and ethnobotanical knowledge of Mount Hermon, Lebanon*. 2015. **25**: p. 13-55.
33. Idolo, M., R. Motti, and S.J.J.o.E. Mazzoleni, *Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines)*. 2010. **127**(2): p. 379-395.
34. Jaradat, N. and D.J.J.o.e. Adawi, *Use of herbal medicines during pregnancy in a group of Palestinian women*. 2013. **150**(1): p. 79-84.
35. Jarić, S., et al., *An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia)*. 2015. **175**: p. 93-108.
36. Lumpert, M., S.J.J.o.E. Kreft, and Ethnomedicine, *Folk use of medicinal plants in Karst and Gorjanci, Slovenia*. 2017. **13**: p. 1-34.
37. Maxia, A., et al., *Medical ethnobotany of the Tabarkins, a Northern Italian (Ligurian) minority in south-western Sardinia*. 2008. **55**: p. 911-924.
38. Pieroni, A., et al., *Local knowledge of medicinal plants and wild food plants among Tatars and Romanians in Dobruja (South-East Romania)*. 2015. **62**: p. 605-620.
39. Šavikin, K., et al., *Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district*. 2013. **146**(3): p. 803-810.
40. Dokos, C., et al., *Ethnopharmacological survey of endemic medicinal plants in Paphos district of Cyprus*. 2009. **2009**(8): p. 11.
41. FAKİR, H., M. KORKMAZ, and B.J.J.o.A.B.S. GÜLLER, *Medicinal plant diversity of western Mediterranean region in Turkey*. 2009. **3**(2): p. 33-43.
42. Gürdal, B. and Ş.J.J.o.E. Kültür, *An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey)*. 2013. **146**(1): p. 113-126.
43. Ramdane, F., et al., *Ethnobotanical study of some medicinal plants from Hoggar, Algeria*. 2015. **9**(30): p. 820-827.
44. Sekkoum, K., et al., *Traditional phytotherapy for urinary diseases in Bechar district (south west of Algeria)*. 2011. **10**(8): p. 2616-2622.
45. Altundag, E., M.J.P.-S. Ozturk, and B. Sciences, *Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey*. 2011. **19**: p. 756-777.
46. Šarić-Kundalić, B., et al., *Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina*. 2011. **133**(3): p. 1051-1076.
47. del Carmen Juárez-Vázquez, M., et al., *Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, México*. 2013. **148**(2): p. 521-527.

48. Hammiche, V. and K.J.J.o.e. Maiza, *Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer*. 2006. **105**(3): p. 358-367.
49. Chase, M.W. and J.L.J.B.J.o.t.l.S. Reveal, *A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III*. 2009. **161**(2): p. 122-127.
50. Teuscher, E.J.M.s., *Medicinal spices*. 2005.
51. Schmidt, M., et al., *The West African Vegetation Database*. 2012. **4**: p. 105-110.
52. Nixon, S., et al., *Plant use at an early Islamic merchant town in the West African Sahel: the archaeobotany of Essouk-Tadmakka (Mali)*. 2011. **20**: p. 223-239.
53. Dai, J. and R.J.J.M. Mumper, *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. 2010. **15**(10): p. 7313-7352.
54. Macheix, J., A. Fleuriot, and C.J.T.p.c.o.p.A.e.o.s.m.o.e.i. Jay-Allemand, *The phenolic composition of plants. An example of secondary metabolites of economic importance*. 2005.
55. Falleh, H., et al., *Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities*. 2008. **331**(5): p. 372-379.
56. Scalbert, A., I.T. Johnson, and M.J.T.A.j.o.c.n. Saltmarsh, *Polyphenols: antioxidants and beyond*. 2005. **81**(1): p. 215S-217S.
57. Ali, G. and G.J.J.o.m.p.r. Neda, *Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human*. 2011. **5**(31): p. 6697-6703.
58. Crozier, A., et al., *Phenols, polyphenols and tannins: an overview*. 2006. **1**: p. 1-25.
59. Crozier, A., et al., *Plant secondary metabolites*. 2006: p. Blackwell Publishers.
60. Jdey, A., et al., *Phytochemical investigation and antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase performances of six medicinal halophytes*. 2017. **112**: p. 508-514.
61. Tilili, N., et al., *Phytochemicals and antioxidant activities of Rhus tripartitum (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity*. 2014. **160**: p. 98-103.
62. Harborne, J.B. and C.J.N.P.R. Williams, *Anthocyanins and other flavonoids*. 1998. **15**(6): p. 631-652.
63. D Archivio, M., et al., *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. 2007. **43**(4): p. 348.
64. Gohari, A.R., et al., *Flavones and flavone glycosides from Salvia macrosiphon Boiss*. 2011. **10**(2): p. 247.
65. Zeb, A. and Zeb, *Phenolic Antioxidants in Foods: Chemistry, Biochemistry and Analysis*. 2021: Springer.
66. Harborne, J.B. and C.A.J.N.p.r. Williams, *Anthocyanins and other flavonoids*. 2001. **18**(3): p. 310-333.
67. Di Carlo, G., et al., *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. 1999. **65**(4): p. 337-353.
68. AFNOR, N.J.r.d.n.f., *Huiles essentielles*. 1992.
69. Panghal, A., et al., *Nanoemulsions: A promising tool for dairy sector*. 2019: p. 99-117.
70. Pandey, A.K., et al., *Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives*. 2017. **7**: p. 2161.
71. Lamien-Meda, A., et al., *Investigation of antioxidant and rosmarinic acid variation in the sage collection of the genebank in Gatersleben*. 2010. **58**(6): p. 3813-3819.
72. Craft, J.D., P. Satyal, and W.N.J.M. Setzer, *The chemotaxonomy of common sage (Salvia officinalis) based on the volatile constituents*. 2017. **4**(3): p. 47.
73. Lima, C.F., et al., *The drinking of a Salvia officinalis infusion improves liver antioxidant status in mice and rats*. 2005. **97**(2): p. 383-389.
74. Ögütçü, H., et al., *Bioactivities of the various extracts and essential oils of Salvia limbata CA Mey. and Salvia sclarea L*. 2008. **32**(3): p. 181-192.
75. Rózsalski, M., et al., *Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of Salvia sclarea L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci*. 2007. **14**(1): p. 31-35.
76. Ivanov, M., et al., *Bioactivities of Salvia nemorosa L. inflorescences are influenced by the extraction solvents*. 2022. **175**: p. 114260.

77. Esmaeili, A., et al., *Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from leaves, stems and flowers of Salvia reuterana Boiss. grown in Iran*. 2008. **22**(6): p. 516-520.
78. Peana, A.T. and M.D.J.S.i.n.p.c. Moretti, *Pharmacological activities and applications of Salvia sclarea and Salvia desoleana essential oils*. 2002. **26**: p. 391-423.
79. Al-Bakri, A.G., G. Othman, and F.U.J.P.M. Afifi, *Determination of the antibiofilm, antiadhesive, and anti-MRSA activities of seven Salvia species*. 2010. **6**(24): p. 264.
80. Baghayeri, M., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using water extract of Salvia leriifolia: Antibacterial studies and applications as catalysts in the electrochemical detection of nitrite*. 2018. **32**(2): p. e4057.
81. Karamian, R., M. Asadbegy, and R.J.J.o.E.O.B.P. Pakazad, *Essential oil compositions, antioxidant and antibacterial activities of two salvia species (S. grossheimii Bioss. and S. syriaca L.) Growing in Iran*. 2014. **17**(2): p. 331-345.
82. Sabbobeh, R., et al., *Antioxidant an antimicrobial activities of the leaf extract of Salvia palaestina*. 2016. **6**(1): p. 076-082.
83. Karcioğlu, L., et al., *Antimicrobial activity of Salvia trichoclada in southern Turkey*. 2011. **13**(1).
84. Ghomi, J.S., et al., *In vitro bioactivity of essential oils and methanol extracts of Salvia reuterana from Iran*. 2012. **7**(5): p. 1934578X1200700527.
85. Aruoma, O.I.J.J.o.t.A.o.c.s., *Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease*. 1998. **75**(2): p. 199-212.
86. Zainol, M., et al., *Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of Centella asiatica (L.) Urban*. 2003. **81**(4): p. 575-581.
87. Ito, N., S. Fukushima, and H.J.C.C.r.i.T. Tsuda, *Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants*. 1985. **15**(2): p. 109-150.
88. Bahadori, M.B., et al., *Salvia nemorosa L.: A novel source of bioactive agents with functional connections*. 2017. **75**: p. 42-50.
89. Iwasaki, A. and R.J.s. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. 2010. **327**(5963): p. 291-295.
90. Feehan, K.T. and D.W.J.T.i.m.m. Gilroy, *Is resolution the end of inflammation?* 2019. **25**(3): p. 198-214.
91. Serhan, C.N., et al., *The atlas of inflammation resolution (AIR)*. 2020. **74**: p. 100894.
92. Netea, M.G., et al., *A guiding map for inflammation*. 2017. **18**(8): p. 826-831.
93. Wang, Z.-C., et al., *The roles of inflammation in keloid and hypertrophic scars*. 2020. **11**: p. 603187.
94. Siriwardhana, N., et al., *Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds*. 2013. **24**(4): p. 613-623.
95. García-Rayado, G., M. Navarro, and A.J.E.r.o.c.p. Lanás, *NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs*. 2018. **11**(10): p. 1031-1043.
96. Bindu, S., S. Mazumder, and U.J.B.p. Bandyopadhyay, *Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective*. 2020. **180**: p. 114147.
97. Dinarello, C.A.J.C., *Anti-inflammatory agents: present and future*. 2010. **140**(6): p. 935-950.
98. Thomford, N.E., et al., *Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery*. 2018. **19**(6): p. 1578.
99. Jin, R., et al., *Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke*. 2013. **6**: p. 834-851.
100. Xu, J., et al., *Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese Salvia species: A review*. 2018. **225**: p. 18-30.
101. Askari, S.F., et al., *Iranian Salvia species: a phytochemical and pharmacological update*. 2021. **183**: p. 112619.
102. Zarei, A., et al., *Hypoglycemic and hypolipidemic activities of Salvia hydrangea in streptozotocin-induced diabetes in rats*. 2015. **18**(4): p. 417.
103. Al-Yousuf, M., et al., *Some effects of Salvia aegyptiaca L. on the central nervous system in mice*. 2002. **81**(1): p. 121-127.

104. Javdan, N. and J.J.P.o. Estakhr, *Neuropharmacological and antidiarrhoeal activity of ethanolic extract of Salvia hypoleuca in rat*. 2011. **2**: p. 905-10.
105. Hosseinzadeh, H., et al., *Effect of Salvia leriifolia Benth. root extracts on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle*. 2007. **7**(1): p. 1-8.
106. Vaseghi, G., et al., *Hypnotic effect of Salvia reuterana Boiss for treatment of insomnia*. 2013. **12**(45): p. 7-13.
107. Amirghofran, Z., et al., *Effect of Salvia mirzayanii on the immune system and induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes*. 2010. **24**(6): p. 500-508.
108. Karami, F., et al., *Investigating the effects of salvia chorassanica bunge and shoot extracts on gastric cancer cells: evidence of different behavior on various tumor grades*. 2020. **27**(3): p. 378-384.
109. Nickavar, B. and L.J.I.J.o.P.R.I. Abolhasani, *Bioactivity-guided separation of an α -amylase inhibitor flavonoid from Salvia virgata*. 2013. **12**(1): p. 57.
110. Sahki, A. and R. Sahki, *Le Hoggar: promenade botanique*. 2004: Atelier ésopé.
111. N'Guessan, K., et al., *Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire)*. 2009. **6**(1).
112. Benmehdi, H., et al., *Phytochemical Study, Antioxidant activity and Kinetic Behaviour of Flavonoids Fractions Isolated from Prunus persica L. Leaves*. 2017. **29**(1).
113. Dohou, N., et al., *Phytochemical screening of an Ibero-Moroccan endemic, thymelaea lythroides*. 2003. **142**: p. 61-78.
114. Karumi, Y.J.J.o.M.S., *Identification of Active Principles of M. balsamina (Balsam Apple) Leaf Extract Y. Karumi," PA. Onyeyili and "VO Ogugbuaja*. 2004. **4**(3): p. 179-182.
115. Bekro, Y.-A., et al., *Étude ethnobotanique et screening phytochimique de Caesalpinia benthamiana (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae)*. 2007. **4**(2): p. 217-225.
116. López-Bascón, M. and M.L. De Castro, *Soxhlet extraction, in Liquid-phase extraction*. 2020, Elsevier. p. 327-354.
117. Kumari, B., et al., *Recent advances on application of ultrasound and pulsed electric field technologies in the extraction of bioactives from agro-industrial by-products*. 2018. **11**: p. 223-241.
118. Zhong, K. and Q.J.C.p. Wang, *Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology*. 2010. **80**(1): p. 19-25.
119. Hammoudi, *Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien*, in *Département des Sciences Biologiques*. 2015, KASDI MERBAH UNIVERSITY ALGERIA. p. 133.
120. VI, S.J.M.i.E., *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. 1999. **299**: p. 152-178.
121. Lamaison, J. and A.J.P.A.H. Carnet, *Contents in main flavonoid compounds of Crataegus monogyna Jacq. and Crataegus laevigata (Poiret) DC flowers at different development stages*. 1990. **65**(1): p. 315-320.
122. Julkunen-Titto, R.J.J.f.s., *Phenolic constituents in the levels of northern willows: methods for precursors of clarified apple juice sediment*. 1985. **33**: p. 254-257.
123. Siddiqui, M.R., Z.A. AlOthman, and N.J.A.J.o.c. Rahman, *Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review*. 2017. **10**: p. S1409-S1421.
124. Bonfilio, R., M.B. De Araujo, and H.R.N.J.W.T.B.B. Salgado, *Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review*. 2010. **7**(4): p. 316-338.
125. Pushpa Latha, E. and B.J.J.A.P. Sailaja, *Bioanalytical method development and validation by HPLC: a review*. 2014. **1**: p. 1-9.
126. Velasco-Negueruela, A. and M.J.P. Pérez-Alonso, *The volatiles of six Teucrium species from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands*. 1990. **29**(4): p. 1165-1169.

127. Boukhatem, M.N. and W.N.J.P. Setzer, *Aromatic herbs, medicinal plant-derived essential oils, and phytochemical extracts as potential therapies for coronaviruses: future perspectives*. 2020. **9**(6): p. 800.
128. Hassan, W., et al., *Gas chromatography mass spectrometric (GCMS) analysis of essential oils of medicinal plants*. 2016. **4**(8): p. 420-437.
129. Wiegand, I., K. Hilpert, and R.E.J.N.p. Hancock, *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. 2008. **3**(2): p. 163-175.
130. Haddouchi, F., et al., *Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de Thymus fontanesii Boiss & Reut*. 2009. **5**(2).
131. Doumbouya, M., et al., *Comparing in vitro activities of two synthetic fungicides and two essential oils on soil fungi of vegetable crops in Côte d'Ivoire*. 2012. **50**: p. 3520-3532.
132. Prior, R.L., et al., *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. 2005. **53**(10): p. 4290-4302.
133. Frankel, E.N., A.S.J.J.o.t.S.o.F. Meyer, and Agriculture, *The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants*. 2000. **80**(13): p. 1925-1941.
134. Jayaprakash, G.K., et al., *Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: a byproduct from curcumin production*. 2002. **57**(9-10): p. 828-835.
135. Kedare, S.B., R.J.J.o.f.s. Singh, and technology, *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*. 2011. **48**: p. 412-422.
136. Kartal, N., et al., *Investigation of the antioxidant properties of Ferula orientalis L. using a suitable extraction procedure*. 2007. **100**(2): p. 584-589.
137. Decker, E.A., B.J.J.o.A. Welch, and f. Chemistry, *Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food*. 1990. **38**(3): p. 674-677.
138. Toxicity-Up, A.O.J.O.f.E.C.-O. and F. Development: Paris, *OECD guideline for testing of chemicals*. 2001.
139. Liu, X., et al., *An in vivo and in vitro assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of Clematis terniflora DC. extract, participation of aurantiamide acetate*. 2015. **169**: p. 287-294.
140. Bjarnason, I., et al., *Intestinal permeability and inflammation in rheumatoid arthritis: effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. 1984. **324**(8413): p. 1171-1174.
141. Krimat, S., et al., **Anti-inflammatory and anti-lipid peroxydation potentials *Salvia chudaei* Batt et Trab and *Lavandula antineae* Maire: endemic plants from Algerian Sahara** Bulletin of Pharmaceutical Sciences
2022. **45**(2): p. 667-677
142. Chemat, F., et al., *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review*. 2017. **34**: p. 540-560.
143. AcademiaMexicanadelInvestigaciónyDocenciaenIngenieríaQuímica, A.J.R.M.d.I.Q., **COMPARATIVE STUDY OF ULTRASOUND AND MACERATION TECHNIQUES FOR THE EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM COCOA BEANS (*Theobroma cacao* L.) ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS TECNICAS DE ULTRASONIDO Y MACERACION PARA LA EXTRACCION DE POLIFENOLES DEL GRANO DE**. 2013. **12**(1): p. 11-18.
144. Quiroz-Reyes, C., et al., *Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.)*. 2013. **12**(1): p. 11-18.
145. Lee, K.W., et al., *Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine*. 2003. **51**(25): p. 7292-7295.
146. Semaoui, R., et al., *Infusion of aerial parts of *Salvia chudaei* Batt. & Trab. from Algeria: Chemical, toxicological and bioactivities characterization*. J Ethnopharmacol, 2021. **280**: p. 114455.
147. Zaouali, Y., et al., *Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities*. 2010. **48**(11): p. 3144-3152.

148. Podsedek, A.J.L.-F.s. and Technology, *Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review*. 2007. **40**(1): p. 1-11.
149. Raigón, M.D., et al., *Comparison of eggplant landraces and commercial varieties for fruit content of phenolics, minerals, dry matter and protein*. 2008. **21**(5): p. 370-376.
150. Hernández-Saavedra, D., et al., *Phytochemical characterization and effect of Calendula officinalis, Hypericum perforatum, and Salvia officinalis infusions on obesity-associated cardiovascular risk*. 2016. **25**: p. 163-172.
151. Erdogan-Orhan, I., et al., *Sage-called plant species sold in Turkey and their antioxidant activities*. 2010. **75**(11): p. 1491-1501.
152. Kocak, M.S., et al., *Salvia cadmica: Phenolic composition and biological activity*. 2016. **85**: p. 204-212.
153. Ghorbanpour, M.J.I.J.o.P.P., *Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of Salvia officinalis plant in response to nano-titanium dioxide*. 2015. **20**: p. 249-256.
154. Altay, A., *Antioxidant and cytotoxic properties of Salvia fruticosa M. and its effects on gene expressions of some CYP450 and antioxidant enzymes in HT-29 cell line*. 2015.
155. ŞEKER KARATOPRAK, G., et al., *Potential antioxidant and enzyme inhibitory effects of nanoliposomal formulation prepared from Salvia aramiensis Rech. f. extract*. 2020. **9**(4).
156. Loizzo, M.R., et al., *In vitro antioxidant and antiproliferative activities of nine Salvia species*. 2014. **28**(24): p. 2278-2285.
157. Walch, S.G., et al., *Antioxidant capacity and polyphenolic composition as quality indicators for aqueous infusions of Salvia officinalis L.(sage tea)*. 2011. **2**: p. 79.
158. Farhat, M.B., et al., *Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of Salvia species growing in different habitats*. 2013. **49**: p. 904-914.
159. Martins, N., et al., *Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from Salvia officinalis L.* 2015. **170**: p. 378-385.
160. Afonso, A.F., et al., *Phytochemical composition and bioactive effects of Salvia africana, Salvia officinalis 'Icterina' and Salvia mexicana aqueous extracts*. 2019. **24**(23): p. 4327.
161. Gerhardt, U. and A.J.F. Schroeter, *Rosmarinic acid—a naturally occurring antioxidant in spices*. 1983. **63**: p. 1628-1630.
162. Lu, Y. and L.Y.J.P. Foo, *Polyphenolics of Salvia—a review*. 2002. **59**(2): p. 117-140.
163. Tian-Xiu, Q. and L.J.P. Lian-Niang, *Isosalvianolic acid C, a depside possessing a dibenzooxepin skeleton*. 1992. **31**(3): p. 1068-1070.
164. Dent, M., et al., *The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (Salvia officinalis L.) extracts*. 2013. **51**(1): p. 84-91.
165. Tohma, H., et al., *RP-HPLC/MS/MS analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of Salvia L. species*. 2016. **5**(4): p. 38.
166. Proestos, C., et al., *RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity*. 2005. **53**(4): p. 1190-1195.
167. Chalchat, J., et al., *Study of clones of Salvia officinalis L. yields and chemical composition of essential oil*. 1998. **13**(1): p. 68-70.
168. Anačkov, G., et al., *Chemical composition of essential oil and leaf anatomy of Salvia bertolonii Vis. and Salvia pratensis L.(Sect. Plethiosphace, Lamiaceae)*. 2008. **14**(1): p. 1-9.
169. Akin, M., et al., *Antibacterial activity and composition of the essential oils of two endemic Salvia sp. from Turkey*. 2010. **9**(15): p. 2322-2327.
170. Karaman, S., A. Ilcim, and N.J.P.J.o.B. Comlekcioglu, *Composition of the essential oils of Salvia aramiensis Rech. fil. and Salvia cyanescens Boiss. & Bal.* 2007. **39**(1): p. 169.
171. Bernotienė, G., et al., *Essential oil composition variability in sage (Salvia officinalis L.)*. 2007. **18**(4).
172. Jeshvaghani, Z.A., et al., *Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in different Salvia species using three model systems*. 2015. **77**: p. 409-414.

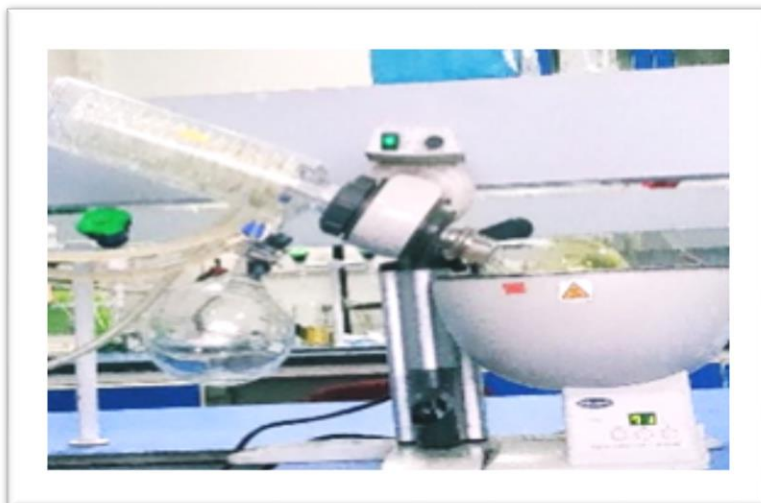
173. Roby, M.H.H., et al., *Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (Thymus vulgaris L.), sage (Salvia officinalis L.), and marjoram (Origanum majorana L.) extracts*. 2013. **43**: p. 827-831.
174. Vosoughi, N., et al., *Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (Salvia officinalis L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies*. 2018. **117**: p. 366-374.
175. Takano, A. and H.J.J.o.p.r. Okada, *Phylogenetic relationships among subgenera, species, and varieties of Japanese Salvia L.(Lamiaceae)*. 2011. **124**: p. 245-252.
176. Karik, U., et al., *Essential oil composition of some sage (Salvia spp.) species cultivated in İzmir (Turkey) ecological conditions*. 2018. **52**(4): p. 102-107.
177. Kamkar, A., et al., *Nanocomposite active packaging based on chitosan biopolymer loaded with nano-liposomal essential oil: Its characterizations and effects on microbial, and chemical properties of refrigerated chicken breast fillet*. 2021. **342**: p. 109071.
178. Derwich, E., Z. Benziane, and A.J.I.J.A.B. Boukir, *Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of Cedrus atlantica*. 2010. **12**(3): p. 381-385.
179. Mazari, K., et al., *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian Juniperus phoenicea L. and Cupressus sempervirens L.* 2010. **4**(10): p. 959-964.
180. Vagionas, K., et al., *Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three Satureja species growing in Tanzania*. 2007. **103**(2): p. 319-324.
181. Zhang, Q.-L., B.M. Fu, and Z.-J.J.D.D. Zhang, *Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood–brain barrier permeability*. 2017. **24**(1): p. 1037-1044.
182. Özek, G., et al., *Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from Salvia rosifolia Sm., and evaluation for biological activity*. 2010. **1217**(5): p. 741-748.
183. Bourkhiss, M., et al., *Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de Tetraclinis articulata (Vahl) du Maroc*. 2007. **3**(2).
184. Nóbrega, J.R., et al., *Antifungal action of α -pinene against Candida spp. isolated from patients with otomycosis and effects of its association with boric acid*. 2021. **35**(24): p. 6190-6193.
185. Azaz, D., et al., *Antimicrobial activity of some Satureja essential oils*. 2002. **57**(9-10): p. 817-821.
186. Magiatis, P., et al., *Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek Achillea species*. 2002. **57**(3-4): p. 287-290.
187. Del-Vechio-Vieira, G., et al., *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Ageratum fastigiatum (Asteraceae)*. 2009. **3**(1).
188. Gachkar, L., et al., *Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils*. 2007. **102**(3): p. 898-904.
189. Ghanmi, M., et al., *Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (Pinus pinaster) et du pin d'Alep (Pinus hale-pensis) du Maroc*. 2007. **154**(2): p. 293-300.
190. Bakkali, F., et al., *Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. 2005. **585**(1-2): p. 1-13.
191. Burt, S.J.I.j.o.f.m., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. 2004. **94**(3): p. 223-253.
192. Viuda-Martos, M., et al., *Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet*. 2008. **43**(3): p. 526-531.
193. Sökmen, M., et al., *In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of Origanum acutidens*. 2004. **52**(11): p. 3309-3312.
194. Busatta, C., et al., *Application of Origanum majorana L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage*. 2008. **25**(1): p. 207-211.
195. Ochs, R.S.J.J.o.C.E., *Understanding enzyme inhibition*. 2000. **77**(11): p. 1453.

196. Dorman, H.D. and S.G.J.J.o.a.m. Deans, *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. 2000. **88**(2): p. 308-316.
197. Cowan, M.M.J.C.m.r., *Plant products as antimicrobial agents*. 1999. **12**(4): p. 564-582.
198. Beavis, K.G., et al., *Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens*. 1995. **33**(10): p. 2582-2586.
199. Comini, L., et al., *Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from Heterophyllaea pustulata (Rubiaceae)*. 2011. **102**(2): p. 108-114.
200. Doughari, J.H., *Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents*. 2012: INTECH Open Access Publisher Rijeka, Croatia.
201. Dabur, R., et al., *Antimicrobial activity of some Indian medicinal plants*. 2007. **4**(3): p. 313-318.
202. Essawi, T. and M.J.J.o.e. Srour, *Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity*. 2000. **70**(3): p. 343-349.
203. Tepe, B., et al., *Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae)*. 2005. **90**(3): p. 333-340.
204. Tepe, B., et al., *Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha (Montbret et Aucher ex Benth.) and Salvia multicaulis (Vahl)*. 2004. **84**(4): p. 519-525.
205. Kivrak, İ., et al., *Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of Salvia potentillifolia*. 2009. **116**(2): p. 470-479.
206. Prakash, B., et al., *Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges*. 2015. **47**: p. 381-391.
207. Ma, H., et al., *Cell-wall-degrading enzymes required for virulence in the host selective toxin-producing necrotroph Alternaria alternata of citrus*. 2019. **10**: p. 2514.
208. Javanmardi, J., et al., *Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions*. 2003. **83**(4): p. 547-550.
209. Marinova, G. and V.J.B.J.o.A.S. Batchvarov, *Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH*. 2011. **17**(1): p. 11-24.
210. Ghedadba, N., et al., *Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de Marrubium deserti de Noé*. 2015. **13**(2): p. 118-129.
211. Shahidi, F.J.J.o.F.S., *Functional foods: Their role in health promotion and disease prevention*. 2004. **69**(5): p. R146-R149.
212. Olszowy, M.J.P.P. and Biochemistry, *What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?* 2019. **144**: p. 135-143.
213. KADIFKOVA PANOVSKA, T., S. Kulevanova, and M.J.A.P. Stefova, *In vitro antioxidant activity of some Teucrium species (Lamiaceae)*. 2005. **55**(2): p. 207-214.
214. Basli, A., N. Belkacem, and I.J.P.c.-b.a. Amrani, *Health benefits of phenolic compounds against cancers*. 2017: p. 193-210.
215. Kumar, N. and N.J.B.r. Goel, *Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications*. 2019. **24**: p. e00370.
216. Kiokias, S., C. Proestos, and V.J.F. Oreopoulou, *Phenolic acids of plant origin—A review on their antioxidant activity in vitro (o/w emulsion systems) along with their in vivo health biochemical properties*. 2020. **9**(4): p. 534.
217. Bouzenna, H., et al., *Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells*. 2017. **93**: p. 961-968.
218. Lehmann, H. and J.-Y. Pabst. *La phytovigilance: impératif médical et obligation légale*. in *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2016. Elsevier.
219. Le Bars, D., M. Gozariu, and S.W.J.P.r. Cadden, *Animal models of nociception*. 2001. **53**(4): p. 597-652.
220. Satyanarayana, P.S., et al., *Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice*. 2004. **28**(4): p. 641-649.
221. Opal, S.M. and V.A.J.C. DePalo, *Anti-inflammatory cytokines*. 2000. **117**(4): p. 1162-1172.

222. Fischer, R., O.J.O.m. Maier, and c. longevity, *Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF*. 2015. **2015**.
223. Yang, H., et al., *Bornyl acetate has an anti-inflammatory effect in human chondrocytes via induction of IL-11*. 2014. **66**(12): p. 854-859.
224. Chen, N., et al., *Inhibition of lung inflammatory responses by bornyl acetate is correlated with regulation of myeloperoxidase activity*. 2014. **186**(1): p. 436-445.
225. Refaey, M.S., et al., *In vitro anti-Inflammatory activity of Cotula anthemoides essential oil and in silico molecular docking of its bioactives*. 2022. **27**(6): p. 1994.
226. Grosser, T., E. Ricciotti, and G.A.J.T.i.p.s. FitzGerald, *The cardiovascular pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. 2017. **38**(8): p. 733-748.
227. Jiang, Y., et al., *Piezo1 regulates intestinal epithelial function by affecting the tight junction protein claudin-1 via the ROCK pathway*. 2021. **275**: p. 119254.
228. Plaza-Díaz, J., et al., *Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases*. 2017. **9**(6): p. 555.
229. Rahbar, I., et al., *The effect of central administration of alpha-pinene on capsaicin-induced dental pulp nociception*. 2019. **52**(3): p. 307-317.
230. Him, A., et al., *Antinociceptive activity of alpha-pinene and fenchone*. 2008. **3**: p. 363-369.
231. Bae, G.-S., et al., *Piperine ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the activation of mitogen activated protein kinases*. 2011. **410**(3): p. 382-388.
232. Kim, D.-S., et al., *Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages*. 2015. **43**(04): p. 731-742.
233. Moon, T.C., A.D. Befus, and M.J.F.i.i. Kulka, *Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved*. 2014. **5**: p. 569.
234. Boonyarikpunchai, W., et al., *Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from Thunbergia laurifolia Lindl*. 2014. **124**: p. 67-73.
235. Guginski, G., et al., *Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of Melissa officinalis (lemon balm) in mice*. 2009. **93**(1): p. 10-16.
236. Rahbardar, M.G., et al., *Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of Rosmarinus officinalis L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain*. 2017. **86**: p. 441-449.
237. De Melo, G.O., et al., *Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from Sedum dendroideum*. 2009. **124**(2): p. 228-232.

APPENDICE A

APPAREILLAGE



A : Evaporateur rotatif



HPLC-UV/VIS Agilent 1200



Shimadzu GC-17 GC System,
coupled with Shimadzu QP5050A
MS.

ANALYSE DES EXTRAITS PAR HPLC-UV/VIS

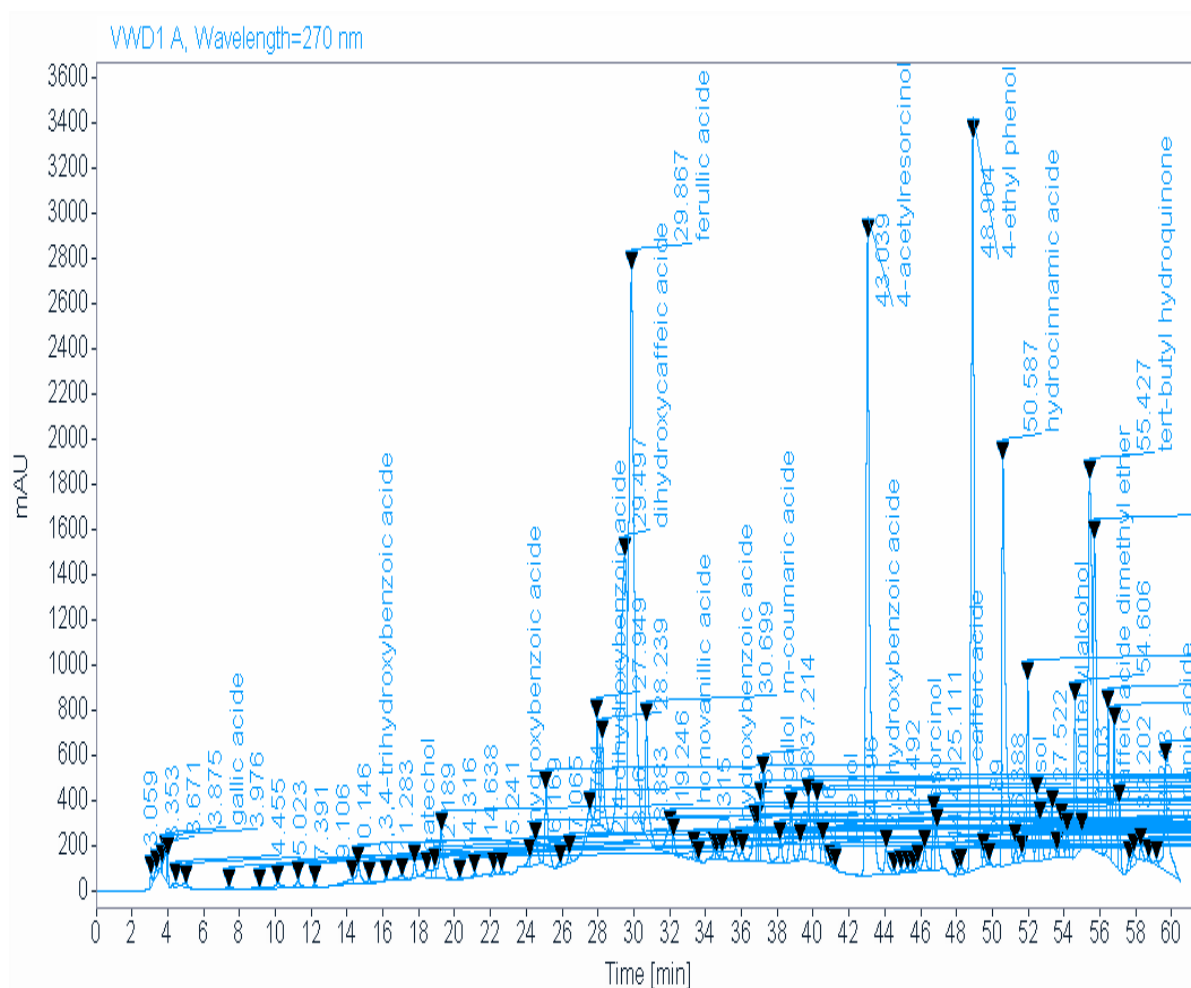
sample



Agilent Technologies

Sample name:	extrait aqueux salvia
Instrument:	HPLC
Injection date:	11/13/2023 10:57:03 AM
Acq. method:	POLYPHENOL91123.M
Analysis method:	POLYPHENOL11.2.M
Last changed:	11/19/2023 3:01:07 PM

Sample type:	Sample
Location:	Vial 8
Injection:	1 of 1
Acq. operator:	SYSTEM



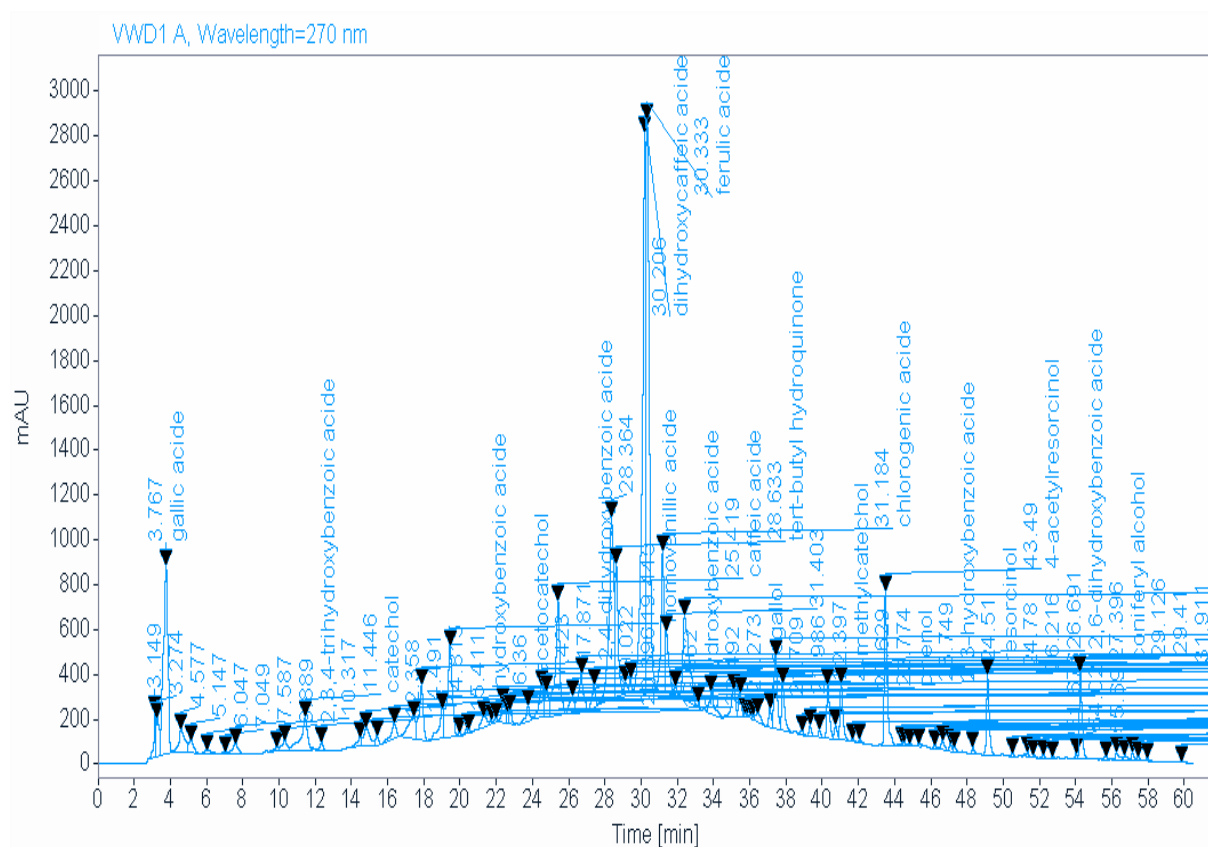
Nom	Temps de retention	air de std	concent std	unite	air echantillon	concent echantillon
Gallic acide	3.88	640.36	6.80	ppm	1175.61	12.48
2,3,4-Trihydroxybenzoic Acide	1015	343.98	6.80	ppm	691.84	13.68
Catechol	11.28	71.26	4.40	ppm	621.76	38.39
4-Hydroxybenzoic acide	15.24	828.74	5.60	ppm	190.33	1.29
2,4-Dihydroxybenzoic Acide	17.76	377.95	6.00	ppm	717.53	11.39
Homovanillic acide	19.25	68.59	7.20	ppm	3617.01	379.68
3-hydroxybenzoic acide	20.32	120.09	5.60	ppm	134.21	6.26
Pyrogallol	21.13	829.29	5.20	ppm	233.10	1.46
phenol	22.60	1004.13	3.60	ppm	308.23	1.11
2,3-hydroxybenzoic acid	24.20	538.93	6.00	ppm	446.56	4.97
resorcinol	24.49	110.17	4.40	ppm	2115.92	84.51
caffeic acide	25.11	41.32	7.20	ppm	4358.81	759.52
tyrosol	26.39	1203.48	5.60	ppm	435.77	2.03
coniferyl alcohol	27.52	1787.72	7.20	ppm	1702.32	6.86
Dihydroxycaffeic acide	29.50	49.00	7.20	ppm	31161.71	4578.86
ferulic acid	29.87	373.60	7.60	ppm	50226.63	1021.74
m-coumaric acide	30.70	1172.60	6.40	ppm	5623.96	30.70
Caffeic acide dimethyl ether	32.03	706.26	6.00	ppm	2479.49	21.06
Sinapic acid	33.34	142.99	8.80	ppm	496.53	30.56
Vanillic acide	33.60	37.14	6.80	ppm	115.50	21.15
4-Ethylguaiacol	34.93	150.17	6.00	ppm	361.80	14.46
p-coumaric acid	36.05	1878.88	6.40	ppm	578.44	1.97
hydroferulic acid	36.76	124.94	8.00	ppm	2142.69	137.20
4-Propylphenol	38.17	188.63	5.60	ppm	1319.63	39.18
lawson	41.23	728.18	16.50	ppm	111.05	2.52
4-methyl guaiacol	44.07	211.21	5.60	ppm	1545.12	40.97
3-Methoxyhydrocinnamic Acide	45.57	447.12	7.20	ppm	109.93	1.77
Salicylic acide	45.81	13.57	5.60	ppm	289.98	119.67
folic acide	46.22	396.81	27.37	ppm	1180.80	81.45
beta-carotene	46.71	92.68	8.47	ppm	2196.20	200.71
alpha-methyl-cinnamic acide	46.89	789.83	6.40	ppm	2452.29	19.87

Nom	Temps de retention	air de std	concent std	unite	air echantillon	concent echantillon
benzoic acide	48.26	20.09	0.37	ppm	373.14	6.87
4-ethyl phenol	48.90	297.00	4.80	ppm	44755.76	723.33
maleic acide	49.52	184.53	18.41	ppm	612.72	61.13
naringenin	49.84	69.84	6.00	ppm	186.22	16.00
Hydrocinnamic acide	50.59	9.04	6.00	ppm	8581.38	5695.61
tert-butyl hydroquinone	55.43	45.82	3.32	ppm	21990.60	1593.38
trans-cinnamic acid	55.69	37.69	6.00	ppm	18671.29	2972.35



Sample name: Extrait ethanolique salvia
Instrument: HPLC
Injection date: 11/12/2023 9:20:40 PM
Acq. method: POLYPHENOL91123.M
Analysis method: POLYPHENOL11.M
Last changed: 11/19/2023 12:03:54 PM

Sample type: Sample
Location: Vial 7
Injection: 1 of 1
Acq. operator: SYSTEM



Nom	Temps de retention	Air de std	Concent std	unite	Air echantillon	Concent echantillon
Gallic acide	3.77	640.36	6.80	ppm	14584.74	154.88
2,3,4-Trihydroxybenzoic acide	9.89	343.98	6.80	ppm	317.75	6.28
Catechol	11.45	71.26	4.40	ppm	3859.87	238.33
4-Hydroxybenzoic acide	15.41	828.74	5.60	ppm	450.23	3.04
4-Acetocatechol	16.36	510.20	6.00	ppm	1406.01	16.53
2,4-Dihydroxybenzoic acide	17.87	377.95	6.00	ppm	3939.20	62.54
Homovanillic acide	19.45	68.59	7.20	ppm	7804.18	819.22
3-hydroxybenzoic acide	19.96	120.09	5.60	ppm	109.77	5.12
Pyrogallol	21.27	829.29	5.20	ppm	1066.59	6.69
4-Methylcatechol	22.40	89.98	4.80	ppm	1229.87	65.61
phenol	22.77	1004.13	3.60	ppm	585.53	2.10
2,3-hydroxybenzoic acid	23.75	538.93	6.00	ppm	880.74	9.81
resorcinol	24.51	110.17	4.40	ppm	2329.70	93.04
caffeic acide	25.42	41.32	7.20	ppm	9133.21	1591.46
2,6-dihydroxybenzoic acid	26.69	48.74	6.00	ppm	3220.78	396.49
coniferyl alcohol	27.40	1787.72	7.20	ppm	1171.66	4.72
tert-butyl hydroquinone	28.63	24.25	6.00	ppm	7052.27	1744.89
Dihydroxycaffeic acide	30.21	49.00	7.20	ppm	31674.73	4654.25
ferulic acid	30.33	373.60	7.60	ppm	32431.10	659.73
chlorogenic acid	31.18	101.47	14.00	ppm	7840.10	1081.71
Caffeic acide dimethyl ether	32.40	706.26	6.00	ppm	8977.25	76.27
Sinapic acid	33.87	142.99	8.80	ppm	1934.03	119.03
p-coumaric acid	36.07	1878.88	6.40	ppm	117.78	0.40
hydroferulic acid	37.42	124.94	8.00	ppm	4173.80	267.25
4-Propylphenol	37.83	188.63	5.60	ppm	2524.78	74.96
3,4,5-trimethoxycinnamic acide	41.70	1987.15	9.60	ppm	132.56	0.64
lawson	42.06	728.18	16.50	ppm	224.91	5.10
esculin	46.63	71.80	5.50	ppm	491.98	37.69
beta-carotene	47.08	92.68	8.47	ppm	300.09	27.43
hespertin	47.28	224.21	19.05	ppm	228.96	19.45
benzoic acide	49.14	20.09	0.37	ppm	3664.67	67.49
3,5-Dimethoxyphenol	50.49	13.50	6.60	ppm	143.44	70.13
Hydrocinnamic acide	52.19	9.04	6.00	ppm	180.40	119.73
tert-butyl hydroquinone	54.25	45.82	3.32	ppm	4098.50	296.97
trans-cinnamic acid	56.25	37.69	6.00	ppm	501.54	79.84