

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb de Blida
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
CHOUIT HAFSA
En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Substances Naturelles

Thème

**Investigation phytochimique et recherche de l'activité
biologique de l'espèce *Salvia microphylla***

Soutenu publiquement le 29 juin 2016 devant le jury composé de :

Y. DAGHBOUCHE	Pr	Président	Université de Blida
K. BOUTEMAK	MCB	Examinatrice	Université de Blida
O. TOUAFEK	MCB	Promotrice	Université de Blida

Promotion 2015-2016

Dédicaces

A l'occasion de ce mémorable travail marquant, qui se rapporte au projet de : Ma soutenance. Il m'est très agréable à dédier ce louable travail,

A mes parents

Mon père,

En premier chef qui m'a toujours aidé et soutenu sans relâche tout au long du parcours de mes études

Ma mère,

Tes prières et tes bénédictions m'ont accompagnée tous les jours dans mes études

A mes sœurs « Maroua, Amira, hadjer »

A Mon frères « Islam »

A tous ma famille

A mes collègues et spécialement tous les étudiants du master 2 chimie des substances naturelle

A tous mes profs qui m'ont assisté pour la préparation de ce glorieux projet de recherches scientifiques.

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté,

Avec toute mon affection et ma reconnaissance

Remerciements

Je tiens en premier lieu, à remercier Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Tout d'abord, je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice Mme O. TOUAFEK, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, par sa grande patience, par sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Nos remerciements vont également à M^{me} Y. DAGHBOUCHE, professeur à l'université de Blida 1 qui a eu l'amabilité d'accepter d'être la présidente du jury, je vous exprime ma profonde reconnaissance.

J'adresse mes sincères remerciements à M^{me} K. BOUTEMAK, maître de conférence à l'université de Blida 1, d'avoir accepté de juger ce travail.

Un remerciement chaleureux et sincère à tous nos enseignants, membres de l'équipe pédagogique du master, « Chimie des Substances Naturelles », pour l'effort qui ont fourni tout au long du cycle.

A toute personne qui a participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous.

ملخص

إن العائلة الشفوية متواجدة بكثرة في الجزائر و صنف *Salvia* هو الأكثر انتشارا بين الأصناف، حيث يضم 23 نوع.

الدراسة الفيتوكيميائية للأجزاء الهوائية لنبته *Salvia microphylla* باستخدام كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد و كروماتوغرافيا العمود عالية HPLC ادت الى إظهار الكم الهائل من الفلافونويد الذي يحتويه مستخلص الأستات الايثيل و البوتانولي.

بينت التحاليل باستخدام كروماتوغرافية الطور الغازي GC و كروماتوغرافية الطور الغازي مع مطيافية الكتلة GC/MS ، بان الزيت الطيار لهذه النبتة يحتوي اساسا على المركبات التالية:

Acétate de β -fenchol (6.36%) et Sclaral ou Sclareolides lactol (5.72%).

قد اظهر مستخلص الأستات الغني بالبولىفينول نشاطا مضادا للأكسدة اقل مقارنة بمستخلص البوتانوليك.

و قد اظهرت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت العطرية و مستخلص الكلوروفورميك فعالية ضد كل من البكتيريا ايجابية الجرام *Staphylococcus aureus et Bacillus cereus*. كما اظهرت دراسة الفعالية المضادة للفطريات للزيت العطرية فعالية كبيرة ضد *Braziliencis Aspergillus*.

الكلمات المفتاحية: *Salvia*، *Salvia microphylla*، الزيت العطرية، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، النشاط المضاد للميكروبات.

Abstract

The Lamiaceae family is widely distributed in Algeria. The genus *Salvia*, the most common, comprising 23 species.

The aerial parts of *Salvia microphylla* usually yield flavonoids compounds. The antioxidant activity of ethyl acetate extracts (EAc) and butanol (EB) from *S. microphylla* were demonstrated by the DPPH test.

The essential oils were obtained by steam distillation and were subsequently subjected to analysis by GC–MS and GC. Sclaral or Sclareolides lactol (5.72%) and acétate de β -Fenchol (6.36%) were found to be the major constituents in the essential oil of *S. microphylla*.

The agar diffusion test was employed to evaluate the bactericidal activity, both essential oil and extract showed bactericidal activity, with the essential oil of *S. microphylla* being more efficient.

Keywords: *Salvia*, *Salvia microphylla*, essential oil, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH, antimicrobial activity.

Résumé

La famille des Lamiaceae est largement distribuée en Algérie. Le genre *Salvia*, le plus répandu, comprend 23 espèces. Dans ce contexte, le présent travail porte sur une étude phytochimique de l'espèce *Salvia microphylla*, et une évaluation de leurs activités antioxydante et antibactérienne.

Nos travaux d'extraction des parties aériennes de l'espèce *Salvia microphylla* par macération, suivie de séparation chromatographiques par CCM, par chromatographie de deux dimensions sur papier Whatman et par HPLC, nous ont permis de montrer la richesse des extraits acétate d'éthyle et butanolique en flavonoïdes.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce *Salvia microphylla* obtenue par hydrodistillation a montré que cette huile est majoritairement composée de Sclaral ou Sclareolides lactol (5.72%) et acétate de β -Fenchol (6.36%).

La détermination de la quantité de polyphénols totaux présents dans les extraits acétate d'éthyle (EAc) et butanolique (EB) de l'espèce *Salvia microphylla*, par la méthode de Folin-Ciocalteu a montré que l'extrait acétate d'éthyle est plus riche en polyphénols que l'extrait butanolique.

L'extrait butanolique a montré une excellente activité antioxydante, par la méthode du DPPH.

L'extraits chloroformique et l'HE ont présentés une activité antibactérienne très importante vis-à-vis les bactéries à Gram positif, à savoir : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, tandis que vis-à-vis les bactéries à Grams négatif, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, ont montré une faible activité antibactérienne.

L'huile essentielle de *Salvia microphylla* a montré une activité antifongique très intéressante, notamment vis-à-vis la souche *Aspergillus Braziliensis*.

Mots clés : *Salvia*, *Salvia microphylla*, Huile essentielle, Composés phénoliques, Activité antioxydante, DPPH, Activité antimicrobienne.

Abréviations

Abc: Absorbance;

AcOEt : acétate d'éthyle;

ARP : Puissance Anti-Radicalaire(ou puissance antioxydante);

BuOH: butanol;

C: concentration;

CCM :Chromatographie sur couche mince;

CP : Chromatographie sur papier;

CE50: Concentration efficace médiane;

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl;

EAc: extrait acétate d'éthyle;

EB: extrait butanolique;

EEp: extrait éther de pétrole;

EC: extrait chloroformique;

CG : chromatographie en phase gazeuse;

GC/MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse;

HE: Huile essentielle;

HPLC : chromatographie liquide haute performance;

MH: Muller Hinton;

mg: milligramme;

mL : millilitre;

µg: microgramme;

µL: microlitre;

nm: nanomètre;

SAB : Sabouraud;

Rf: Rapport Frontal;

UV: Ultra-Violet;

Vit C : Vitamine C.

Liste des figures

Figure 1 : structure de quelques acides phénolique.....	04
Figure 2 : 2-phénylchromane.....	06
Figure 3 : voies de biosynthèse des flavonoïde.....	08
Figure 4 : structure d'isoprène.....	13
Figure 5 : structure du squalène.....	19
Figure 6 : <i>Salvia microphylla</i>	24
Figure 7 : Structure des métabolites secondaires isolés de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	28
Figure 8 : Structure des Composants majoritaires d'huiles essentielles de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	29
Figure 9 : <i>Salvia microphylla</i> sèche.....	30
Figure 10 : Protocole d'extraction.....	31
Figure 11 : Profil Chromatographique sur couche mince CCM de l'extrait éther de pétrole et l'extrait chloroformique.....	35
Figure 12 : Profil Chromatographique CP bidimensionnelle de l'extrait acétate d'éthyle (EAc) et n-ButOH (EB).....	37
Figure 13 : Profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 205$ nm.....	40
Figure 14 : Profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 254$ nm.....	40
Figure 15 : Profil chromatographique de l'extrait butanolique enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 205$ nm.....	41
Figure 16 : Profil chromatographique de l'extrait butanolique enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 254$ nm.....	41
Figure 17 : Montage d'hydrodistillation.....	43
Figure 18 : Huile essentielle de <i>Salvia microphylla</i>	43
Figure 19 : Profil chromatographique CG de l'huile essentielle du <i>Salvia microphylla</i>	46
Figure 20 : structure de quelques composés de l'huile essentielle du <i>Salvia microphylla</i>	47
Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	49
Figure 22 : Le contenu des composés phénoliques des extraits EAc et EB.....	50
Figure 23 : Réaction d'un antioxydant donneur d'hydrogène avec le radical DPPH•.....	51
Figure 24 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'extrait acétate d'éthyle, butanolique et du standard.....	54

Figure 25 : Les CE ₅₀ et les pouvoirs antiradicalaires des extraits EAc, EB et du Vit C.....	55
Figure 26 : Principe de la méthode de diffusion par disque imprégné d'huile essentielle.....	57
Figure 27 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait chloroformique (EC), de l'huile essentielle (HE) relatives aux différentes souches bactériennes.....	62
Figure 28 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait chloroformique (EC), de l'huile essentielle (HE), ATB, ATF1 et ATF 2 relatives aux différentes souches antifongiques.....	62

Liste des tableaux

Tableau 1 : Usages et propriétés de quelques espèces du genre <i>Salvia</i>.....	03
Tableau 2 : Distribution des Acides phénoliques dans le genre <i>Salvia</i>.....	05
Tableau 3 : Distribution des Flavonoïdes aglycones dans le genre <i>Salvia</i>.....	09
Tableau 4 : Distribution des Flavonoïdes glycosides dans le genre <i>Salvia</i>.....	11
Tableau 5 : Distribution des Anthocyanines dans le genre <i>Salvia</i>.....	12
Tableau 6 : Distribution des Sesquiterpène dans le genre <i>Salvia</i>.....	13
Tableau 7 : Composants majoritaires ($\% \geq 5.0$) d'huiles essentielles des espèces du genre <i>Salvia</i>.....	21
Tableau 8 : Les principaux métabolites secondaires isolé de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>...26	26
Tableau 9 : La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>.....	28
Tableau 10 : Résultats de l'extraction de différents extraits de la plante <i>Salvia microphylla</i>.....	32
Tableau 11 : La relation entre la fluorescence et la structure des composés phénoliques d'après Lahouel et Markham.....	33
Tableau 12 : Relation Rf et structure flavoniques.....	34
Tableau 13 : résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits éther de pétrole et chloroformique de <i>Salvia microphylla</i>.....	36
Tableau 14 : Le nombre et la couleur des spots des extraits acétate d'éthyle et butanolique.....	38
Tableau 15 : Rendement de l'huile essentielle de <i>Salvia microphylla</i>.....	44
Tableau 16 : Composition de l'huile essentielle du <i>Salvia microphylla</i>.....	45
Tableau 17 : Taux des polyphénols existant dans les extraits EAc et EB de <i>Salvia microphylla</i>.....	50
Tableau 18 : Absorbances et Pourcentages de l'activité antiradicalaire des différentes concentrations des extraits (acétate d'éthyle et butanolique) et du standard vis-à-vis du radical libre DPPH.....	54
Tableau 19 : Valeurs CE₅₀ et ARP des extraits EAc et EB de <i>Salvia microphylla</i> et de la Vitamine C.....	55
Tableau 20 : Relation entre la sensibilité des souches et le diamètre d'inhibition.....	57
Tableau 21 : Codes de différentes souches microbiennes étudiées.....	59

Tableau 22 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait chloroformique, d'HE et d'ATB relatives aux différentes souches bactériennes.....61

Tableau 23 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait chloroformique, d'HE et des ATFs relatives aux différentes souches fongiques.....61

SOMMAIRE

Dédicace.....	I
Remerciements.....	II
الملخص.....	III
Abstract.....	IV
Résumé.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	IX
Introduction.....	1

Partie théorique

Recherche bibliographique sur le genre *salvia*

I. Présentation botanique et géographique de la famille Lamiaceae.....	2
II. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Salvia</i>	2
II.1. Présentation.....	2
II.2. Propriétés pharmacologiques du genre <i>Salvia</i>	3
II.3. Travaux antérieurs sur les métabolites secondaires du genre <i>Salvia</i>	4
II.4. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre <i>Salvia</i>	19
III. Aperçu bibliographique sur l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	24
III.1. Classification dans la systématique botanique.....	24
III.2. Présentation botanique et répartition géographique.....	25
III.3. Propriétés pharmacologiques de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	25
III.4. Travaux antérieurs sur les métabolites secondaires de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	26
III.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	28

Partie Expérimentale

Chapitre 1: Etude de la composition chimique de l'espèce *Salvia microphylla*

I. Extraction de métabolites secondaires de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	30
I.1. Matériel végétal.....	30
I.2. Extraction.....	30
I.3. Etude analytique par chromatographie.....	32
II. Extraction et analyse de l'huile essentielle.....	43

II.1. Extraction.....	43
II.2. Analyses par GC/MS.....	44

Chapitre 2 Etude de l'activité biologique de l'espèce *Salvia microphylla*

I. Dosage des polyphénols totaux.....	48
I.1. Définition.....	48
I.2. Principe	48
I.3. Protocole expérimentale.....	48
I.4. Résultats et discussion.....	50
II. Etude de l'activité antioxydante de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	51
II.1. Définition.....	51
II.2. Principe du test de DPPH.....	51
II.3. Protocole expérimental.....	52
III. Etude de l'activité antimicrobienne de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	56
III.1. généralité sur l'activité antimicrobienne.....	56
III.2. Protocole expérimental.....	58
II.3. Résultats et discussion.....	61
Conclusion.....	64
Références bibliographiques.....	65
Annexe.....	78

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Les métabolites secondaires sont des "antibiotiques" au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes. Donc, les plantes ont été une riche source de médicament parce qu'elles produisent une foule de molécules bioactives, dont la plupart jouent le rôle de défense chimique contre les prédateurs ou des agents infectieux¹. Elles restent la source prédominante de médicaments pour la majorité de la population mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement. Environ 40 % des médicaments sont ainsi dérivés de la nature².

La flore algérienne comporte près de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques³ ce potentiel floristique, constitué de plantes médicinales toxiques et condimentaires, reste très peu exploré sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de nos plantes en composés phénoliques et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante des produits vis-à-vis du radical libre DPPH. Un test antibactérien est également réalisé afin de déterminer l'efficacité de nos produits.

Ce travail est donc subdivisé en deux parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique consacrée à une étude botanique et phytochimique générale de la famille et du genre de l'espèce étudiée (*Salvia microphylla*).
- La seconde partie est une étude expérimentale, elle comporte deux chapitres :
 - ✓ Le premier chapitre est consacré à l'extraction de métabolites secondaires puis à l'extraction et la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Salvia microphylla*.
 - ✓ Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de l'activité biologique (antioxydante et antimicrobienne) de l'espèce étudiée.

En fin, ce travail est achevé par une conclusion générale.



Partie théorique

A decorative border resembling a scroll, with a black outline and a light blue-grey shaded area at the top and bottom edges. The border has rounded corners and a small circular element at the top-left and bottom-left corners, suggesting a rolled-up scroll.

Recherche bibliographique
sur le genre *Salvia*

I. Présentation botanique et géographique de la famille Lamiaceae

Les plantes de la famille des lamiacées qui porte différents noms avec la famille des labiées et labiacées et dont les noms latins sont Lamiaceae ou Labiatae, est une assez grande famille on en dénombre plus de 4000 espèces recenser dans près de 224 genres⁴.

Les Labiées ou Lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent de 233 à 263 genres et de 6900 à 7200 espèces qui se répartissent sur tout le globe. Elle est aussi bien répandue dans les zones tropicales que dans les zones tempérées du monde. La plus grande diversité est rencontrée selon cet ordre: le bassin méditerranéen, l'Asie centrale, le continent Américain, les Iles du pacifique, l'Afrique équatoriale et la Chine.

Du point de vue chimique, cette famille a fait l'objet d'intenses investigations dans le but d'isoler différents types de composés. Parmi les genres qui sont en cause, on cite : *Ajuga*, *Rhabdosia*, *Teucrium*, *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Leonurus*, *Ballota*, *Coleus*, *Thymus*, *Phlomis*. Ces études ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les stérols, flavonoïdes, iridoïdes, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes^{5,6}.

II. Aperçu bibliographique sur le genre *Salvia*

II.1. Présentation

Salvia constitue le plus grand genre de plantes de la famille de la menthe, Lamiaceae.

Dans les Lamiacées, *Salvia* fait partie de la tribu Mentheae au sein de la sous-famille Nepetoideae.⁴ Il est l'un de plusieurs genres communément appelé sauge. Ce genre est composé de plantes herbacées vivaces ou bisannuelles. Les tiges sont généralement anguleuses comme les autres membres de Lamiacées. Les feuilles sont généralement opposées, mais parfois dentées ou pinnately divisées. Les fleurs sont produites en grappes ou panicules, et produisent généralement un affichage ostentatoire avec des couleurs de fleurs allant du bleu au rouge, de blanc et de jaune moins commun. Le calice est normalement tubulaire ou en forme de gorgone barbus, et divisé en deux parties ou deux lèvres, l'ensemble de la lèvre supérieure ou trois dents, la partie inférieure de deux fentes cloche. Les corolles sont souvent en forme de griffe et sont à deux lèvres, La lèvre supérieure est généralement entière ou à trois dents, La lèvre inférieure a généralement deux lobes. Les étamines sont réduits à deux structures courtes avec anthères deux cellules, la cellule supérieure fertile, et moins imparfaites. Les styles de fleurs sont deux palatines. Les fruits sont ovoïdes ou oblongues nucléolées lisses, ils ont un revêtement mucilagineux dans de nombreuses espèces⁷.

Ce genre comporte 900 espèces réparties dans tout le Vieux Monde et l'Amérique, avec trois régions distinctes de la diversité: l'Amérique Centrale et du Sud, (environ 500 espèces). Asie centrale et la Méditerranée (250 espèces); Asie de l'Est (90 espèces)⁸.

II.2. Propriétés pharmacologiques du genre *Salvia*

Les plantes du genre *Salvia* ont été utilisées en médecine traditionnelle Sous forme de décoctions et d'infusion dans le traitement de plusieurs maladies tel que l'asthme, l'eczéma, le psoriasis et la tuberculose⁹.

La décoction des racines est également utilisée en Afrique du Sud pour le traitement des maux d'estomac et la diarrhée¹⁰.

Jusqu'à la découverte des antibiotiques, *Salvia* est une composante fréquente de mélanges de thé à base de plantes, recommandé aux patients atteints de tuberculose afin d'éviter une sédation et un ingrédient actif dans la préparation végétale combinée pour le traitement de la bronchite chronique.

Généralement, les plantes de ce genre sont connus pour leurs nombreuses activité - biologique, comme antibactérien, antioxydant, antitumorale, antidiabétiques, antimicrobien, anxiolytique, sédatif et anti-inflammatoires¹¹⁻¹⁵.

L'usage et propriétés de quelques plantes du genre *Salvia* sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 1 : Usages et propriétés de quelques espèces du genre *Salvia*.

Plantes	Usages et Propriétés	Référence
<i>S. officinalis</i>	Traitement de l'eczéma et la tuberculose.	16
<i>S. cavaleriei</i>	traitement de la dysenterie, les furoncles et les blessures dues aux chutes.	17
<i>S. desolera</i>	traitement de règles, les maladies digestives et du système nerveux central.	18
<i>S. bucharica</i>	Dans la médecine traditionnelle pour le traitement des troubles hépatiques.	18
<i>S. fruticosa</i>	Pour soigner les rhumes et les maux d'estomac.	19
<i>S. palaestina</i>	Effets anti-prolifératifs modérés contre certains types des cellules tumorales.	20
<i>S. verbenaca</i>	La plante est utilisée comme bactéricide contre les affections respiratoires, la cicatrisation des plaies et d'ulcères et surtout comme collyre.	21

II.3. Travaux antérieurs sur les métabolites secondaires du genre *Salvia*

II.3.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des substances naturelles caractéristiques du métabolisme secondaire, ils correspondent à une large série de structures chimiques qui ont tous en commun, la présence d'un ou de plusieurs cycle benzénique portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

Les polyphénols présentent une structure très variée. Il existe des molécules de structure simple, de forme phénolique avec un cycle benzénique sur lequel sont fixés des groupements hydroxyles : les acides coumarique, caféique, férulique, cinnapique. Il existe également des composés plus complexes qui sont les flavonoïdes et les anthocyanes.

Leur structure est toujours constituée de cycles benzéniques plus ou moins substitués par des groupements OH.

Généralement, les principaux composés phénoliques ne se trouvent pas à l'état libre mais sous forme d'esters ou d'hétérosides.

II.3.1.a. Les acides phénoliques

II.3.1.a.1. Définition

Les composés phénoliques sont dérivés de deux sous-groupes distingués : Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogénique, et les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique.

Ils sont considérés comme substances photochimiques avec des effets prebiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est très faible car ils sont considérés non toxiques²².

Les mieux caractérisés pharmacologiquement, sont l'acide caféique et l'acide férulique qui montrent l'effet anticancéreux au niveau des poumons chez les souris, alors que l'acide gallique agit par le même effet en prévenant le déclenchement du cancer oesophagien chez les rats²³.

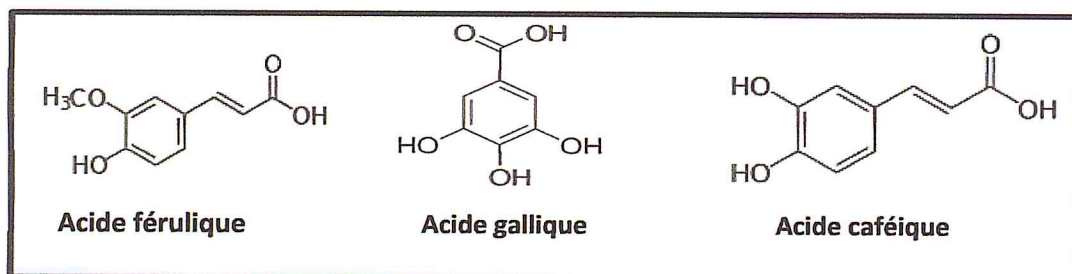


Figure 1 : structure de quelques acides phénoliques.

II.3.1.a.2. Les acides phénoliques isolés du genre *Salvia*

Les acides phénoliques polaires constituent la majeure partie des composants du *Salvia* soluble dans l'eau.

La plupart des acides phénoliques identifiés à ce jour sont celles du Danshen chinois, *S. miltiorrhiza*, *S. chinensis* et *S. yunnanensis*. Les composés uniques à *Salvia* sont par conséquent désignés les acides salvianolique A-K ou acides yunnaneique A-H. A part quelques acides benzoïques simples tels que le 4-hydroxybenzoïque²⁴, le 3,4-dihydroxybenzoïque ou l'acide protocatéchuic²⁵, 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque ou l'acide vanillique²⁶ et de 2,4-diméthoxybenzoïque²⁷, deux coumarines 6,7-dihydroxycoumarine (Esculétine)²⁸ et 7-méthoxycoumarine (herniarine)²⁹, la majorité des acides phénoliques présents dans les espèces *Salvia* sont exclusivement ceux de dérivés de l'acide caféique, qui sont uniques à *Salvia* sauf pour l'acide rosmarinique et de l'acide lithospermiq.

Tableau 2 : Distribution des Acides phénoliques dans le genre *Salvia*.

Acides phénoliques isolés	Espèce	Référence
Acide 4-hydroxybenzoïque	<i>S. officinalis</i>	24
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (acide protocatechuic)	<i>S. sonchifolia</i>	25
3-Méthoxy-4-hydroxybenzoïque (acide vanillique)	<i>S. officinalis</i>	26
6,7-Dihydroxycoumarine (esculétine)	<i>S. euphratica</i>	28
7-Méthoxycoumarine (herniarine)	<i>S. aegyptiaca</i>	29
Acide caféique	<i>S. bowleyana</i>	30
	<i>S. calycina</i>	32
	<i>S. horminum</i>	33
	<i>S. limbata</i>	34
	<i>S. officinalis</i>	24
	<i>S. plebeia</i>	35
	<i>S. sonchifolia</i>	25
	<i>S. triloba</i>	32
Acide férulique	<i>S. officinalis</i>	26
Acide chlorogénique	<i>S. albimaculata</i>	30
	<i>S. horminum</i>	33
	<i>S. triloba</i>	32
Acide rosmarinique	<i>S. bowleyana</i>	31
	<i>S. flava</i>	38
	<i>S. miltiorrhiza</i>	39
	<i>S. officinalis</i>	26
	<i>S. sonchifolia</i>	25
Rosmarinate de méthyle	<i>S. bowleyana</i>	31
	<i>S. sonchifolia</i>	25
Acide salvianolique A	<i>S. flava</i>	38
	<i>S. miltiorrhiza</i>	44

Acide salvianolique B	<i>S. bowleyana</i>	31
	<i>S. flava</i>	38
	<i>S. miltiorrhiza</i>	39
	<i>S. sonchifolia</i>	25
Acide salvianolique C	<i>S. bowleyana</i>	31
	<i>S. miltiorrhiza</i>	39
Acide salvianolique F	<i>S. miltiorrhiza</i>	42
Acide salvianolique G	<i>S. miltiorrhiza</i>	41
Acide salvianolique J	<i>S. flava</i>	38
Acide salvianolique K	<i>S. deserta</i>	43
Acide Salvianolique L	<i>S. officinalis</i>	45
l'acide p coumarique 4- (2-Apiosyl) glucoside	<i>S. officinalis</i>	46
6-féruloyl- α -glucose	<i>S. officinalis</i>	40
4-hydroxyacétophénone 4-glucoside (picein)	<i>S. officinalis</i>	40

II.3.1.b. Les flavonoïdes

II.3.1.b. 1. Généralité sur les flavonoïdes

❖ Définition et classification

Les flavonoïdes ou bioflavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes. Ils font partie de la famille des Polyphénols.

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des végétaux (fruits, fleurs) et représentent une source très importante d'antioxydants dans notre alimentation. Il y en plus de 6000 molécules à avoir été décrits chez les plantes.

Les flavonoïdes partageant tous une même structure de base à 15 atomes de carbone ; deux cycles benzéniques C6 (A, B) reliés par une chaîne C3 : C6-C3-C6. La chaîne en C3 est souvent fermée en un hétérocycle oxygéné (cycle C) (figure 1).

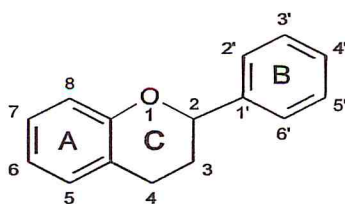


Figure 2 : 2-phénylchromane.

La distinction des sous-classes fait sur la conformation du cycle (C).

❖ **Biosynthèse**

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate-coenzyme A synthétisé à partir de la phénylalanine. La voie biosynthétique de ces Polyphénols est présentée dans la figure 2.

Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydroxylase, flavonoïde 3', 5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoid glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation⁴⁷.

❖ **Enzymes** : AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomérase, CHS : chalcone synthase, DFR : Dihydroflavonol 4-réductase, FHT : Flavanone 3-hydroxylase, FLS : flavanol synthase, FNSI/FNSII : Flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucoanthocyanidine dioxygenase, LCR : leucoanthocyanidine réductase.

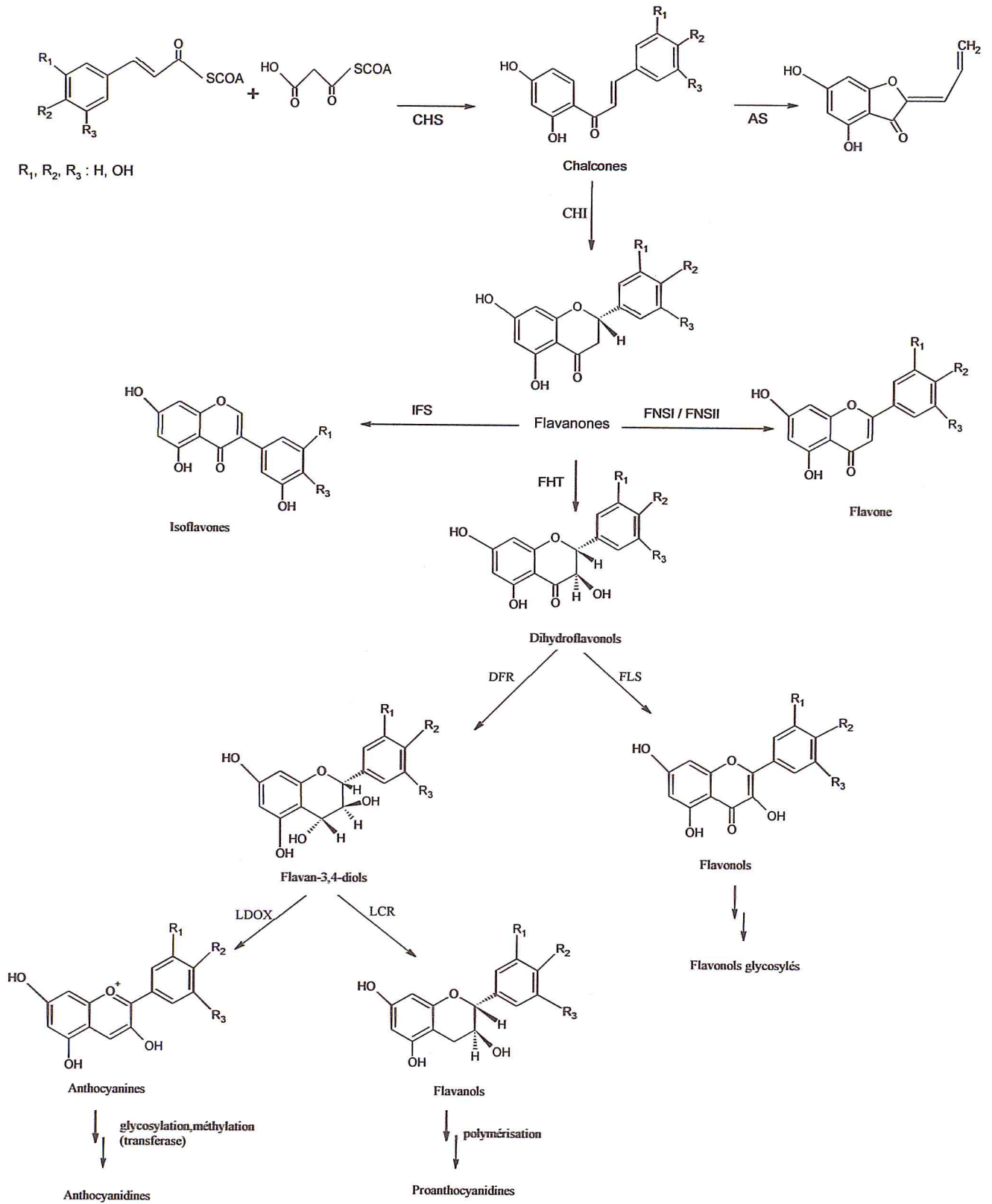


Figure 3 : voies de biosynthèse des flavonoïdes.

II.3.1.b.2. Les flavonoïdes isolés du genre *Salvia*

Les flavonoïdes sont largement distribués dans le genre du *Salvia*^{28,48-50}, étant principalement présents sous forme de flavones, flavonols et leurs glycosides. Les Flavones 6-hydroxylés ont été signalés à être particulièrement taxonomique de ce genre⁵¹.

❖ Flavones et flavonols aglycones

La majorité des flavonoïdes sont flavones de l'apigénine (5, 7, 4' Trihydroxyflavone) et la Lutéoline (5, 7, 3',4'- tétrahydroxyflavone) et leur dérivés hydroxylés.

Les éthers méthyliques de flavones sont largement distribués dans les feuilles de *Salvia* ou dans les exsudats de parties aériennes^{52, 53}.

Tableau 3 : Distribution des Flavonoïdes aglycones dans le genre *Salvia*.

Flavonoïdes aglycones	Espèce	Référence
5,7,4'-Trihydroxyflavone (apigénine)	<i>S. aegyptiaca</i>	29
	<i>S. albimaculata</i>	30
	<i>S. horminum</i>	33
	<i>S. kopolnovii</i>	48
	<i>S. limbata</i>	34
	<i>S. nemorosa</i>	48
	<i>S. officinalis</i>	26
	<i>S. pedicellata</i>	28
	<i>S. sclarea</i>	48
5,4'-Dihydroxy 7-méthoxyflavone (genkwanine)	<i>S. verbenaca</i>	54
	<i>S. dorrii</i>	53
	<i>S. microsiphon</i>	53
	<i>S. stenophylla</i>	53
5-Hydroxy 7,4'-diméthoxyflavone	<i>S. officinalis</i>	26
	<i>S. verbenaca</i>	54
	<i>S. dorrii</i>	53
	<i>S. hypoleuca</i>	53
	<i>S. macrosiphon</i>	53
5,7,3',4'-Tétrahydroxyflavone (Lutéoline)	<i>S. officinalis</i>	26
	<i>S. verbenaca</i>	54
	<i>S. aegyptiaca</i>	29
	<i>S. albimaculata</i>	30
	<i>S. dorrii</i>	53
	<i>S. horminum</i>	33
	<i>S. hypoleuca</i>	53
	<i>S. limbata</i>	34
	<i>S. pedicellata</i>	28
<i>S. stenophylla</i>	53	
5,3',4'-Trihydroxy 7-méthoxyflavone	<i>S. verbenaca</i>	54
	<i>S. euphratica</i>	28
	<i>S. hypoleuca</i>	53

5,7,4'-Trihydroxy 3'-méthoxyflavone (chrysoeriol)	<i>S. candidissima</i> <i>S. dorrii</i> <i>S. mirzayana</i>	27 53 53
5,7,3'-Trihydroxy 4'-méthoxyflavone (diosmétine)	<i>S. candidissima</i>	27
5-Hydroxy 7,3',4'-triméthoxyflavone	<i>S. euphratica</i>	28
6-Hydroxyapigénine (scutellarein)	<i>S. officinalis</i>	26
5,4'-Dihydroxy 6,7-diméthoxyflavone (cirsimaritine)	<i>S. columbariae</i> <i>S. dorrii</i> <i>S. macrosiphon</i> <i>S. mirzayana</i> <i>S. officinalis</i>	53 53 53 53 26
5,7-Dihydroxy 6,4'-diméthoxyflavone (pectolinarigenin)	<i>S. hypoleuca</i> <i>S. pedicellata</i>	53 28
5,6-Dihydroxy 7,4'-diméthoxyflavone	<i>S. hypoleuca</i> <i>S. stenophylla</i>	53 53
5,6,7,4'-Tetraméthoxyflavone	<i>S. officinalis</i>	58
5,3',4'Trihydroxy 6,7-diméthoxyflavone (cirsiliol)	<i>S. columbariae</i> <i>S. dorrii</i> <i>S. guranitica</i> <i>S. hypoleuca</i> <i>S. macrosiphon</i> <i>S. stenophylla</i> <i>S. verbenaca</i>	53 53 59 53 53 53 60
5-Hydroxy 6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone	<i>S. lavanduloides</i> <i>S. macrosiphon</i> <i>S. mirzayana</i>	61 53 53
8-Hydroxyapigénine (isoscutellarein)	<i>S. officinalis</i>	26
5,8,4'-Trihydroxy 7-méthoxyflavone (salvitin)	<i>S. plebeia</i>	62
5,7,3'-Trihydroxy-4'-méthoxyflavanone (hesperetin)	<i>S. officinalis</i>	26
5,3'-Dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone	<i>S. miltiorrhiza</i>	63
5,7,4'-Trihydroxyflavonol (kaempférol)	<i>S. dorri</i>	53
5,7,3',4'-Tétrahydroxyflavonol (quercétine)	<i>S. dorrii</i>	53
5,7,3',4'-Tétrahydroxy 3-méthoxyflavone	<i>S. compressa</i>	53

	<i>S. pedicellata</i>	28
5,7,4'-Trihydroxy 3,3'-diméthoxyflavone	<i>S. pedicellata</i>	28
5,7-Dihydroxy 3, 6,4'-triméthoxyflavone (santin)	<i>S. pedicellata</i>	28
3,7,4'-Tihydroxy 5,6-diméthoxyflavone	<i>S. columbariae</i>	53

❖ Flavones et flavonols glycosides

Flavone O-glycosides sont apparemment courante dans *Salvia* et la plupart d'entre eux sont flavone7-glycosides représentés par apigénine 7-glucoside (cosmosiine), la Lutéoline 7-glucoside(Cinaroside) et leurs 7-glucuronides correspondant. Il y a plusieurs apigénine glycosylée avec deux ou plusieurs sucres, et parmi ceux-ci sont apigénine l'apigénine 7-Cellobioside⁶⁴, l'apigénine 7-rutinoside³³ et apigénine7-cellobioside-4'-glucoside¹¹⁹.

Tableau 4 : Distribution des Flavonoïdes glycosides dans le genre *Salvia*.

Flavonoïdes glycosides isolés	Espèce	Référence
Apigénine-7-glucoside (cosmosiine)	<i>S. aegyptiaca</i>	29
	<i>S. albimaculata</i>	30
	<i>S. calycina</i>	32
	<i>S. horminum</i>	33
	<i>S. limbata</i>	34
	<i>S. officinalis</i>	65
Apigénine 7-Xyloside	<i>S. spp. (3)</i>	49
Apigénine 7-Cellobioside	<i>S. uliginosa</i>	64
Apigénine 7-Rutinoside	<i>S. horminum</i>	33
Apigénine 7-Cellobioside-4'-glucoside	<i>S. uliginosa</i>	64
Lutéoline-7-glucoside (cinaroside)	<i>S. aegyptiaca</i>	29
	<i>S. albimaculata</i>	30
	<i>S. calycina</i>	32
	<i>S. euphratica</i>	28
	<i>S. horminum</i>	33
	<i>S. limbata</i>	34
	<i>S. triloba</i>	32
Lutéoline 7-Rutinoside	<i>S. horminum</i>	33
6-Hydroxyapigénine-6-méthoxy-7-glucoside (homoplantagenin)	<i>S. officinalis</i>	26
6-Hydroxylutéoline-7-glucoside (123)	<i>S. officinalis</i>	46
6-hydroxylutéolin 6,7-Diméthoxy-5-glucoside	<i>S. verbenaca</i>	60
Kaempférol-3-glucoside (astragalin) (134)	<i>S. cavaleriei</i>	66
Quercétine 3-Glucoside (isoquercitrin) (137)	<i>S. cavaleriei</i>	66

❖ Les Anthocyanines

Les anthocyanes sont particulièrement abondants dans les fleurs rouges ou pourpres du *Salvia*¹⁷. Les anthocyanes du *Salvia* ont d'abord été étudiés par Willstätter et Bolton⁶⁹ et le pigment appelé salvianin a été identifié comme pélargonidine 3-(6-caféoylglucoside)-5-(4,6-dimalonylglucoside)⁷⁰.

Tableau 5 : Distribution des Anthocyanines dans le genre *Salvia*.

Anthocyanines isolés	Espèce	Référence
Pélargonidine-3-(6-caféoylglucoside)-5-(4,6-dimalonylglucoside) (salvianin)	<i>S. splendens</i>	70
Pélargonidine-3-(6-Cafféoylglucoside)-5-(6-malonylglucoside)	<i>S. splendens</i>	70
Pélargonidine-3-(6-Cafféoylglucoside)-5-glucoside	<i>S. splendens</i>	67-70
Pélargonidine-3-(6-p-Coumaroylglucoside)-5-glucoside	<i>S. splendens</i>	67
Cyanidin-3-(6-Cafféoylglucoside)-5-glucoside	<i>S. coccinea</i>	67
Cyanidin 3-(6-p-Coumaroylglucoside)-5-glucoside	<i>S. horminum</i>	68
Delphinidin-3-(6-caféoylglucoside)-5-(4,6-dimalonylglucoside) (salviadelphin)	<i>S. splendens</i>	70
Delphinidin-3-(6-Cafféoylglucoside)-5-glucoside	<i>S. splendens</i>	67
Delphinidin-3-(6-p-Coumaroylglucoside)-5-(6-malonylglucoside)	<i>S. farinacea</i> <i>S. uliginosa</i>	70 71

II.3.2. Les Terpénoïdes

II.3.2.1. Définition

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale. Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux⁷³. L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation⁷².

II.3.2.2. Structure des Terpénoïdes

Les terpènes sont des composés hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. Leur formule brute est $(C_5H_8)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (de 1 à 8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base des Terpénoïdes est l'isoprène de formule C_5H_8 . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.)⁷²⁻⁷³.

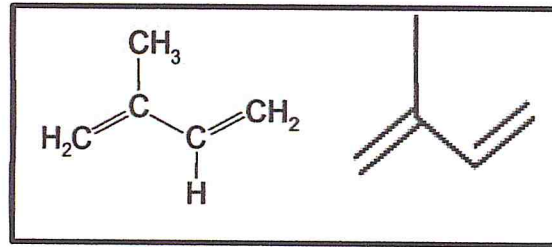


Figure 4 : structure d'isoprène.

II.3.2.3. Classification des Terpénoïdes

La classification des Terpénoïdes est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène en donnant des hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes.

II.3.2.4. Les Terpénoïdes isolés du genre *Salvia*

II.3.2.4.a. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones, ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures comme le β -Cadinène, ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des Plantes. Ils peuvent être acycliques, monocyclique, bicycliques, tricyclique ou polycyclique^{72,74}. Les terpènes de type sesquiterpènes et lactones sesquiterpéniques sont très connus pour leurs activités biologiques, ces dernières étaient appelées « principes amers ». Elles ne sont pas volatiles et leur structure casse à des températures élevées. On dénombre plus de 3000 structures différentes, et on les trouve principalement chez les Asteraceae au niveau des poils sécréteurs pluricellulaires des feuilles, bractées et inflorescences.

Tableau 6 : Distribution des Sesquiterpène dans le genre *Salvia*.

sesquiterpènes isolés	Espèce	Référence
Spathulenol	<i>S. candidissima</i>	27
	<i>S. cyanescens</i>	82
	<i>S. limbata</i>	77
	<i>S. yosgadensis</i>	81
	<i>S. sclarea</i>	79
l'oxyde de caryophyllène	<i>S. cyanescens</i>	82
	<i>S. sclarea</i>	82
Salvinine	<i>S. divaricata</i>	76

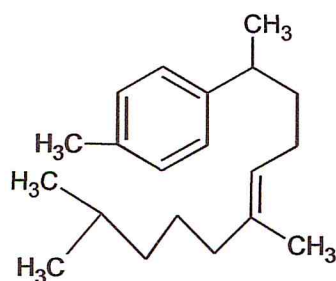
1 β -Acetoxy-8 β -hydroxyeudesm-4(15), 7(11)-dien-8 α , 12-olide	<i>S. potentillifolia</i> <i>S. yosgadensis</i>	78 81
Lédol	<i>S. tchihatcheffii</i>	80
1 β -acetoxyeudesm-4(15), 7-dien-8 α ,12-olide, Istanbulin D	<i>S. yosgadensis</i>	81

II.3.2.4.b. Diterpènes

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (C₂₀) élaborées à partir de 4 unités d'isoprène ; ils se forment à partir de leur précurseur, le géranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP). Sont très répandus chez les végétaux supérieurs, ils sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins. On peut les trouver encore dans les résines, les exsudats, les gommes naturelles et les gibbérellines⁷⁵. Ils peuvent être acycliques comme le phytol ; dont il est le représentant le plus connu de la chlorophylle et des vitamines K et E, cependant après divers réarrangements, ils peuvent être monocycliques comme la vitamine A, bicycliques comme le sclaréol ou tricycliques comme l'acide abiétique.

Plus de 535 diterpènes appartenant aux 142 espèces du genre *Salvia* ont été répertoriés, ils sont répartis dans différents types, catégories et groupes.

A notre connaissance un seul diterpène monocyclique, le 2,6-diméthyl-10-(ptolyl) undeca-2,6-(E)-diène (1) a été isolé de l'espèce *Salvia dorisiana*, il est caractérisé par un cycle aromatique et une longue chaîne latérale⁸³.

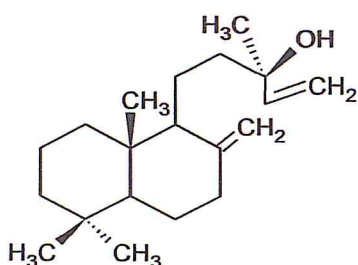


(1) 2,6-diméthyl-10-(ptolyl) undeca-2,6-(E)-diène

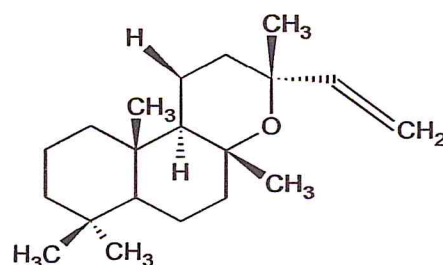
Les diterpènes bicycliques sont constitués de 4 types:

- Les labdanes

Exemple : Manool (2)⁸⁴ et Manoyloxide (3)⁸⁵ ont été isolés de l'espèce *Salvia candidissima*.



(2) Manool

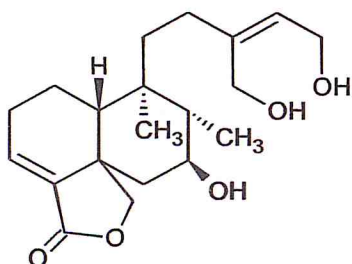


(3) Manoyloxide

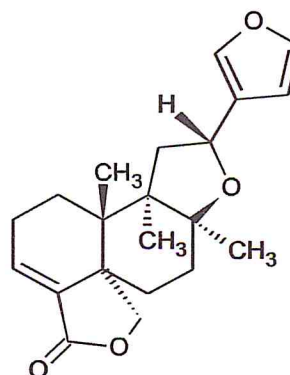
- Les clérodanes et les néo-clérodanes

Exemple : - Portulide (4) a été isolé de l'espèce *Salvia melissodora*⁸⁶.

- Dehydrokerline (5) a été isolé de l'espèce *Salvia polystachya*⁸⁷.



(4) Portulide C

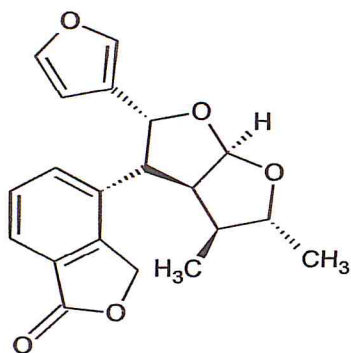


(5) Dehydrokerline

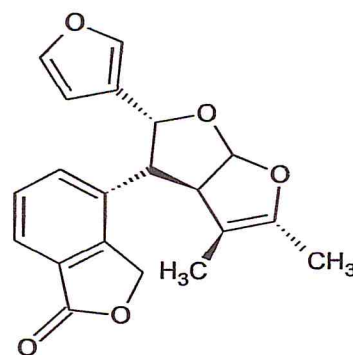
- Les séco-clérodanes

Exemple : - Rhyacophilline (6) a été isolé de l'espèce *Salvia rhyacophylla*⁸⁸.

- 7,8-didehydroxyrhyacophilline (7) a été isolé de l'espèce *Salvia reflexa*⁸⁹.



(6) Rhyacophilline

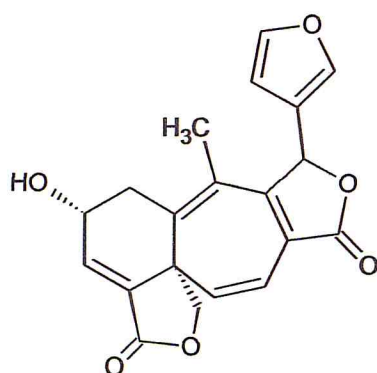


(7) 7,8-Didehydrorhyacophilline

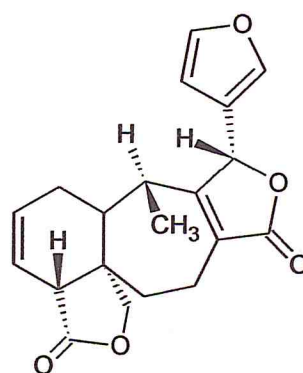
- Les clérodanes arrangés

Exemple : - Salvianduline (8) a été isolé de l'espèce *Salvia leucantha*⁹⁰.

- Blephanolide (9) a été isolé de l'espèce *Salvia blepharophylla*⁹¹.



(8) Salvianduline E



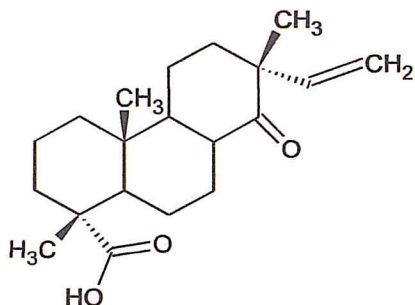
(9) Blephanolide B

L'étude bibliographique de ce genre a montré qu'il existe 4 types de diterpènes tricycliques à savoir: les pimaranes, les abiétanes, les cassanes et les kauranes. Il faut noter que les abiétanes sont les plus abondants.

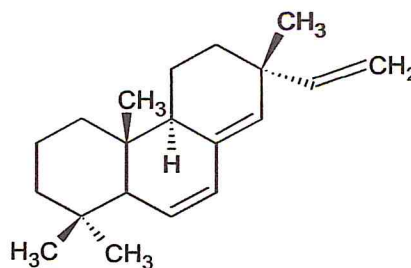
- Les pimaranes

Exemple : - Acide 14-oxopimarique (10) a été isolé de l'espèce *Salvia candidissima*⁹².

- Isopimara-6,8(14) 15-triène (11) a été isolé de l'espèce *Salvia parryi*⁹³.



(10) Acide 14-oxopimarique

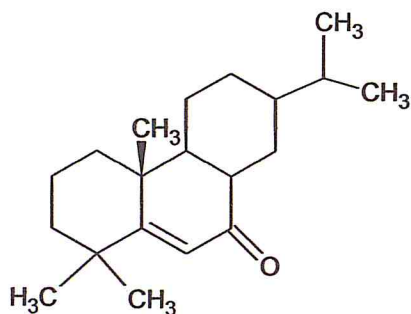


(11) Isopimara-6,8(14),15-triène

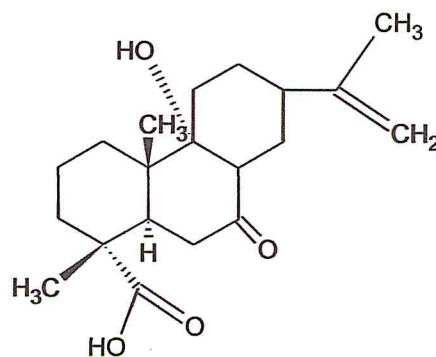
- Les abiétanes

Exemple : - Pachystazone (12) a été isolé de l'espèce *Salvia candidissima*⁹⁴.

- Acide wiedemannique (13) a été isolé de l'espèce *Salvia heldrichiana*⁹⁵.



(12) Pachystazone

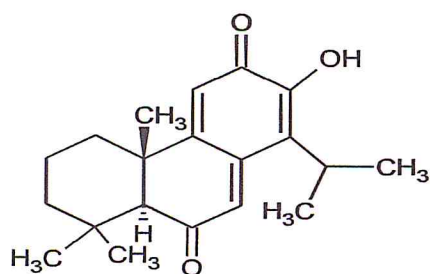


(13) Acide weidemannique

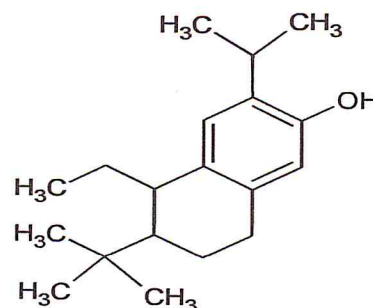
- Les cassanes

Exemple : - Mattenoquinone (14) a été isolé de l'espèce *Salvia melissodora*⁹⁶.

- Sempervirole (15) a été isolé de l'espèce *Salvia multicaulis*⁹⁷.

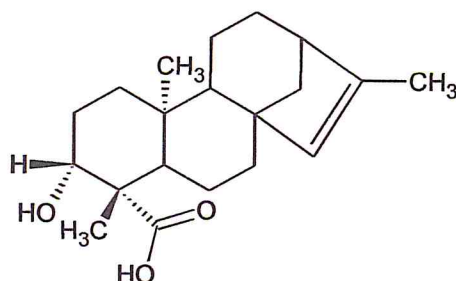


(14) Mattenoquinone



(15) Sempervirole

- A notre connaissance, il y a seul diterpène tétracyclique de ce type, Le Verbénacine kauranes (16), isolé récemment de *Salvia verbenaca*⁹⁸.



(16) Verbénacine

II.3.2.4.c. Sesterterpènes

Les Sesterterpènes sont composé de la condensation de 5 unités isopréniques.

Trois Sesterterpènes « Acide 8a, 13,14-thréo-trihydroxy-Labd-15,17-dien-16,19-olide -23 oïque »; « Acide 8a, 13,14-erythro-trihydroxy-Labd-15,17-dien-16,19-olide-28-oïque » et « 3a, 8a, 13,14-erythro-tétrahydroxy-labd-15,17-dien-16,19-olide » ont été isolés à partir des parties aériennes de *Salvia palaestina Benth*⁹⁹.

II.3.2.4.d. Triterpènes

Les triterpènes sont des molécules à 30 atomes de carbone. Ils ont comme précurseur le squalène (figure 5). Ex : Le lanostérol qui est ensuite transformé en cholestérol, le précurseur des stéroïdes. Il y a plus de 1700 triterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme tétracyclique ou pentacyclique, la forme acyclique étant très rare. La plupart de Triterpènes sont des alcools, sous forme libre ou glycoside (les saponines) ou ester.

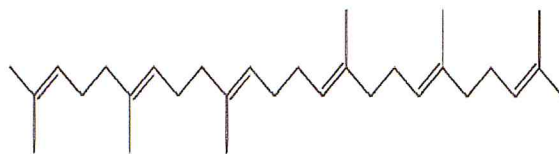


Figure 5 : structure du squalène.

Trois triterpènes dont « 2-acetoxylupeol » et « lupin-2,3-diol » ont été isolés à partir du *Salvia leriifolia*¹⁰⁰ et « Acide 2a, 3a, 16a-trihydroxy-24-nor-4 (23), 12-oleandien-28-oïque » a été isolés à partir des parties aériennes de *Salvia palaestina Benth*⁹⁹.

II.4. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles du genre *Salvia*

II.4.1. Généralité sur les huiles essentielles

II.4.1.1. Introduction

Depuis des milliers d'années, les huiles essentielles sont utilisées en cuisine, en médecine, en parfumerie, etc... La thérapie par les huiles essentielles a connu un développement progressif à travers les civilisations arabe, égyptienne, grecques, etc...^{101,102}. Les huiles essentielles et les arômes extraits à partir des herbes aromatiques et d'épices sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles¹⁰³.

Selon les normes internationales, les huiles essentielles doivent être liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, sassafras et vétiver), volatiles, insolubles dans l'eau, et solubles dans les huiles végétales, dans l'éther et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage, peu polaires¹⁰⁴.

II.4.1.2. Lieux de biosynthèse et d'accumulation

Les huiles essentielles sont retrouvées dans tous les organes de la plante racine, feuille, fleur, exclusivement chez les spermatophytes : familles des Conifères, Lamiacées, Myrtacées, Apiacées, Lauracées, Rutacées et Astéracées. Elles sont localisées dans le cytoplasme de certaines cellules végétales sécrétrices spécialisées, qui se situent dans un ou plusieurs organes de la plante¹⁰⁵.

II.4.1.3. Rôle écologique

Les composés organiques volatils des huiles essentielles permettent à la plante de communiquer avec les plantes voisines et également entre ses propres organes. Ils lui servent également de moyen de défense¹⁰⁶.

II.4.1.4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

- Les HE sont généralement des liquides.
- La coloration varie de l'incolore au brun clair.
- La densité est en général inférieure à celle de l'eau (de 0,850 à 0,950).
- Leur point d'ébullition varie de 160° à 240° C.
- Les huiles essentielles sont solubles dans les graisses et les solvants apolaires¹⁰⁷.
- Elles sont neutres au tournesol, mais elles s'oxydent à la lumière.
- Elles absorbent le chlore, l'iode avec dégagement de chaleur. Elles peuvent se combiner à l'eau pour former les hydrates¹⁰⁷.

II.4.1.5. Intérêts des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs huiles essentielles ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries¹⁰⁸. Les huiles essentielles sont également utilisées par massage, inhalation ou ingestion. Des écrits divers sur l'utilisation des huiles essentielles ont vu le jour, l'essence de rose a été la plus utilisée à travers les siècles, dans les civilisations grecque, macédonienne, perse, égyptienne, etc.... Elle a été employée dans les infections des yeux et des oreilles, les gingivites, les hémorroïdes et pour arrêter la transpiration¹⁰⁹.

En plus de leurs utilisations thérapeutiques, les huiles essentielles sont appliquées en cosmétiques (aromatisation des savons, parfumerie, etc...)¹⁰².

II.4.2. Les huiles essentielles isolé du genre *Salvia*

Les huiles essentielles du genre *Salvia* ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Nous avons classé les composants majoritaires d'huiles essentielles (% \geq 5.0) rapportées dans le tableau suivant (tableaux 7).

Tableau 7 : Composants majoritaires ($\% \geq 5.0$) d'huiles essentielles des espèces du genre *Salvia*.

Espèce	Localité	Composés majoritaires	pourcentage % de composé	Référence
<i>S. rubifolia</i>	Liban	- α -Pinène - α -Thujone -trans-Pinocarvylacétate - γ -Muuroène - γ -Cadinène	7.1 5.1 5.5 11.8 5.5	110
<i>S. aucherisubsp aucheri</i>	Turquie	- α -Pinène -Camphène - β -Pinène -1,8-cinéole -Camphre	7.6 7.3 6.1 39.2 20.7	111
<i>S. aramiensis</i>	Turquie	- β -Pinène -1,8-cinéole -Camphre	10.2 55.6 5.7	111
<i>S. fruticosa</i>	Turquie	- α -Pinène -1,8-cinéole -Camphre	5.8 52.8 5.8	111
<i>S. verticillatubsp amasiaca</i>	Turquie	- β -Pinène -1,8-cinéole - α -Copaène -Alloaromadendrène	21.4 16.1 5.4 5.1	111
<i>S. heldreichiana</i>	Turquie	- α -Pinène -1,8-cinéole -Linalool -Cryptone -Bornéol	5.6 5.6 9.4 5.3 5.9	112
<i>S. cryptantha</i>	Turquie	-1,8-cinéole -Camphre -Bornéol -Viridiflorol	16.4 19.1 11.9 11.5	112
<i>S. aurea</i>	Liban	-Aromadendrène - α -Amorphène -Oxide Caryophyllène -Elemenonee -Aristolone	10.7 12 12.5 6.0 11.4	113
<i>S. judaica</i>	Liban	- α -Copaène -Oxide Caryophyllène -Acide tétradécanoïque	8.7 12.8 5.8	113
<i>S. viscosa</i>	Liban	-Thymol - α -Cubébène -Oxide Caryophyllène - β -Copaèn-4- α -ol	6.9 8.3 12.7 5.4	113
<i>S. sclareoides</i>	Iran	-Bêta-trans-ocimène	11.83	

		-Linalool -Trans-Caryophyllène -Germacrène-D	27.60 16.58 9.98	114
<i>S. dichroantha</i>	Turquie	-Oxide Caryophyllene -Caryophyllenol II (=Caryophylla-2(12),6 dien-5b-ol) -Phytol	22.4 5.5 5.6	115
<i>S. wiedemanni.</i>	Turquie	-a-Pinène -b-Pinène -1,8-Cinéole -p-Cymène -Camphre	36.2 13.3 14.2 5.4 7.4	115
<i>S. verticillata</i>	Turquie	-β-Copaène -β-Caryophyllène -Germacrène D -Acid Hexadécanoïque	5.7 7.6 36.6 6.7	115
<i>S. multicaulis Vahl</i>	Iran	-1,8-Cinéole -α-Pinène -β-Caryophyllène -Bornéol	21.0 16.5 8.9 8.3	116
<i>S. verticillata L</i>	Iran	-β-Caryophyllène -Germacrène D -Limonène -α-Pinène -α-Humulène	31.5 16.2 15.5 10.4 9.4	116
<i>S. sclarea L</i>	Iran	-Sclaréol -Germacrène D -Linalool -α-Terpinéol -Géranol	11 9.8 9.0 7.4 4.8	116
<i>S. officinalis</i>	Batna, (Algérie)	-α- Thujone -1,8- Cinéole -β-Thujone -Camphre -Viridiflorol	24.52 15.92 6.50 16.86 6.35	117
<i>S. verbenaca</i>	Sude de l'Italie	-Benzaldehyde -β-Phellandrène -Acide Hexadécanoïque -Acide (Z)-9- Octadecenoïque	7.3 5.9 23.1 11.1	118
	Sablet ben Ammar, (Tunisie)	-a-Terpinéol -Méthyle eugenol -β-Caryophyllène -Viridiflorol -Camphène	5.3 9.4 7.1 21.6 17.6	119
	Somaa, (Tunisie)	-Nonane -Tricyclène -Méthyle eugenol -Térpinolène	10.3 18.8 7.7 7.3	119

	Sers, (Tunisie)	- β -Phellandrène -Méthyle eugenol - α -pinène -(Z)- β -Ocimène -b-Thujone	8.2 5.1 5.5 29.5 7.9	119
<i>S. palaestina</i>	Jordanie	- α -Copaène - β -Cubébène -Germacrène D - δ -Cadinène -Nonadécane	18.58 8.75 26.02 7.58 5.23	120
	Liban	-Linalool - β -Caryophyllène -Germacrène D	8.6 16.6 7.2	120
	Iran	- β -Caryophyllène -Germacrène D -1-Epi-cubinol	6.1 14.0 9.8	120
	Turquie	- β -Caryophyllène -Germacrène D -Bicyclogermacrène -Spathulénol	31.6 20.9 10.8 9.5	120
<i>S. Tomentosa</i>	Bulgarie	- α -Pinène -Camphre -Bornéol - β -Pinène	6.0 7.9 10.3 9.0	121
	Turquie	- α -Pinène -1,8-cinéole -Camphre -Bornéol	25.1 7.0 14.9 13.2	111

III. Aperçu bibliographique sur l'espèce *Salvia microphylla*

III.1. Classification dans la systématique botanique

Le nom générique *Salvia* est un emprunt au latin « *salvia* » désignant diverses sauges¹²² chez Pline, terme dérivant lui-même de *saluus* « plante donnant la santé ». L'épithète spécifique « *microphylla* » signifie en grec « petites feuilles ». Au Mexique, il est appelé « mirto de montes », ou « myrte des montagnes ».

Règne :	Plantae
Embrenchement :	Spermatophytes
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae
Genre :	<i>Salvia</i>
Espèce :	<i>Salvia microphylla</i>

Noms vernaculaires :

En Français: La sauge de Graham

En Arabe: Mrimiya, « المريمية »

Noms scientifiques: *Salvia microphylla*

Synonymes : *Salvia grahamii*

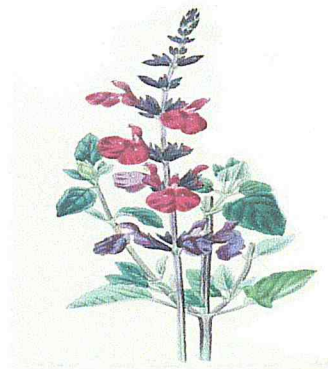


Figure 6 : *Salvia microphylla*.

III.2. Présentation botanique et répartition géographique

La Sauge de Graham ou Sauge à petites feuilles est une espèce de plante appartenant à la famille des Lamiacées. Elle pousse à l'état sauvage dans le sud de l'Arizona et les montagnes de l'Est, de l'Ouest et du Sud du Mexique. Cette espèce s'hybridant facilement, de nombreux hybrides et cultivars ont été introduits dans l'horticulture depuis les années 1990.

Salvia microphylla est originaire du sud des États-Unis et du Mexique. La plante est cultivée dans de nombreuses régions du monde. Elle est subspontanée en région méditerranéenne.

La sauge à petites feuilles est un arbrisseau de 1 m à 1,30 m de haut et de large, de port dressé. Toutes les parties sont fortement aromatiques. Les rameaux sont tétragones (à 4 angles) et pubescents.

Les feuilles opposées, de forme elliptique à ovale, sont portées par un pétiole de 1 à 1,5 cm de long. Le limbe de taille variable (en générale de longueur double du pétiole), aux marges crénelées, est vert foncé. À la moindre manipulation, les feuilles dégagent une forte odeur semblable à celle de la menthe et du cassis.

Les fleurs croissent en épis terminal, constitué d'une série de verticilles de fleurs, à l'extrémité des rameaux. Le calice est tubuleux, strié, hirsute, bilabié, la lèvre inférieure est bifide. La corolle est rouge pourpre à rose foncé (à l'état sauvage)¹²³ de longueur triple du calice, le tube est renflé. La lèvre inférieure, bilobée, s'étale largement ; la lèvre supérieure est petite, en forme de casque. La floraison s'étale de mai aux gelées.

III.3. Propriétés pharmacologiques de l'espèce *Salvia microphylla*

Salvia microphylla est communément utilisée en médecine populaire, dans les rituels de guérison au Mexique et en Amérique centrale¹²³. Une infusion de la plante en fleur est consommée durant toute la journée que dure le rituel.

En dehors de cette médecine populaire, l'usage le plus fréquent de *Salvia microphylla* est pour les maux d'estomac et les troubles gastro-intestinaux. L'infusion de la plante est prise pour arrêter la diarrhée parfois en association avec la grande camomille (*Tanacetum parthenium*).

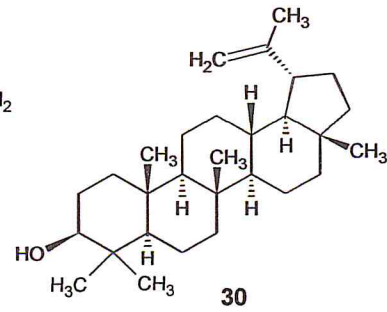
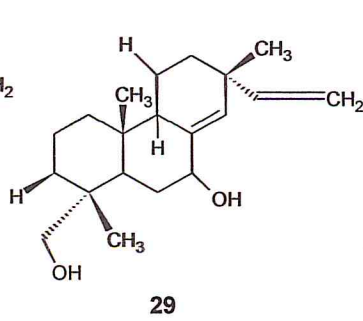
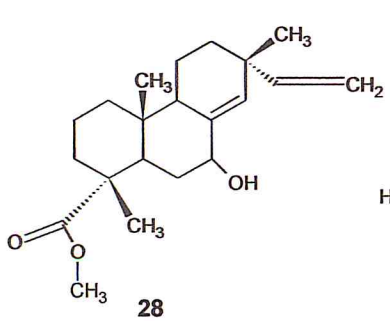
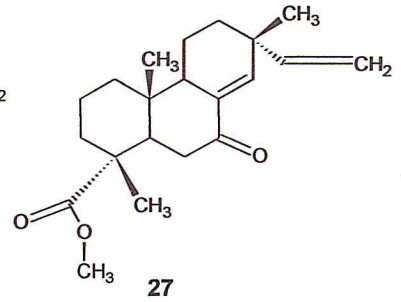
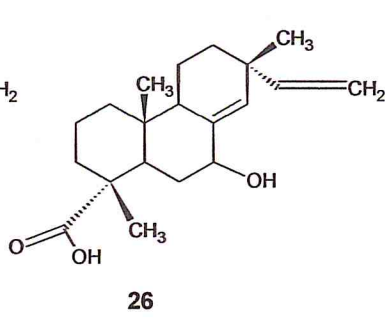
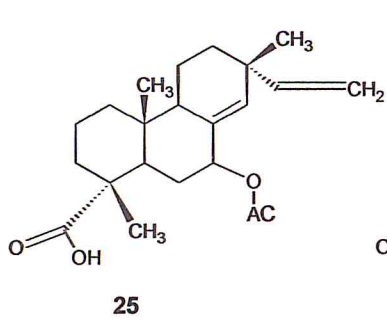
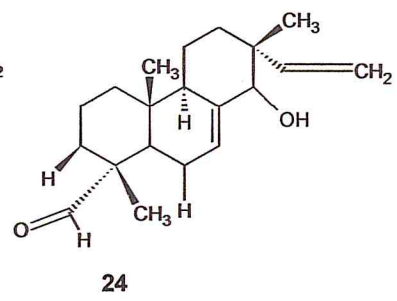
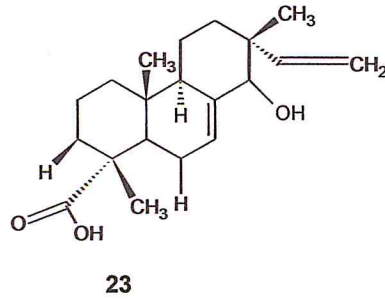
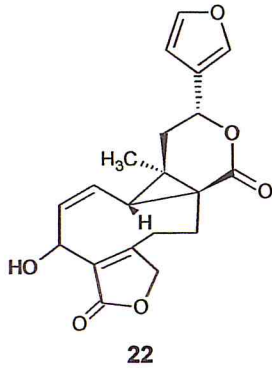
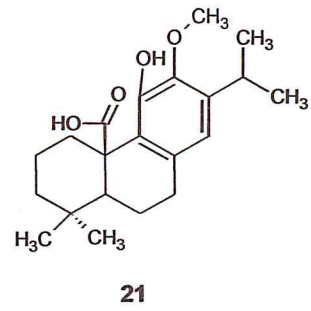
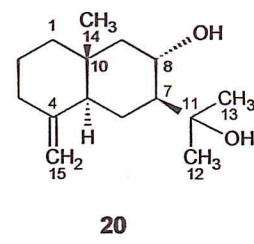
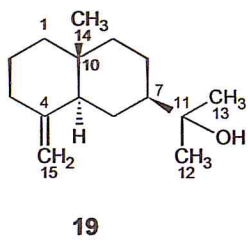
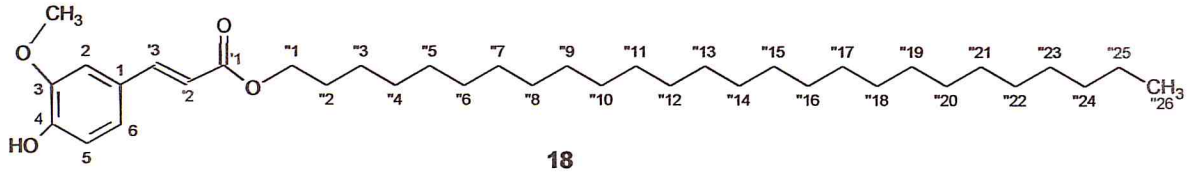
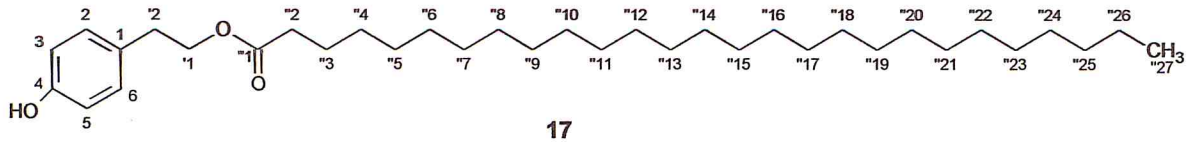
III.4. Travaux antérieurs sur les métabolites secondaires de l'espèce *Salvia microphylla*

Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce *Salvia microphylla* sont les diterpénoïdes, les sesquiterpénoïdes, les triterpénoïdes, et les esters phénoliques.

Tableau 8 : Les principaux métabolites secondaires isolés de l'espèce *Salvia microphylla*.

Classe	Composé isolé et N° de structure	Référence
esters phénoliques	- Acide 2-(p-hydroxyphenyl)éthyleicosasaéptanoïque ester (17) - hexadécyleférulate (18)	124
sesquiterpénoïdes	- β -eudesmol (19) - 8 α -hydroxy- β -eudesmol (20)	124
diterpénoïdes	- Acide 12-méthoxycarnosique (21) - Microphyllandiolide (22) - Acide 14 α -hydroxyisopimarique (23) - 14 α , 18-dihydroxyisopimaradiène (24) - Acide 7 α -acétoxy-sandaracopimarique (25) - Acide 7 α -hydroxy-sandaracopimarique (26) - 7-oxosandaracopimarate de méthyle (27) - 7 α -hydroxy-sandaracopimarate de méthyle (28) - Sandaracopimara-8(14),15-dien-7 α ,18-diol (29)	124 125 126 127 126 126 127 127 126
triterpénoïdes	- lupéol (30) - Acide oléanolique (31) - 3-acétate d'érythrodiol (32)	128

Les structures de ces métabolites secondaires sont schématisées et représentées dans la figure ci-dessous :



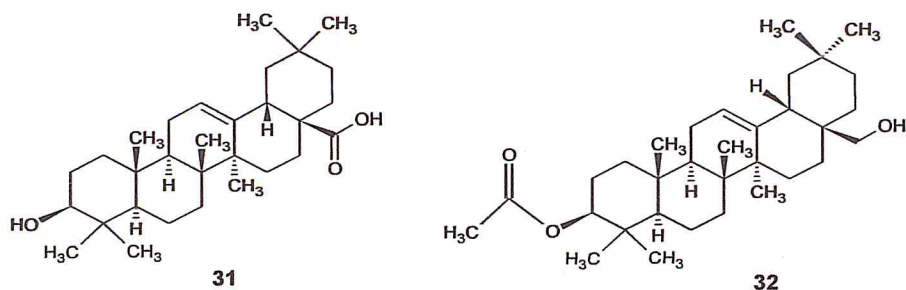


Figure 7 : Structure des métabolites secondaires isolés de l'espèce *Salvia microphylla*.

III.5. Travaux antérieurs sur les huiles essentielles de l'espèce *Salvia microphylla*

Les huiles essentielles sont obtenues par distillation à la vapeur d'eau et étaient ensuite soumises à une analyse par GC-MS et GC.

les constituants rencontrés dans l'huile essentielle de *S. microphylla* de Brésil sont présentés dans le tableau 9, avec Les principaux constituants (E) caryophyllène (15,35%), Bicyclogermacrène (6,17%) α -eudesmol (14,06%), β -eudesmol (8,74%) et γ -eudesmol (7,64%)¹²⁹.

Tableau 9 : La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Salvia microphylla*.

N°	Composés	Pourcentage %
1	α -pinène	0.79
2	camphène	0.94
3	β - pinène	0.94
4	β - phellandrène	2.81
5	1.8- cinéole	4.49
6	camphre	2.58
7	térpin-4-ol	0.43
8	l'acétate d'isobornyle	4.94
9	α - gurjunene	0.51
10	(E) caryophyllène (33)	15.35
11	Aromadendrène	2.68
12	α - humulène	0.81
13	Alloaromadendrène	1.34
14	Bicyclogermacrène (34)	6.17
15	γ - cadinène	0.89
16	δ cadinène	1.15
17	spatulénol	0.42
18	caryophyllène	2.82
19	Globulol	3.24

20	γ - Eudesmol (37)	7.64
21	β - eudesmol (36)	8.74
22	α - eudesmol (35)	14.06

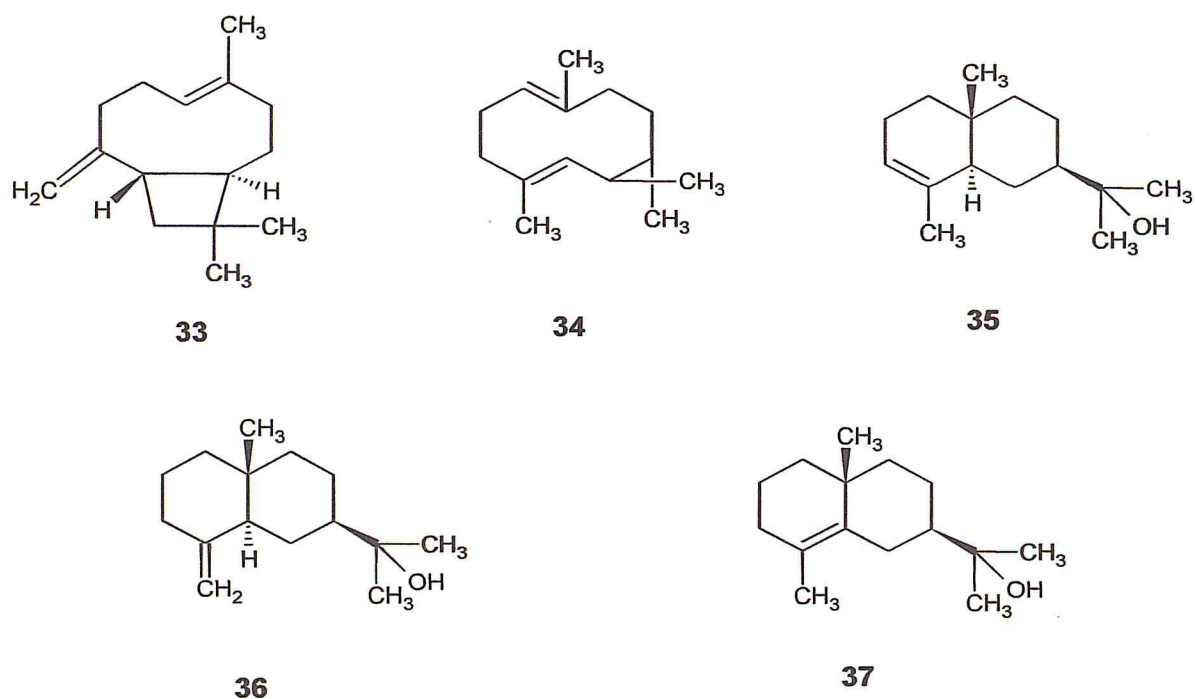



Figure 8 : Structure des Composants majoritaires d'huiles essentielles de l'espèce *Salvia microphylla*.

Les études menées sur la composition de l'huile essentielle du genre *Salvia* ont montrés que les constituants majoritaires de cette huile sont : 1,8-cinéol^{111,112}, α -pinene, β -pinene^{115,121}, β -caryophyllene^{115,116}, β -cubebene et δ -cadinene¹²⁰.

Les différentes études phytochimiques réalisées sur diverses espèces du genre *Salvia* ont permis de référencer plus de 1000 composés.

Les travaux effectués sur ce genre ont montré sa richesse en métabolites secondaires en particulier les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes) et les composés terpéniques.

A decorative border resembling a scroll, with a black outline and light blue shaded areas at the top and bottom corners, framing the text.

Partie Expérimentale

Chapitre 1

Etude de la composition chimique de l'espèce *Salvia microphylla*

I. Extraction de métabolites secondaires de l'espèce *Salvia microphylla*

I.1. Matériel végétal

L'espèce étudiée a été récoltée au mois de février de l'année 2016 dans la région de Blida. L'espèce récoltée est triée puis séchée à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, pendant une semaine, ensuite la matière végétale est conservée en vue de procéder aux différentes extractions.



Figure 9 : *Salvia microphylla* sèche.

I.2. Extraction

Le matériel végétal broyé (450g) est soumis à une extraction par macération dans l'éther de pétrole pendant 24 heures. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le marc obtenue est mise à macérer dans le mélange méthanol / eau (80/20 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Ensuite ce dernier va subir des affrontements par des solvants de polarité croissante :

- Affrontement par chloroforme (3fois) ;
- Affrontement par acétate d'éthyle (3fois);
- Affrontement par n-butanol (3fois).

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 30 minutes, la phase aqueuse (qui est au fond de l'ampoule) et la phase chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément. Les différentes phases récupérées (chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol) sont évaporées à sec puis reprises par 10 ml du méthanol, par contre l'extrait chloroforme est repris avec du chloroforme, enfin tous sont laissés à l'air libre pour évaporation. Les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation.

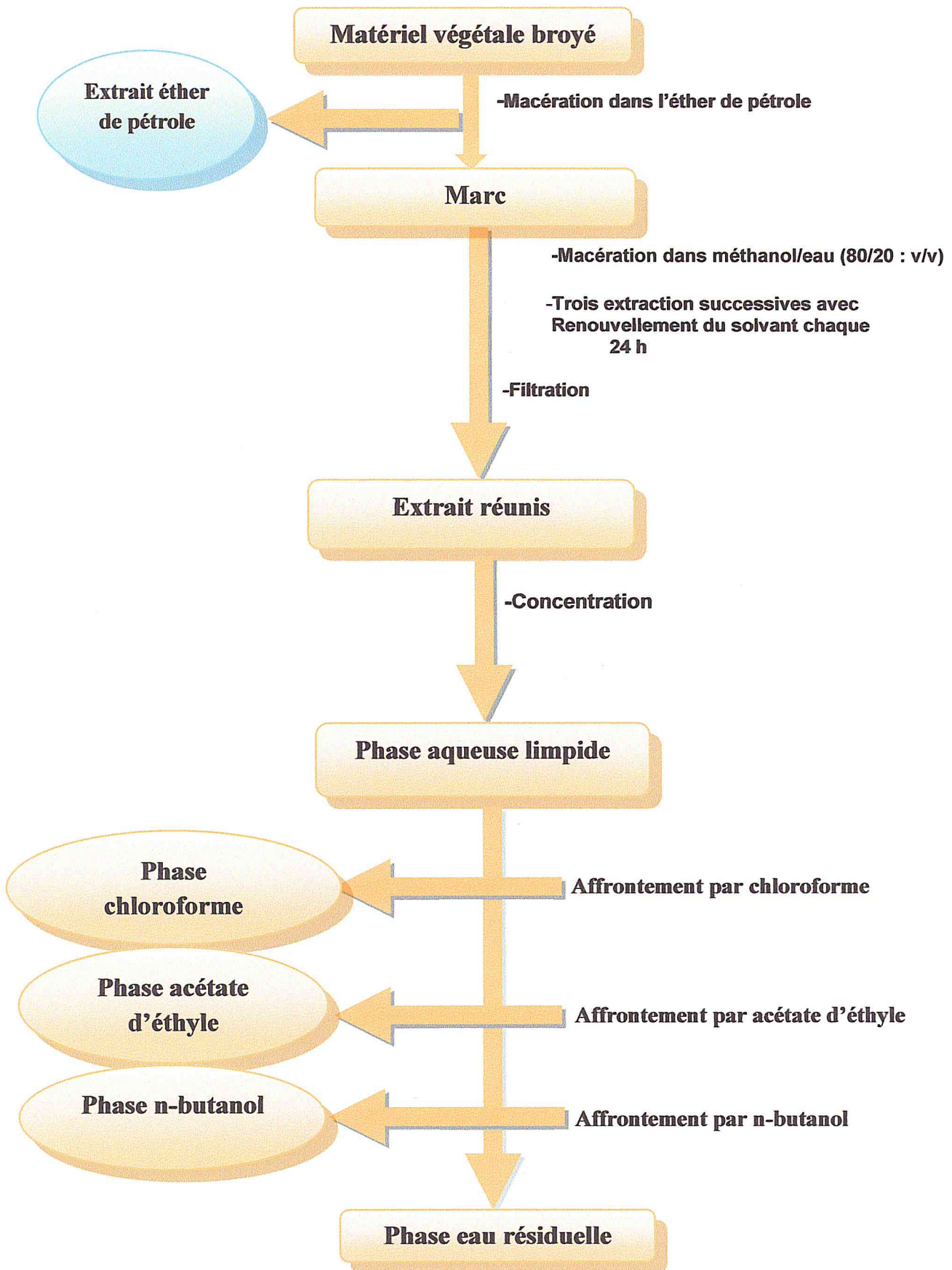


Figure 10 : Protocole d'extraction.

Les extraits obtenus de polarités différentes ont des caractéristiques différentes (masse, aspect, couleur et rendement).

Les résultats de l'extraction sont résumés dans le tableau suivant

Tableau 10 : Résultats de l'extraction de différents extraits de la plante *Salvia microphylla*.

Extrait	Couleur	Aspect	Masse (g)	Rendement %
Ether de pétrole (EEp)	Moutarde	Visqueux	9.29	2.06
Chloroformique (EC)	Vert foncé	Visqueux	12.8	2.84
Acétate d'éthyle (EAc)	Miel	Pâteux	2.5	0.6
Butanolique (EB)	marron foncé	Pâteux	12.68	2.82

I.3. Etude analytique par chromatographie

I.3.1. Généralités sur la chromatographie

a. Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile).

L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide de différentes interactions. L'échantillon est adsorbé puis désorbé sur la phase stationnaire, ou est plus ou moins soluble dans la phase mobile.

b. Principe

La chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile (ou éluant) à travers une phase stationnaire (ou phase fixe). La phase stationnaire, fixée soit sur la surface intérieure d'une colonne soit sur une surface plane, retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire.

I.3.2. Méthodes de séparation et d'identification des composés phénoliques

La détection et l'identification des composés phénoliques se font par plusieurs méthodes qui se complètent :

I.3.2.1 Séparation :

La séparation des produits phénolique est essentiellement réalisée par des méthodes chromatographiques :

- Chromatographie sur colonne.
- Chromatographie sur couche mince.
- Chromatographie sur papier.

I. 3.2.2. Identification :

Une fois que les produits isolés sont purifiés, les techniques suivantes sont utilisées pour déterminer la structure des composés phénoliques:

- Fluorescence sous lumière UV.
- Co-chromatographie sur couche mince en présence de témoins.
- Spectrométrie UV-visible.
- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.
- Spectrométrie de masse.

a. Fluorescence sous lumière UV :

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure des composés phénoliques, les tableaux suivants résument la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

Tableau 11 : La relation entre la fluorescence et la structure des composés phénoliques d'après Lahouel¹³⁰ et Markham¹³¹.

Spot coloré	Types de composés phénoliques	
	d'après Lahouel	d'après Markham
Brun noir	Flavanones ou flavonols 3-OH substitué	-
Violet ou mauves	Flavones, Chalcones, Dihydroflavonols, Isoflavones, Flavanones	Flavonols, flavonones, isoflavonones, flavone
Bleu (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué	Acide phénol
Jaune	Flavonols	flavonols
Jaune fluorescent	Flavonols, Aurones, Chalcone, flavanones	-

Jaune pâle	dihydroflavonols	Flavonols
Rouge ou orange	-	Anthocyanidine 3-glucoside
Rose	-	Anthocyanidine 3,5- di glucoside
Bleu sombres	-	Flavonols, flavonones, aurones
Bleu vif	-	Hydroquinones
Pourpre sombre	-	Chalcones

b. Relation R_f structure :

La relation R_f - structure a été établie par Bate-Smith et Westall¹. R_f est une valeur importante à connaître et facile à déterminer, il est défini comme le rapport entre la distance d parcourue par l'origine de la substance ayant migré et la distance D parcourue par l'origine et le front du solvant :

$$R_f = d/D$$

R_f est une valeur caractéristique d'un composé pour des conditions de chromatographie donnée (éluant, température). R_f est égale à 1, dans le cas de produit très solubles dans la phase mobile et insolubles dans la phase stationnaire. Inversement R_f est nul lorsque le produit est trop peu soluble dans la phase mobile.

Tableau 12 : Relation R_f et structure flavoniques¹³¹.

Structure flavoniques	R_f
Augmentation des groupes hydroxyles	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux.
Glucosylation	R_f augmente dans les solvants aqueux. R_f diminue dans les solvants organiques.
Méthylation des hydroxyles	R_f diminue dans les systèmes de solvants aqueux et augmente dans les systèmes de solvants organiques.

Pour mieux connaître le contenu de ces extraits en métabolites secondaires, des tests chromatographiques (sur couche mince CCM et sur papier) préliminaires ont été menés sur ces extraits.

I.3.3. Etude des extraits éther de pétrole et chloroformique

Pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut rencontrer, nous avons procédé à une analyse préliminaire des extraits éther de pétrole (EEp) et chloroformique (EC) par CCM.

Pour cela, une partie de chaque extrait a été solubilisée dans le méthanol et déposée sur plaques de gel de silices, qui a ensuite été éluée dans le système de solvants spécifique pour chaque extrait. Ensuite, les chromatogrammes sont détectés en lumière ultraviolette avant et après révélation généralement avec 10% d'acide sulfurique ou une solution saturée de NaOH (composé phénolique).

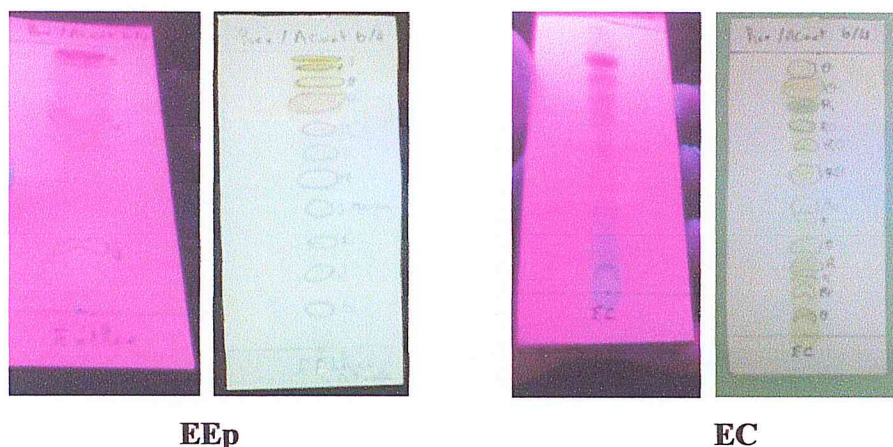


Figure 11 : Profil Chromatographique sur couche mince CCM de l'extrait éther de pétrole et l'extrait chloroformique.

La chromatographie sur couche mince des extraits éther de pétrole (EEp) et chloroformique (EC) effectuée dans le système de solvant Hexane/AcOEt (60/40) a permis d'obtenir les résultats représentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits éther de pétrole et chloroformique de *Salvia microphylla*.

Extraits étudiées	Rf	Couleur des spots sous UV	Couleur des spots après révélation
EEp	0.06	Orange	-
	0.15	Orange	-
	0.20	Violet	Jaune
	0.25	Rouge	-
	0.31	Orange	-
	0.40	Orange	-
	0.45	Rose	-
	0.56	Rose	-
	0.66	Rose	-
	0.72	Rose	-
	0.80	Rouge	-
	0.86	Orange	-
	0.92	Orange	-
EC	0.12	Bleu	-
	0.25	Jaune	Orange
	0.35	Bleu	-
	0.46	Brun marron	-
	0.56	Violet	Jaune
	0.65	Violet	Jaune
	0.72	Violet	Jaune
	0.81	Orange	-
	0.88	Orange	-
	0.92	Rouge	Orange
0.96	Jaune	Orange	

L'extrait chloroformique et l'extrait éther de pétrole est riche en composés puisque on a pu voir plus de 13 taches dans chaque extrait.

Par comparaison avec la littérature, La présence des spots de coloration jaune et violet dans les chromatogrammes de nos extraits, indique la présence dans l'espèce étudiée, des flavonols, des flavonones, des isoflavonones et des flavones.

I.3.4. Etude des extraits acétate d'éthyle et n-butanol

a. Analyse par chromatographie sur papier de deux dimensions (2D)

La chromatographie préparative sur papier Wathman N° 3 est une méthode de séparation dont le principe repose sur les phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau, la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle.

La technique de chromatographie sur papier occupe jusqu'à maintenant une position dominante dans le domaine de l'analyse et la séparation des flavonoïdes. La CP est convenable pour la séparation des mélange complexes de tous les types de flavonoïdes, aussi utilisée pour isoler les petites ainsi que, les grandes quantités de flavonoïdes, elle nécessite des équipements et des matériels de faible coût. La chromatographie sur papier demande un certain temps, généralement plusieurs heures.

Les systèmes de solvants utilisés contiennent souvent de l'acide acétique pour améliorer les séparations et pour éviter les traînées dues à l'ionisation des molécules.

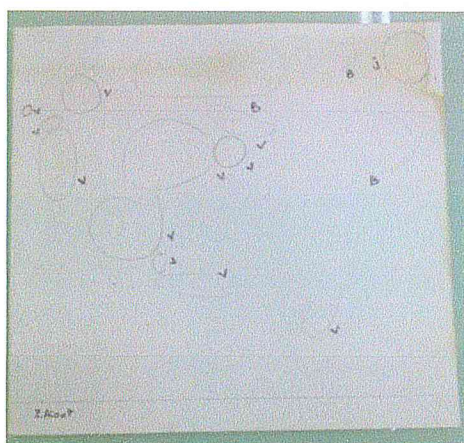
➤ Protocole expérimentale

Quelques microgrammes de chaque extrait est déposée sur le papier Whatman N°3.

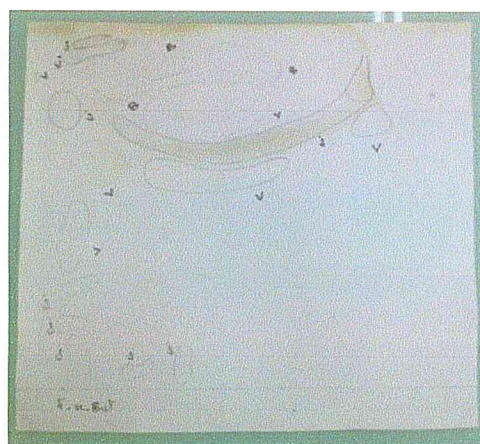
Ensuite, la feuille est placée dans une cuve chromatographique contenant le système de solvant I : (BAW). Après développement, le papier est séché puis placé une deuxième fois dans la cuve chromatographique dans le coté des taches éluées. L'éluant utilisé est le système II.

- Système I: B.A.W : n-Butanol / Acide acétique /Water, (4 : 1 : 5).
- Système II: Acide acétique 15%.

Les chromatogrammes sont représentés dans les figures (8et9).



EAc



EB

Figure 12 : Profil Chromatographique CP bidimensionnelle de l'extrait acétate d'éthyle (EAc) et n-ButOH (EB).

Les résultats de l'analyse des extraits acétate d'éthyle et butanolique par chromatographie sur papier sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Le nombre et la couleur des spots des extraits acétate d'éthyle et butanolique.

Extrait	Nombres des taches	Couleurs des taches
Acétate d'éthyle	11	Violet
	3	Bleu
	1	Jaune
n-butanol	6	Violet
	3	Bleu
	9	Jaune

D'après les chromatogrammes 2D : On peut dire que la composition des deux extraits est clairement différente : l'extrait acétate d'éthyle a révélé la présence d'une tache jaune et 11 taches violet, par contre, l'extrait butanolique a révélé la présence de 9 taches jaune et 6 taches violet.

La chromatographie (2D) sur papier a montré la richesse des extraits acétate d'éthyle et butanolique en flavonoïdes (taches jaunes et violet).

b. Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

b.1. Généralité

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification en présence des standards appropriés.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

- **Principe :**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

- **Le choix de la phase mobile**

Si la phase stationnaire (colonne) est polaire, on utilise un solvant peu à pas polaire (phase mobile), C'est la chromatographie en phase normale.

Si la phase stationnaire (colonne) est apolaire ou peu, on utilise un solvant polaire, C'est la chromatographie en phase inversée.

Les solvants d'HPLC sont donc classés suivant leur polarité et leur force éluant. En faisant varier la composition du solvant, on fait varier le coefficient de distribution K et donc le pouvoir d'éluion. Les solvants doivent être miscibles et ne pas gêner la détection (absorption UV par exemple).

b.2. Protocole expérimentale

Afin de connaître la composition des extraits acétate d'éthyle et butanolique de *Salvia microphylla*, une chromatographie liquide à haute performance a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Appareil de type : Shimadzu
- pompe quaternaire équipée d'un système de programmation de débit,
- détecteur UV/Visible à barrettes de diodes.
- volume d'injection est de 10 μ l
- Les séparations sont réalisées à une température de 35 °C,
- Les fractions ont été analysées en mode gradient à l'aide du mélange éluant eau/acétonitrile, à un débit de 1 ml.min⁻¹.

Le profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle enregistré dans deux longueurs d'onde ($\lambda = 205$ et $\lambda = 254$ nm) est le suivant:

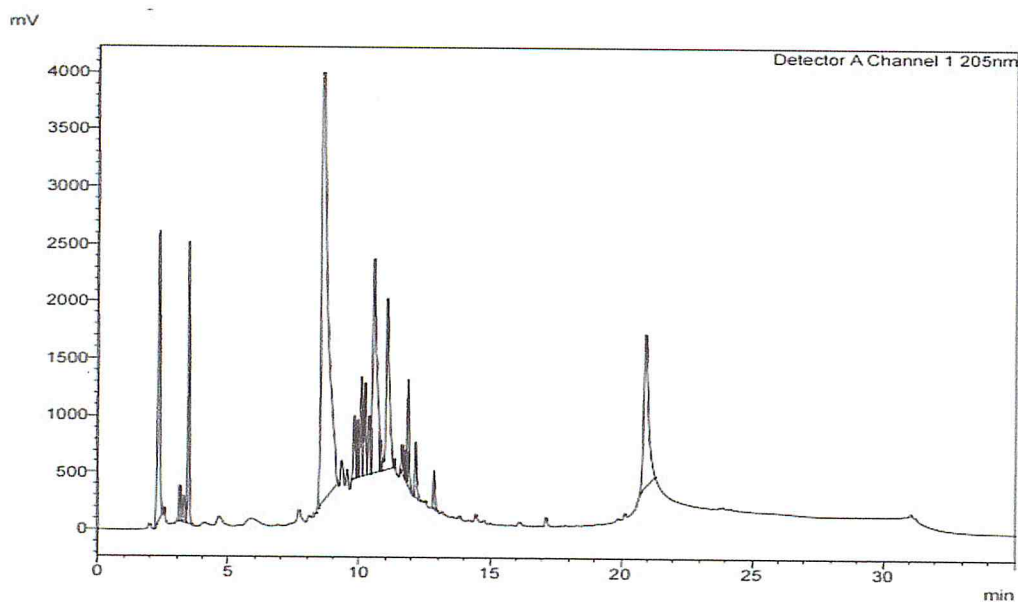


Figure 13 : Profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 205$ nm.

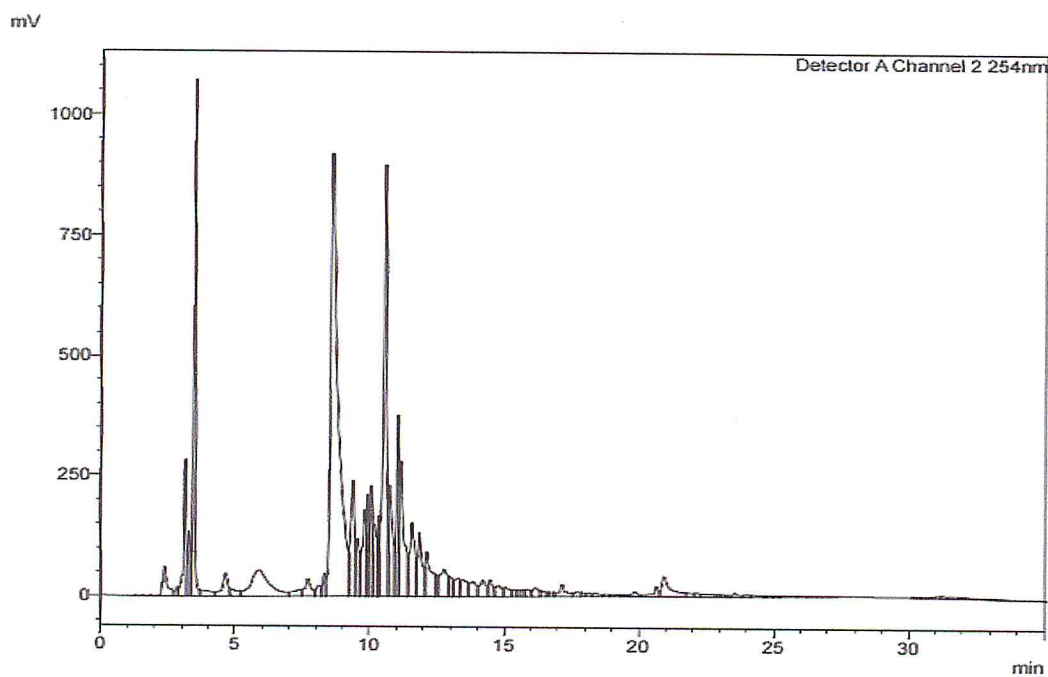


Figure 14 : Profil chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 254$ nm.

Le profil chromatographique de l'extrait butanolique enregistré dans deux longueurs d'onde ($\lambda = 205$ et $\lambda = 254$ nm) est le suivant:

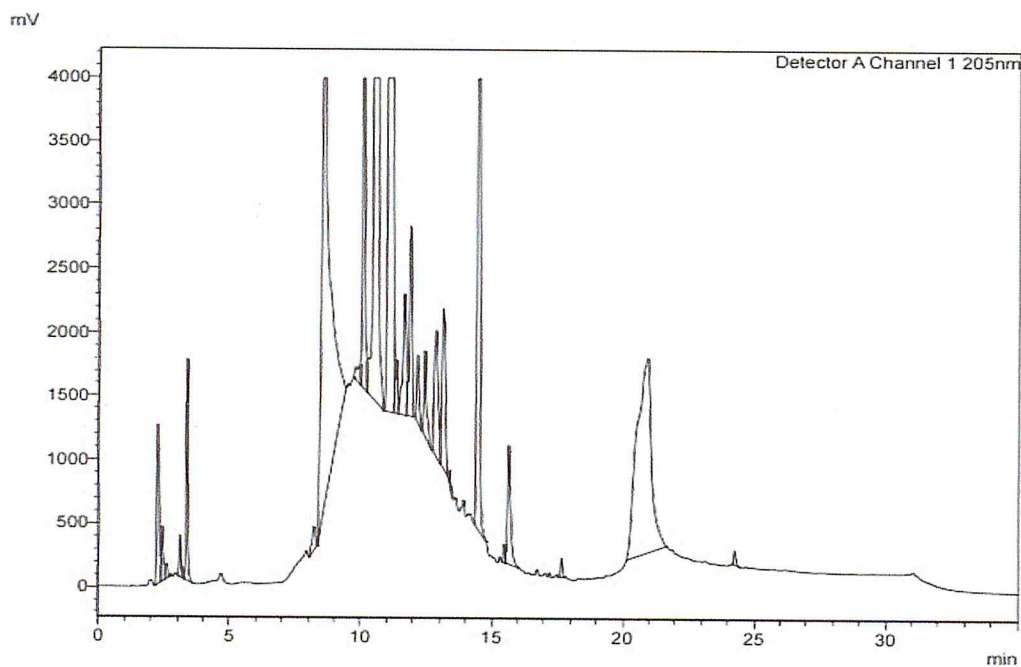


Figure 15 : Profil chromatographique de l'extrait butanolique enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 205$ nm.

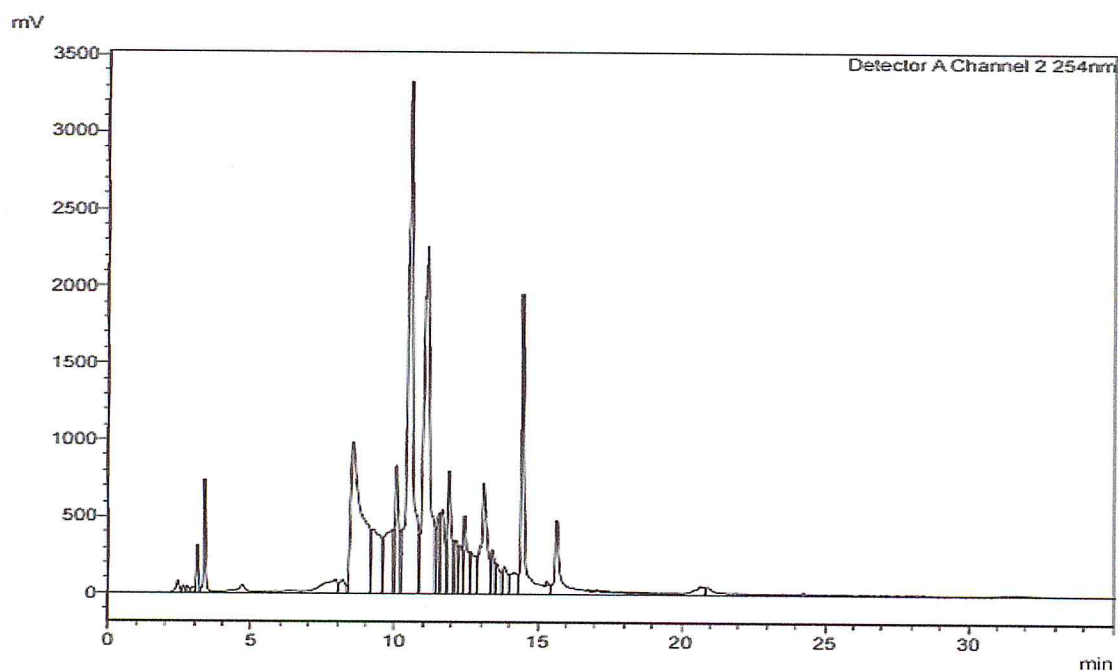


Figure 16 : Profil chromatographique de l'extrait butanolique enregistré à la longueur d'onde $\lambda = 254$ nm.

L'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC), indique la richesse de la plante *Salvia microphylla* en métabolites secondaires, notamment en flavonoïdes (figure 14 et 16). Ces résultats confirment ceux obtenus par chromatographie sur papier à deux dimensions.

II. Extraction et analyse de l'huile essentielle

II.1. Extraction

Nous avons réalisé l'extraction de l'huile essentielle de *Salvia microphylla* en utilisant le procédé d'hydrodistillation.

II.1.1. Principe

Le principe de l'hydrodistillation consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau (aujourd'hui remplacé par un Clevenger), que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. La pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur.

II.1.2. Protocole expérimental

150g de feuille de *Salvia microphylla* sont hydrodistillés dans un Clevenger, durant 3 h. L'huile essentielle obtenue, est ensuite conservée à +4°C jusqu'à son analyse GC et GC/MS.



Figure 17 : Montage d'hydrodistillation.

L'huile essentielle obtenue est de couleur jaune et d'odeur très agréable et Fraîche.



Figure 18 : Huile essentielle de *Salvia microphylla*.

II.1.3. Calcul du rendement de l'huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids d'huile extraite (M_{HE}) en (g) et le poids de la plante à traiter (M_{MV}) en (g).

Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R\% = (M_{HE}/M_{MV}) \times 100$$

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 15 : Rendement de l'huile essentielle de *Salvia microphylla*.

Matériel végétale	poids d'huile extraite (M_{HE}) (g)	poids de la plante à traiter (M_{MV}) (g)	Le rendement Rdt%
fraîche	0.5	150	0.33
sèche	0.85	150	0.56

Nous avons réalisé l'extraction de l'huile essentielle de *Salvia microphylla* par hydrodistillation, le rendement en huile essentielle obtenu de la plante fraîche est de l'ordre de 0.33% et celui obtenue de la plante sèche est de l'ordre de 0.56%.

Donc on peut noter que notre espèce végétale révèle une richesse en huile essentielle obtenue par extraction des feuilles sèches.

II.2. Analyses par GC/MS

II.2.1. Analyse GC

L'analyse GC a été effectuée sur un appareil « Shimadzu GC » équipé de détecteur QP, et une colonne capillaire de DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d., épaisseur de film 0.25 μ m). La température du four étant programmée de 90 à 250°C, à une vitesse de 3°C min⁻¹, puis à une vitesse de 15°C min⁻¹, lorsque la température atteint 300°C. Elle est enfin maintenue isotherme pendant 15 min à 300°C. Le gaz vecteur est l'hélium à 1ml.min⁻¹.

II.2.2. Analyse GC/MS

L'analyse GC/MS a été effectuée sur un appareil Shimadzu, équipé d'une colonne capillaire de DB-5 (30 m x 0.25 mm i.d., épaisseur de film 0.25 μ m) et un détecteur à ionisation de flamme FID. Les paramètres MS étant :

- température du détecteur: 220°C-240°C
- rapport split : 1:10

- potentiel d'ionisation : 70 eV

Les composants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (RI) relatifs à leur MS avec les données (Librairies NIST et WILEY).

Le pourcentage relatif aux composés identifiés a été calculé à partir de la GC par intégrateur informatisé.

II.2.3 Résultats de l'analyse GC/MS et discussion

27 composants, représentant de l'huile essentielle du *Salvia microphylla*, ont été identifiés (Chromatogramme1). Cette huile est majoritairement composée de 1,2-Dibenzoylbenzo[G]indolizine (5.15%), Scleral ou Sclareolides lactol (5.72%), 17-(1,5-Dimethyl-hexyl)-2-hydroxy-10,13-dimethyl-hexadecahydro-cyclopenta[A]phenanthren-3-one (5.77%), acétate de β -Fenchol (6.36%) et Guanosine, 2'-deoxy-N-(trifluoroacetyl)-, 3',5'-bis(trifluoroacetate) (7.65%).

Les composés obtenus, listés selon leur ordre d'éluion dans la colonne, sont résumés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Composition de l'huile essentielle du *Salvia microphylla*.

N°	Composé	Pourcentage (%)	Indice de rétention
1	5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene (α -thujene)	0.24	3.750
2	(1S,3S)-(+)-m-mentha-4,8-diene	0.83	4.033
3	1-Hydroxy-6-(3-isopropenyl-cycloprop-1-enyl)-6-methyl-heptan-2-one	0.16	4.412
4	1,7,7-trimethyl Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one (Camphre) (1)	1.27	7.794
5	(1S-endo)1,7,7-trimethylBicyclo[2.2.1]heptan-2-ol (Bornéol) (2)	0.77	8.355
6	Acétate de bornyle	0.38	8.614
7	(-)-(1S,2R,4R)- β -Fenchol	0.14	9.182
8	Acétate d'isobornyl	0.36	9.919
9	Endo 1,3,3-trimethylBicyclo[2.2.1]heptan-2-ol acetate (acétate de β -Fenchol) (3)	6.36	12.021
10	Bicycloelemene	0.13	13.860
11	α -Cubebene	0.11	15.299
12	[1aR-(1 $\alpha\alpha$,4 α ,4 $\alpha\beta$,7 $\beta\alpha$)]1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-1H-Cycloprop[E]azulene ((-) α -Gurjunene)	0.28	16.566
13	Caryophyllene (4)	3.20	16.937
14	7-Epi- α -Selinene	0.19	17.510
15	[1aR-(1 $\alpha\alpha$,4 $\alpha\alpha$,7 α ,7 $\alpha\beta$,7 $\beta\alpha$)]-decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-1H-Cycloprop[E]azulene (Alloaromdendrene)	0.69	17.654

16	1,1,7-Trimethyl-4-methylenedecahydro-1H-cyclopropa[E]azulene (Aromdendrene)	0.39	18.455
17	Azulene,1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethylidene)-, (1S-cis) (β-cis-Guaiene)	0.32	18.974
18	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4a.α.,7.α.,8a.β.)] (épi-β-selinene)	0.30	19.428
19	δ-Cadinene	0.39	20.713
20	1H-Cycloprop[E]azulen-7-ol,decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene ((+)-Spathulenol) (5)	0.32	22.749
21	(2R-cis)- 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-α,α,4a,8-tetramethyl-2-Naphthalenemethanol (γ- eudesmol) (6)	0.35	24.709
22	Rosifoliol	0.26	25.396
23	2-(6,10-dimethylspiro[4.5]dec-6-en-2-yl)-2-propanol (Agarospinol)	0.46	25.504
24	Sclalar ou Sclareolides lactol (7)	5.72	52.142
25	17-(1,5-Dimethyl-hexyl)-2-hydroxy-10,13-dimethyl-hexadecahydro-cyclopenta[A]phenanthren-3-one	5.77	53.994
26	1-([3-(4-Methylphenyl)-1-adamantyl]carbonyl)piperidine	3.54	59.659
27	Tetrapentacontane	2.58	60.179

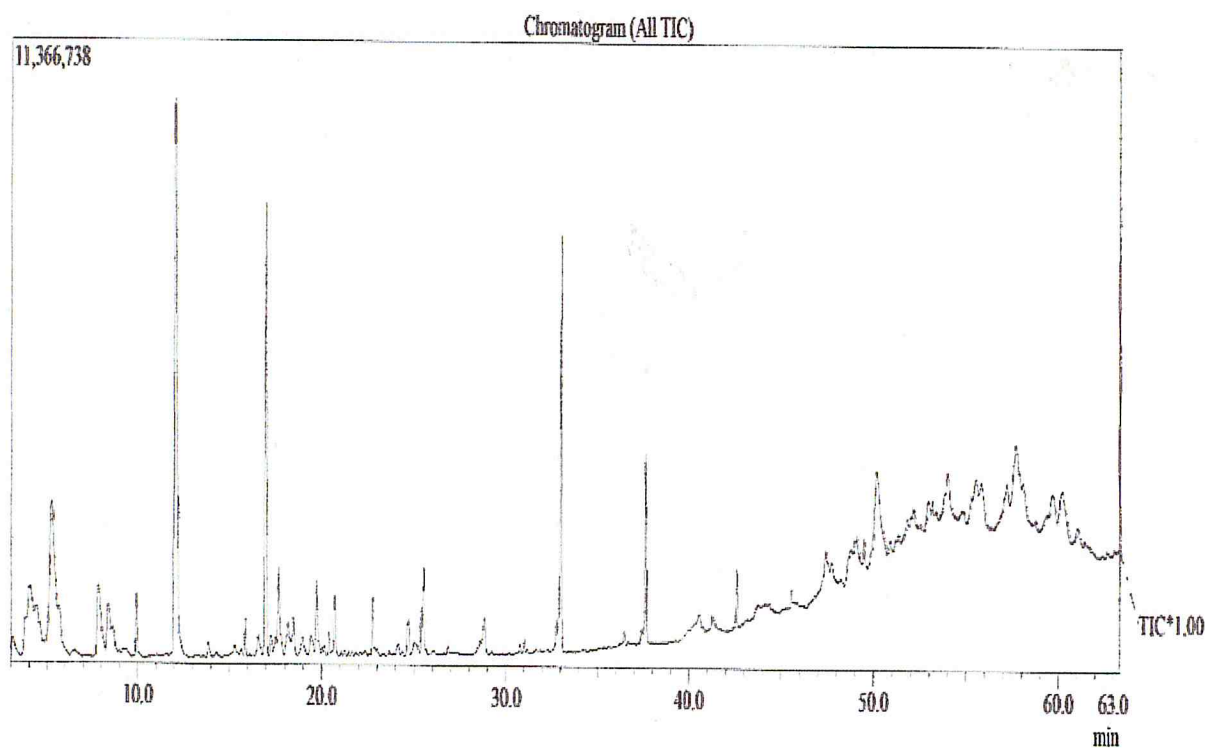


Figure 19 : profil chromatographique CG de l'huile essentielle du *Salvia microphylla*.

Les études menées sur la composition de l'huile essentielle du genre *Salvia* ont montrés que les constituants majoritaires de cette huile sont : 1,8-cinéol^{111,112}, α -pinene, β -pinene^{115,121}, β -caryophyllene^{115,116} et le β -cubebene et δ -cadinene¹²⁰

Par ailleurs, les travaux effectués sur l'huile essentielle de l'espèce *salvia microphylla* cultivée en Brésil¹²⁹ ont montrées la présence d'E-Caryophyllène (15.35%), de bicyclogermacrene (6.17%), de α -eudesmol (14.06%), de β -eudesmol (8,74%) et de γ -eudesmol (7,64%) comme principaux constituants. Ainsi que l'existence de l' α -pinene, le β -pinene, le 1,8-cinéol et le γ -cadinene en faible quantité.

Conclusion

En comparaison avec les travaux effectués sur l'espèce *Salvia microphylla*, nous pouvons constater que la composition de notre huile essentielle est très proche à celle de l'espèce cultivée au Brésil¹²⁹ et cela dans l'existence des composés suivants : acétate d'isobornyl, γ -eudesmol, (+)-Spathulenol, Aromdendrene, Alloaromdendrene, α -Gurjunene, Camphre, Caryophyllene et le δ -Cadinene.

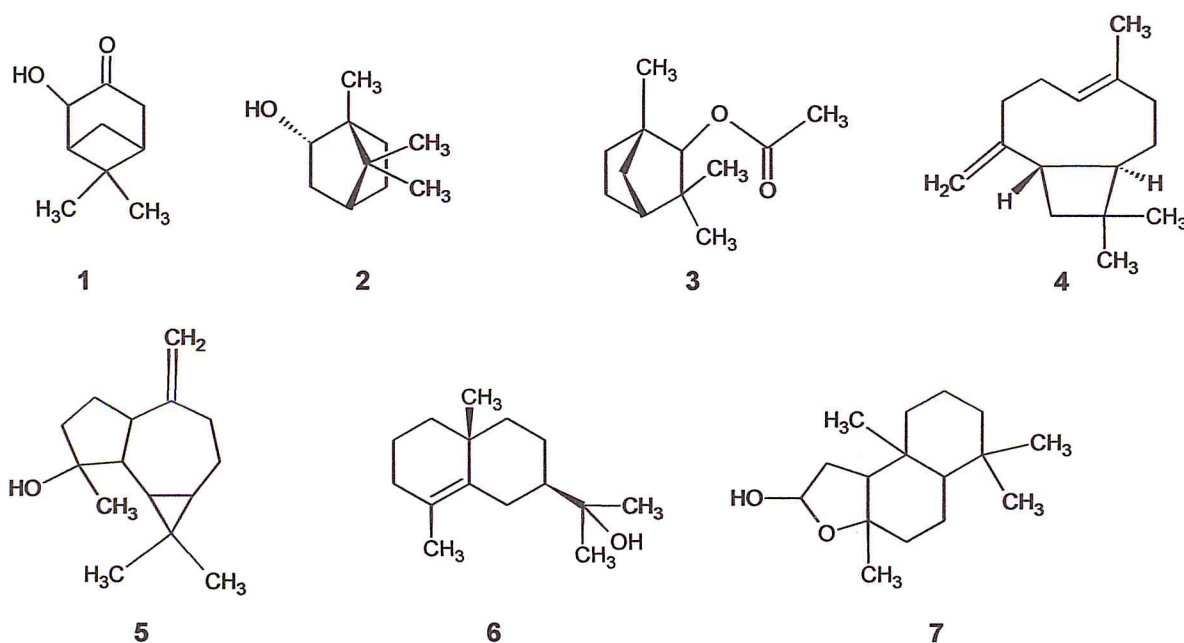


Figure 20 : structure de quelques composés de l'huile essentielle du *Salvia microphylla*.

Chapitre 2

**Etude de l'activité biologique de
l'espèce *Salvia microphylla***

I. Dosage des polyphénols totaux :

I.1. Définition :

Les polyphénols sont des substances naturelles présentes dans les plantes, caractérisés par la présence d'une ou plusieurs fonctions phénols. Cette famille de composés compte plus de 8000 structures différentes. Les composés polyphénoliques présentent des propriétés antioxydantes et antimutagènes. Et des études ont montré que la consommation de polyphénols réduit les risques cardiovasculaires et diminue la probabilité d'avoir un cancer¹³².

La détermination quantitative des phénols totaux dans un extrait est généralement réalisée selon la méthode basée sur le réactif de Folin-Ciocalteu¹³³.

I.2. Principe :

L'ensemble des composés phénoliques de l'extrait est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{40}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite de l'oxydation possède une absorption maximale à 765 nm.

Les phénols sont estimés par une spectroscopie UV dont l'acide gallique est utilisé comme un standard à une longueur d'onde $\lambda = 765$ nm.

I.3. Protocole expérimentale

I.3.1. Courbe d'étalonnage :

Un standard de calibration a été préparé, en utilisant des solutions d'acide gallique de différentes concentrations de 0.0156 jusqu'à 0.125 mg.mL⁻¹.

On prend 1 mL de la solution diluée, On lui ajoute 5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu. On laisse le mélange 5 minutes puis on le neutralise avec 4 mL de carbonate de sodium. Après agitation, la solution est maintenues dans l'obscurité et à la température ambiante pendant 1 heure. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la Figure 21.

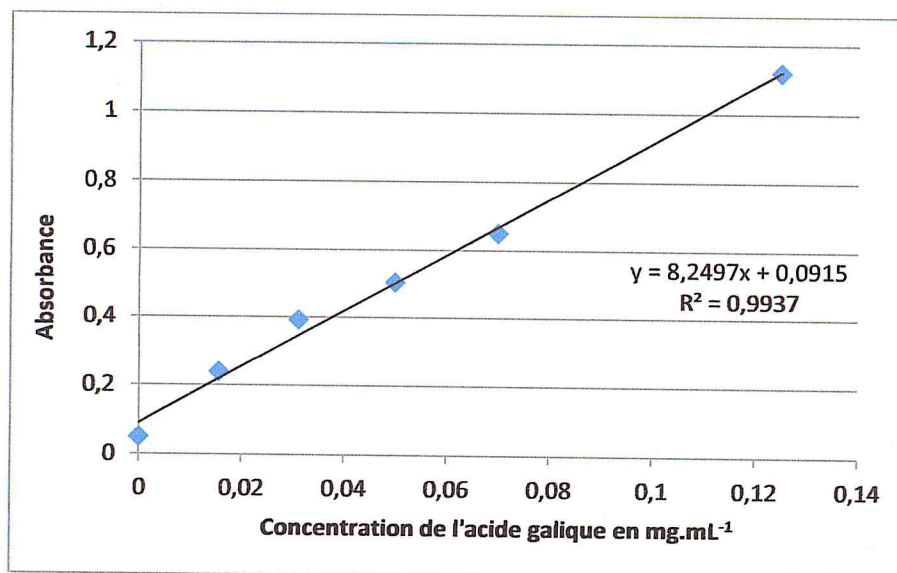


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

I.3.2. Dosage des polyphénols totaux des extraits

Afin de déterminer la quantité de polyphénols totaux présents dans les extraits acétate d'éthyle (EAc) et butanolique (EB) de l'espèce *Salvia microphylla*, nous avons utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu¹³⁴.

Nous avons préparé, dans un premier temps, une solution mère d'extrait de plante, 2mg de chaque extrait (EAc et EB) de l'espèce *Salvia microphylla* ont été mélangés avec 1 mL de méthanol et 6.5mL d'eau distillé.

1 mL de la solution mère a été prélevé et introduit dans un tube sec et stérile. On a ajouté à cette solution 0.5mL de réactif de Folin-Ciocalteu¹³⁴ et 5 mL d'eau distillée. Pour finir, on ajoute au mélange 4 mL d'une solution aqueuse de carbonate de sodium de concentration 75g.L⁻¹. Après incubation pendant 1h à l'obscurité et à température ambiante, on lit l'absorbance à 765 nm à l'aide d'un spectrophotométrie UV-visible, le total des composés phénoliques est déterminé selon l'équation suivante :

$$T = C \cdot V / M$$

T : Représente le total des composés phénoliques (mg EAG / g d'extrait sec de la plante)

C : Concentration d'extrait équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg.mL⁻¹).

V : le volume d'extrait (mL).

M : poids sec d'extrait de la plante (g).

I.4. Résultats et discussion

Le taux de polyphénols existant dans les extraits acétate d'éthyle (EAc) et butanolique (EB) est calculé et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 17 et dans la figure 21 sous forme d'histogramme.

Tableau 17 : Taux des polyphénols existant dans les extraits EAc et EB de *Salvia microphylla*.

Echantillon dosé	Taux de polyphénols totaux (mg.g ⁻¹)
EAc	61.5
EB	29

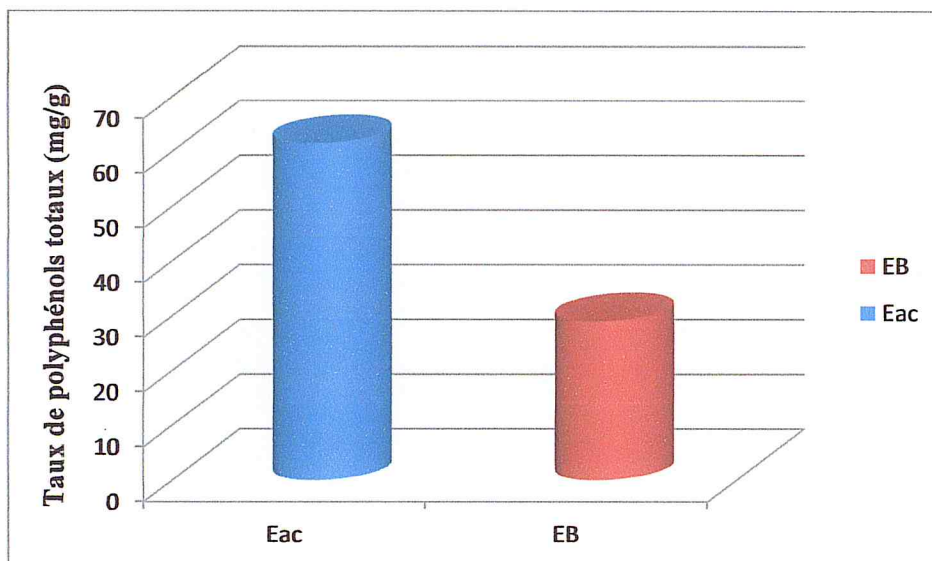


Figure 22 : Le contenu des composés phénoliques des extraits EAc et EB.

D'après les résultats obtenus (tableau 17 et figure 22), nous avons constaté que l'extrait acétate d'éthyle est plus riche en polyphénols que l'extrait butanolique.

II. Etude de l'activité antioxydante de l'espèce *Salvia microphylla*

II.1. Définition

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol, la quercétine, la rutine et le Picnogénol. La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées, en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$)¹³⁵.

II.2. Principe du test de DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques¹³⁶. Le DPPH \cdot reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur violet bien caractéristique de la solution de DPPH \cdot . La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH \cdot , mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

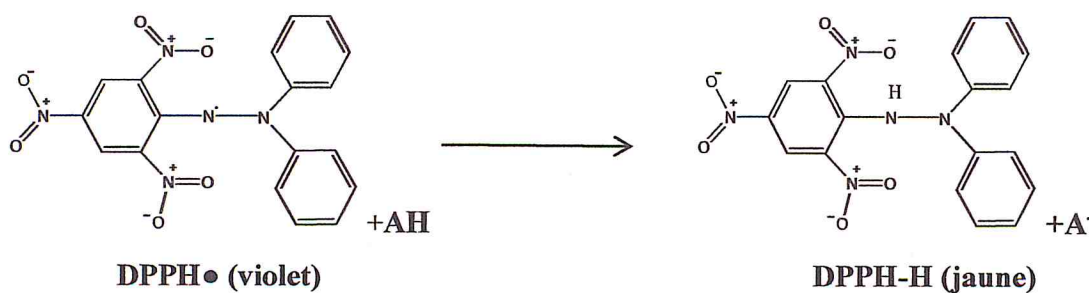


Figure 23 : Réaction d'un antioxydant donneur d'hydrogène avec le radical DPPH \cdot .

Ce radical est souvent utilisé pour estimer l'activité antioxydante de nombreux composés, dont les composés phénoliques.

Généralement, les mesures de l'absorbance du DPPH des différentes substances antioxydantes (échantillons et témoin) permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition, en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{\text{Abs c} - \text{Abs e}}{\text{Abs c}} \right] \times 100$$

Abs c : Absorbance du contrôle négatif.

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé.

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés, nous permettent de calculer la valeur du paramètre CE_{50} (concentration d'inhibiteur) qui représente la concentration de la substance nécessaire pour diminuer 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel.

Nous pouvons déduire l'activité antiradicalaire (ARP) de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des CE_{50} trouvées.

$$ARP = 1 / CE_{50}$$

ARP : Puissance antiradicalaire

CE_{50} : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

II.3. Protocole expérimental

II.3.1. Préparation de la solution de DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M=394.33$), est solubilisé dans le méthanol absolu pour en avoir une solution de 100 μmol (4mg de DPPH dissout dans 100 mL de méthanol absolu).

II.3.2. Préparation de la solution de vitamine C

Préparées par dissolution de 50 mg de la vitamine C dans 10mL de méthanol, cette solution, dite solution mère, subit ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de milligramme par mL (Tableau 8). L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

II.3.3. Préparation des Solutions d'extrait

Pour les extraits acétate d'éthyle et butanolique (EAc, EB), nous avons préparé une solution mère dans le méthanol absolu à raison de 5mg.mL^{-1} . Cette solution est subit, par la suite, des dilutions pour en avoir différentes concentrations allant de 0.1mg.mL^{-1} jusqu'au 3mg.mL^{-1} .

II.3.4. Test du DPPH

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 30 μ L de la solution à tester, on ajoute 3mL de la solution au DPPH, après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517, nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Pour chaque dilution, un blanc (contrôle négatif) est préparé à partir de la solution DPPH et 30 μ L de méthanol.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le pourcentage de décoloration du DPPH, en solution dans le méthanol détermine l'activité antioxydante.

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures.

II.4. Résultats de l'activité antioxydante testée par la méthode du DPPH

L'activité antiradicalaire de nos extraits (EAc et EB) a été évaluée par la méthode de DPPH. Une solution méthanolique de DPPH \bullet (2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl) présente une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant, la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance.

Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence de chacun des extraits à tester a été évalué par spectrophotométrie UV-Visible et mesuré à 517 nm.

L'évaluation du pouvoir antiradicalaire de nos deux extraits (EAc et EB) a été réalisée par comparaison avec celle de l'antioxydant, la Vitamine C. En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant.

Les résultats figurant dans le tableau 18 et la figure ci-après illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire des extraits acétate d'éthyle et butanolique de *Salvia microphylla* vis-à-vis du radical libre DPPH.

Tableau 18 : Absorbances et Pourcentages de l'activité antiradicalaire des différentes concentrations des extraits (acétate d'éthyle et butanolique) et du standard vis-à-vis du radical libre DPPH.

	C(mg.ml ⁻¹)	0.1	0.125	0.25	0.5	1	2	3	5
EAc	Absorbance	0.616	0.611	0.541	0.391	0.202	0.077	0.061	0.048
	% d'inhibition	15.62	16.30	25.89	46.44	72.32	89.45	91.64	93.42
EB	Absorbance	0.542	0.521	0.471	0.278	0.113	0.056	0.042	0.039
	% d'inhibition	31.30	33.97	40.30	64.77	85.68	92.90	94.68	95.05
Vit	Absorbance	0.692	0.669	0.584	0.113	0.052	0.051	0.043	0.027
C	% d'inhibition	38.92	40.95	48.45	90.02	95.41	95.49	96.20	97.61

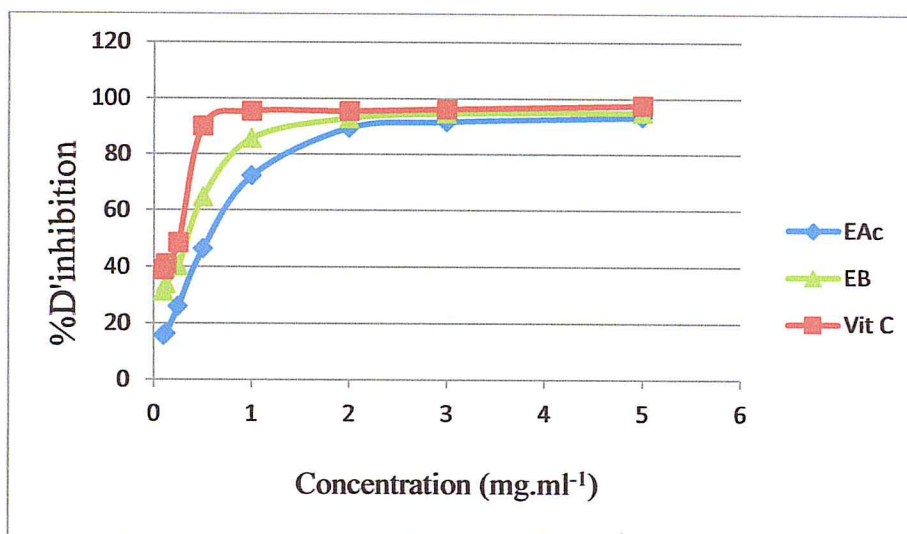


Figure 24 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'extrait acétate d'éthyle, butanolique et du standard.

L'interprétation des résultats de l'activité antioxydante de nos extraits par la méthode de DPPH• est exprimée en termes de CE₅₀ (concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH).

La concentration CE₅₀ des extraits et du standard antioxydant est déduite de la droite représentant le taux d'inhibition en fonction de la concentration des extraits EAc et EB (Figure 23).

Les valeurs des CE₅₀ des extraits étudiés et de vit C, sont indiquées dans le tableau 19.

Nous pouvons déduire l'activité antiradicalaire de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des CE₅₀ trouvées.

$$\text{ARP} = 1 / \text{CE}_{50}$$

Les valeurs des CE_{50} et ARP des extraits étudiés et de vit C, sont indiquées dans le tableau 19 et dans la figure 25 sous forme d'histogramme.

Tableau 19 : Valeurs CE_{50} et ARP des extraits EAc et EB de *Salvia microphylla* et de la Vitamine C.

Composés	CE_{50} (mg.mL ⁻¹)	ARP
EAc	0.56	1.78
EB	0.37	2.70
Vit C	0.25	4

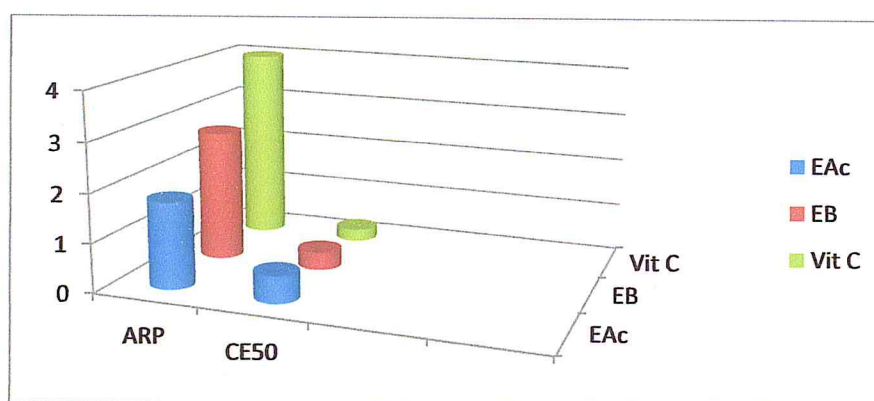


Figure 25 : Les CE_{50} et les pouvoirs antiradicalaires des extraits EAc, EB et du Vit C.

D'une façon générale, les deux extraits testés acétate d'éthyle et butanolique ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 517nm selon leurs concentrations. Ainsi, ces deux extraits ont montrés un pouvoir de piégeage du radical DPPH important avec un pourcentage d'inhibition élevé pour toutes les concentrations.

Comme figurant dans le tableau précédent l'antioxydant standard « Vit C » a montré une activité antioxydante puissante avec une CE_{50} de l'ordre de 0.25 mg.mL⁻¹.

Ces résultats montrent un meilleur effet antioxydant de l'extrait butanolique à une concentration de 5mg.mL⁻¹ car environ 95.05 % du DPPH sont inhibés. La valeur de la CE_{50} de l'extrait butanolique, 0.37 mg.mL⁻¹, permet de conclure que cet extrait possède une assez bonne activité antioxydante. Si on compare, les valeurs des polyphénols totaux des extraits acétate d'éthyle et butanolique, il apparait que celui qui est plus riche en polyphénols est le moins antioxydant. Ceci peut être expliqué par la présence d'autres métabolites dans l'extrait butanolique qui augmentent son activité antioxydante.

III. Etude de l'activité antimicrobienne de l'espèce *Salvia microphylla*

III.1. généralité sur l'activité antimicrobienne

III.1.1. Introduction

De nombreux travaux antérieurs et actuels pour la recherche de nouvelles molécules étaient focalisés sur la mise en évidence de pouvoir antibactérien de plantes médicinales en raison de l'évolution rapide des bactéries pathogènes vers la multirésistance aux antibiotiques. Ceux dont l'efficacité contre les micro-organismes pathogènes ont été prouvés, trouvent des applications pratiques dans divers domaines. Les polyphénols et les huiles essentielles constituent les extraits les plus largement exploités. Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs.

Les antibiotiques ont montré aussi d'autres inconvénients et des limites d'utilisation: les effets secondaires, toxicité des molécules antimicrobiennes pour l'organisme traité et les difficultés rencontrées dans le traitement des maladies exigeant la destruction des germes pathogènes indépendamment des facultés de défense du malade¹³⁷.

III.1.2. Principe :

L'antibiogramme est un examen de laboratoire permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie prélevée chez un malade vis-à-vis de divers antibiotiques¹³⁸. La technique utilisée est celle de l'aromatogramme, identique à celle de l'antibiogramme utilisé pour tester les antibiotiques. C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des extraits et des huiles essentielles chémotypées. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide ou gazeux, sont exploitables. Les prélèvements effectués sur des malades sont préparés puis mis en contact avec différents milieux nutritifs (géloses enrichies) sur boîtes de Pétri. Placés dans une étuve, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif.

Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries de petits disques stériles imprégnés de différents échantillons à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 26°C et 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des huiles utilisées.

III.1.3. Techniques en milieu solide :

- Méthode de Vincent :

Technique de l'antibioaromatogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques¹³⁹. Dans cette méthode, on utilise des disques de papier Whatman N°3, imprégnés de l'extrait et d'HE et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. Pendant l'incubation de l'extrait ou l'huile essentielle va diffuser à partir du centre du disque. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en (mm) de la zone claire autour du disque, appelée : zone d'inhibition (diamètre d'inhibition), cette dernière est le critère qui détermine la résistance ou la sensibilité de la bactérie vis-à-vis de la substance antibiotique¹⁴⁰. La dilution des huiles essentielles se fait toujours dans un solvant tel que l'éthylène glycol, l'acétone, l'éthanol à 95%. Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'huile essentielle par diffusion dans la gélose. Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux huiles essentielles¹⁴¹.

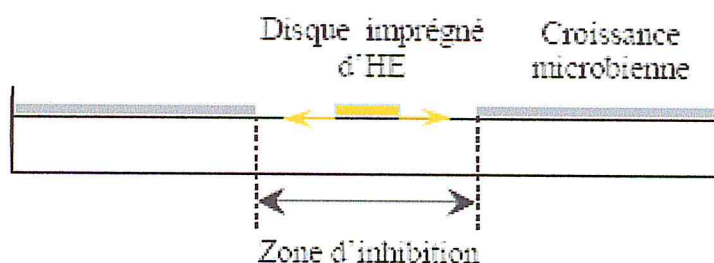


Figure 26 : Principe de la méthode de diffusion par disque imprégné d'huile essentielle.

La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition représenté dans le tableau suivant¹⁴² :

Tableau 20 : Relation entre la sensibilité des souches et le diamètre d'inhibition.

Sensibilité	Diamètre
Extrêmement sensible	$D > 23\text{mm}$
Sensible	$18\text{mm} < D < 22\text{mm}$
Intermédiairement	$12\text{mm} < D < 17\text{mm}$
Non sensible (résistante)	$D < 11\text{mm}$

La sensibilité des souches microbiennes a été testée vis-à-vis d'un antibiotique [Ciprofloxacine (ATB) ; 0.1mg/disque] et deux antifongiques [Métronidazol (ATF 1) ; 0.25mg/disque, Amphotéricine B (ATF 2) ; 0.5mg/disque] selon la méthode de diffusion en milieu solide.

La ciprofloxacine est une fluoroquinolone, qui possède un vaste spectre d'activités contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

III.2. Protocol expérimental

L'évaluation de l'activité antimicrobienne par l'aromatogramme de l'HE et de l'extrait chloroformique de la plante *Salvia microphylla*, a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ; suivant les recommandations de NCCLS (National Comite For Clinical Laboratory Standard) recommandé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), en utilisant les disques stériles de 9mm ; les tests ont été effectués au niveau de laboratoire d'hygiène de la wilaya de BLIDA.

Le Principe de cette méthode consiste à déposer un disque en papier absorbant de 09 mm de diamètre imprégné de la substance à tester sur une boîte de gélose ensemencée de culture microbienne à étudier.

Cette substance au cours de l'incubation diffuse sur la surface de la gélose à partir du disque et un gradient décroissant de concentration s'établit autour du disque donnant à la fin de l'incubation un halo clair autour du ce dernier ; c'est la zone d'inhibition. Le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en mm est proportionnel à l'efficacité de l'activité antimicrobienne de l'échantillon.

a. Souches microbiennes testés :

Les souches microbiennes testées ont été choisies pour leurs fréquences élevées dans les contaminations humaines ; Quatre souches bactériennes et deux souches fongiques ont été testées.

Le tableau suivant représente le code des différentes souches microbiennes utilisées dans notre étude.

Tableau 21 : Codes de différentes souches microbiennes étudiées.

Nature des souches	Souches utilisées	Code de la souche
souches bactériennes	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Bacillus ceureus</i>	ATCC 10876
souches fongiques	<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
	<i>Aspergillus Braziliensis</i>	ATCC 16404

b. Repiquage des souches

Les différentes souches bactériennes et fongiques ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C pour les bactéries et 26 °C pour les levures et les champignons afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

La plupart des souches à tester sont repiqué à partir du milieu de conservation (IPA-Alger) ; en prélevant une petite partie du milieu et l'introduise dans le bouillon nutritive BN.

Après une période de l'incubation de 24 heures ; les souches sontensemencées par stries sur des milieux de cultures appropriés afin de confirmer leurs pureté ; La gélose nutritive pour les souches bactériennes non exigeantes ; La gélose au sang frais pour les *Streptococcus* (bactérie exigeante) ; Milieu OGA ou saboureaud avec ou sans antibiotiques pour les levures.

On note que Le repiquage des souches se fait après chaque semaine.

c. Préparation des milieux de culture

Les milieux standards utilisés sont la gélose de Muller-Hinton stérile (MH) pour les bactéries et Sabouraud stérile (SAB) pour les levures et les champignons.

Les deux milieux ont été coulée dans des boites de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 3 à 4 mm répartie uniformément dans les boites. Ces Dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

d. Préparation des disques

Les disques de 9mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester.

e. Préparation des extraits

L'extrait chloroformique a été solubilisé dans le DMSO pour obtenir une concentration de $80\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Par ailleurs, l'huile essentielle a été utilisée directement sans faire des dilutions.

f. Préparation de l'inoculum

L'inoculum doit être de $2 \text{ à } 3 \cdot 10^6$ bactéries/mL pour obtenir des colonies confluentes. Il est obtenu à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures pour les bactéries et 48h pour les levures sur milieu d'isolement.

L'isolement se fait à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on raclant cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- Décharger la pipette Pasteur dans 10mL d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- homogénéiser la suspension bactérienne, dont l'opacité doit être équivalente à $0,5 \text{ Mc } \mu \text{ Farland}$.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop dilué, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop concentré.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

g. Ensemencement

L'ensemencement est fait à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension microbienne. L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées, répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

L'écouvillon est rechargé à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

h. Dépôt des disques :

A l'aide d'une pince stérile, les disques stérilisés de 9mm de diamètre, sont imbibés et imprégnés par différentes concentrations des solutions à tester. Le volume pris de chaque concentration est de l'ordre de $20 \mu\text{L}$, et sont déposés sur la surface de gélose inoculée avec les souches testées. Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve pendant 24h à 37°C pour les bactéries et 48h à 26°C pour les levures.

i. La lecture :

Le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné a été déterminé à l'aide d'un pied à coulisse, pour les différentes concentrations des différents composés.

II.3. Résultats et discussion

L'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la technique de diffusion sur milieu gélosé en utilisant le milieu Mueller-Hinton (MH) pour les bactéries et Sabouraud (SAB) pour les levures et les champignons. L'activité a été déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits après 24 heures d'incubation à 37°C pour les souches bactériennes et 48 heures à 26°C pour les souches fongiques. Les zones d'inhibition des différents extraits et d'HE ont été mesurées. Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux suivants :

Tableau 22 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait chloroformique, d'HE et d'ATB relatives aux différentes souches bactériennes.

Gram	Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
		Cp	EC	HE
Gram +	<i>Bacillus ceureus</i> ATCC 10876	36	18	18
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	35	24	52
Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	42	13	10
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	34	13	11

« Ciprofloxacine =Cp»

Tableau 23 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait chloroformique, d'HE et des ATFs relatives aux différentes souches fongiques.

Souches fongiques	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	Mr	ApB	EC	HE
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	-	16	-	-
<i>Aspergillus Braziliensis</i> ATCC 16404	-	17	16	65

« Métronidazol=Mr, Amphotéricine B =ApB »

Les résultats mentionnés dans les tableaux 22 et 23, sont représentés dans les histogrammes suivants (figure 27 et 28):

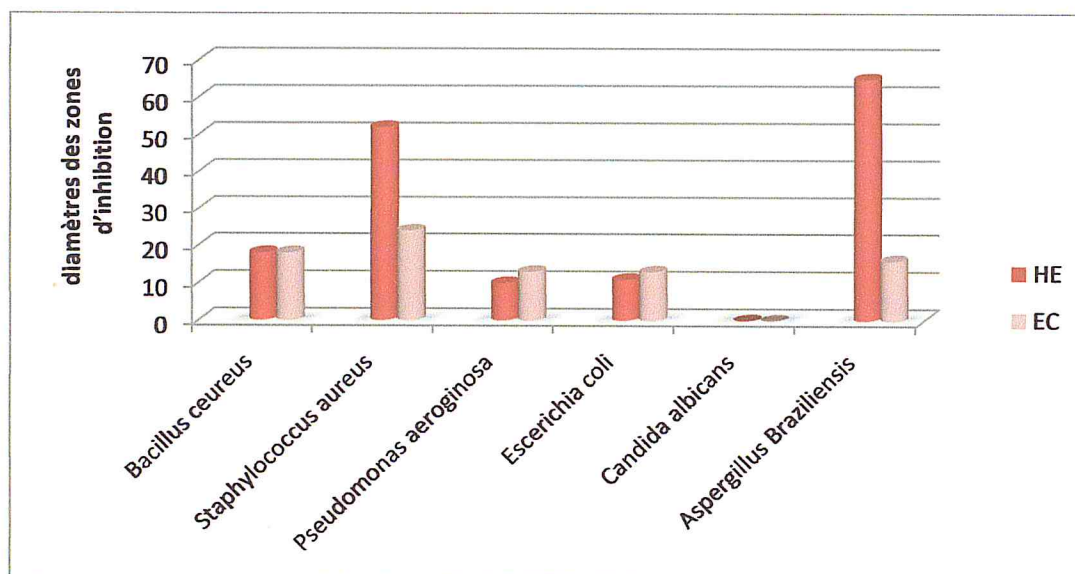


Figure 27 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait chloroformique (EC), de l'huile essentielle (HE) relatives aux différentes souches bactériennes.

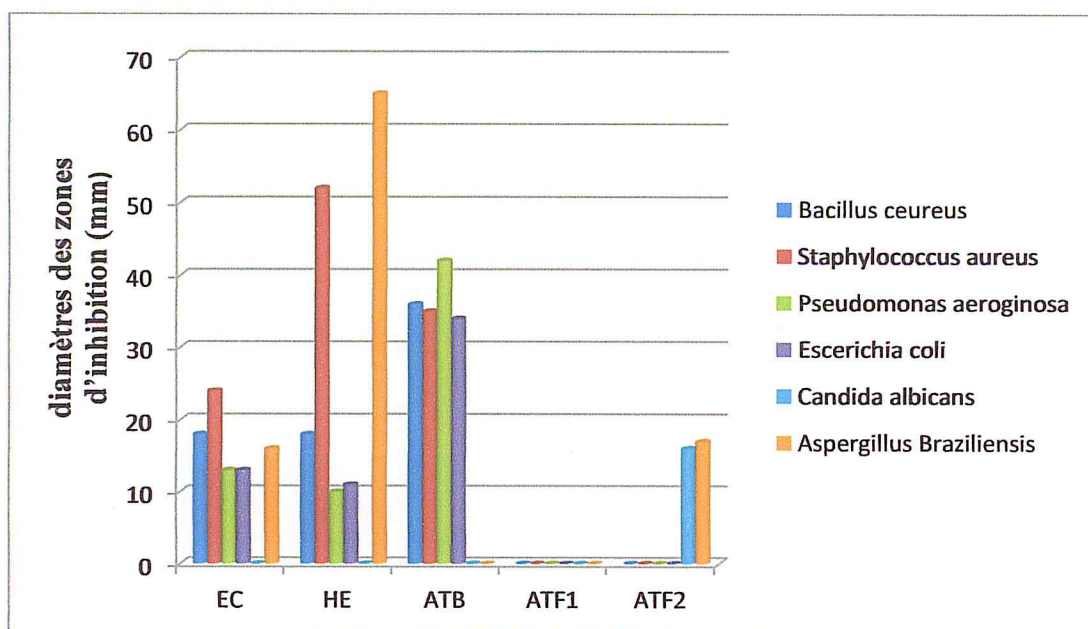


Figure 28 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait chloroformique (EC), de l'huile essentielle (HE), ATB, ATF1 et ATF 2 relatives aux différentes souches antifongiques.

D'après l'histogramme représenté par la figure 27, Les résultats obtenus montrent que la souche bactérienne *Bacillus ceureus* a donné la même zone d'inhibition pour l'extrait chloroformique et l'huile essentielle (18 mm de diamètre). Ce qui nous amène à dire que l'extrait chloroformique et l'huile essentielle sont modérément inhibiteurs vis-à-vis de *Bacillus ceureus*.

L'huile essentielle a une action bactéricide puissante sur la souche *Staphylococcus aureus*. Contrairement à *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeroginosa* qui se sont avérées modérément résistantes.

L'extrait chloroformique est légèrement inhibiteur vis-à-vis d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeroginosa*, présentant des zones d'inhibition de 13 mm, et a une action modérément inhibitrice contre la bactérie *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus pour les souches antifongiques testées ont montré que la souche *Candida albicans* est résistante pour l'extrait chloroformique et l'HE de *Salvia microphylla* (absence totale de zone d'inhibition). Par contre, la deuxième souche *Aspergillus Braziliensis* révèle une sensibilité très puissante et importante pour l'HE et une résistances légère (intermédiairement sensible) vis-à-vis l'extrait chloroformique (18 mm de diamètre).

D'après l'histogramme représenté par la figure 28, la ciprofloxacine a une action inhibitrice sur la croissance de toutes les souches bactériennes testées et on constate que la souche *E. coli* est moins sensible à l'antibiotique par rapport aux autres souches. Par contre, toutes les souches sont résistantes pour le Métronidazol et l'Amphotéricine B sauf les deux souches *Candida albicans* et *Aspergillus Braziliensis* qui se sont avérées légèrement résistantes vis-à-vis de l'Amphotéricine B.

Selon les résultats représentés dans les tableaux et les histogrammes, en conclure que l'extraits chloroformique et l'HE ont présentés une activité antibactérienne très importante vis-à-vis des bactéries à Gram positif, à savoir : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, tandis que la bactérie à Grams négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une faible activité antibactérienne.

Par ailleurs, l'huile essentielle de *Salvia microphylla* a montré une activité antifongique intéressante, notamment vis-à-vis la souche *Aspergillus Braziliensis*. Par contre, aucune activité antifongique n'a été démontré vis-à-vis la souche *Candida albicans*.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Burt¹⁴³, qui a montré que les bactéries à Gram négatif sont généralement plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram-positif (Tableau 22).

Conclusion

Comme nous avons mentionné au début de cette recherche, notre objectif principal était l'étude phytochimique et l'évaluation biologique d'une plante de la flore Algérienne, *Salvia microphylla*.

L'extraction des parties aériennes de l'espèce *Salvia microphylla*, suivie de séparation chromatographiques successives (CCM, CP), a montré la richesse des extraits acétate d'éthyle et butanolique en flavonoïdes. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse HPLC.

L'évaluation de l'activité antiradicalaire de nos extraits (EAc et EB), par la méthode de DPPH a montré une excellente activité antioxydante de l'extrait butanolique. Il apparaît que celui qui est plus riche en polyphénols est le moins antioxydant. Ceci peut être expliqué par la présence d'autres métabolites dans l'extrait butanolique qui augmentent son activité antioxydante.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielles de l'espèce *Salvia microphylla* a montré que cette huile est majoritairement composée de Sclaral ou Sclareolides lactol (5.72%) et acétate de β -Fenchol (6.36%).

L'activité antimicrobienne de l'extrait chloroformique et de l'huile essentielle du *Salvia microphylla* a été testée, par la méthode de diffusion sur disque, vis-à-vis de souches microbiennes suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus ceureus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 24433, *Aspergillus Braziliensis* ATCC 16404.

L'extrait chloroformique et l'HE ont présentés une activité antibactérienne très importante vis-à-vis des bactéries à Gram positif, à savoir : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, tandis que la bactérie à Grams négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une faible activité antibactérienne.

L'huile essentielle de *Salvia microphylla* a manifesté une bonne activité antifongique, vis-à-vis la souche *Aspergillus Braziliensis*.

1. P.A. Cox, M.J. Balick; « *The ethnobotanical approach to drug discovery* »; Journal of Science American; 270(6), 82-87; 1994.
2. D.J. Newman, G.M. Cragg; « *Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years* »; of Natural Products; 70, 461-477; 2007.
3. P. Quezel, S. Santa; « *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertique méridionales* »; Tome 1; C.N.R.S; Paris; 1963.
4. I.C. Hedge; « *A global survey of the biography of the Labiatae* »; Ed R.M. Harley and T. Reynolds; Advances in Labiatae Science; pp7-77; 1992.
5. J.R. Hanson; « *in Terpenoids and Steroids Specialist Periodical Reports* »; the chemical Society, and Nat. Prod. Reports; London; 1-12; 1984-1995.
6. A. Ulubelen, G. Topcu; « *Studies in Natural Products Chemistry* »; Ed In atta-ur-Rahman; 20-659; 1998.
7. L. H. Bailey; « *Manual of Cultivated Plants* »; 1924.
8. J.B. Walker, K.J. Sytsma, J. Treutlein, M. Wink; « *Salvia (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of Salvia and tribe Mentheae* »; American Journal of Botany; 91 (7): 1115–25; 2004.
9. F. Salimpour, A. Mazooji, S.A. Darzikolaei ; « *Chemotaxonomy of six Salvia species using essential oil composition markers* »; Journal of Medicinal Plants Research; 5, 1795-1805; 2011.
10. R.M. Auge, A.J.W. Stodola, J.L. Moore, W.E. Klingeman, X. Duan; « *Comparative dehydration tolerance of foliage of several ornamental crops* »; Scientia Horticulture; 98, 511-516; 2003.
11. S.Y. Ryu, C.O. Lee, S.U. Choi; « *In vitro cytotoxicity of tanshinones from Salvia miltiorrhiza* »; Planta Medica; 63, 339-342; 1997.
12. A.P. Longaray Delamare, I.T. Moschen-Pistorello, L. Artico, L. Atti-Serafini, S. Echeverrigaray; « *Antibacterial activity of the essential oils of Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil* »; Food Chemistry; 100, 603-608; 2006.

13. M.R. Loizzo, R. Tundis, F. Menichini, A.M. Saab, G.A. Statti, F. Menichini ; « *Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models* »; *Anticancer Research*; 27, 3293-3299; 2007.
14. M. Kelen, B. Tepe; « *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora* »; *Bioresource Technology*; 99, 4096-4104; 2008.
15. M.R. Loizzo, A.M. Saab, R. Tundis, F. Menichini, M. Bonesi, V. Piccolo, G.A. Statti, B. de Cindio, P.J. Houghton; « *In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes* »; *Journal of Ethnopharmacology*; 119, 109-116; 2008.
16. M. Akaberi, S.Mehrib, M. Iranshahi; « *Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from Salvia species* »; *Fitoterapia*; 100, 118-132; 2015.
17. H. J. Zhang, L. N. Li; « *Salvianolic Acid I: A New Depside from Salvia cavaleriei* »; *Planta Medica*; 60(1), 2-70 ; 1994.
18. A. Peana, M. Satta, M. D. Moretti, M. Orecchioni; « *A study on choleric activity of Salvia desoleana essential oil* »; *Planta Medica*; 60(5),9-478; 1994.
19. G. Yeşilada Honda, E. Sezik et al ; «*Traditional medicine in Turkey IV, Folk medicine in Mediterranean Subdivision* »; *J. Ethnopharmacol*; 39, 31-38; 1993.
20. G. Fiore, C. Nencini, F. Cavallo, A. Capasso, A. Bader, G. Giorgi, L. Micheli; « *In vitro antiproliferative effect of six Salvia species on human tumor cell lines* »; *Phytotherapy Research*; 20, 701-703; 2006.
21. M. Canzoneri, M. Bruno, S. Rosselli, A. Russo, V. Cardile, C . Formisano, D. Rigano, F. Senatore; « *Chemical composition and biological activity of Salvia verbenaca essential oil*»; *Nat Prod Commun*; 6,1023-1026; 2011.
22. T. Barboni; « *Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie* » ; Thèse de Doctorat ; l'université de Corse ; p26; 2006.
23. G.P. Ribereau ; « *Les composés phénoliques des végétaux* » ; Dunod ; Paris, p254 ; 1968.

24. M. Wang, H. Kikuzaki, N. Zhu, S. Sang, N. Nakatani, C.T. Ho; « *Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (Salvia officinalis L.)* »; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 48, 235-238; 2000.
25. Z. Wu, M. Ouyang, C. Yang ; « *Polyphenolic constituents of Salvia sonchifolia* »; Yunnan Zhiwu Yanjiu ,21, 393-398; Chemical Abstracts,132, 205-422; 1999a.
26. M.E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset; « *Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary* »; Journal of the American Oil Chemists Society; 73, 645-652; 1996.
27. G. Topcu, N. Tan, A. Ulubelen, D. Sun, W.H. Watson; « *Terpenoids and flavonoids from the aerial parts of Salvia candidissima* »; Phytochemistry ;40, 501-504; 1995.
28. A. Ulubelen, E. Tuzlaci; « *Flavonoids and triterpenoids from Salvia euphratica and S. longipedicellata* »; Fitoterapia; 61, 185; 1990.
29. M.M. El-Missiry, H.A. Hussiney, S.I. Ismail, H.M. Radwan, A.M. Rizk; « *Constituents of plants growing in Qatar XXIV Phytochemical investigation of Salvia aegyptiaca L.* »; Chemical Abstracts (124,337868z); Science Journal ;14, 249-251; 1994.
30. A.H. Mericli, F. Mericli, N. Tanker, M. Koyuncu; « *Constituents of Salvia albimaculata. II. Marmara* »; Chemical Abstracts (110, 237002e); 3, 53-55; 1987.
31. J. Li, L. Li, W. Song; « *Chemical constituents of root of Bowley sage (Salvia bowleyana)* »; Chemical Abstracts (121, 251274d); 25, 347-349. 1994.
32. B. Doganis; « *Pharmacognostical study of Salvia* »; Chemical Abstracts (78, 33856x); 27, 127; 1971.
33. E. Kokkalou, I. Kapetanidis ; « *Flavonoides et acides phenoliques de Salvia horminum L. (Lamiaceae)* »; Pharmaceutica Acta Helvetiae ; 63, 90-92 ; 1988.
34. S. Shamsudinov, S.F. Dzhumyrko, A.V. Simonyan ; « *Polyphenols and triterpenes from Salvia limbata* »; Chemical Abstracts (91, 35706r) ; 95; 1995.
35. Y. Jiang, S. Luo, M. Zheng; « *Active principles of Salvia plebeia* »; Chemical Abstracts (107, 233142r) ;18, 349-351; 1987.

36. C. Yang, B. Zhang; « *Extraction and isolation of water-soluble active constituent, Dan Shen Su, from Salvia miltiorrhiza and preparation of injections* »; Chemical Abstracts (96, 223077p); 16, 646-647; 1981.
37. B.L. Zhao, W. Jiang, Y. Zhao, J.H. Wu, W.J. Xin; « *Scavenging effects of Salvia miltiorrhiza on free radicals and its protection for myocardial mitochondrial membranes from ischemiareperfusion injury* »; Biochemistry and Molecular Biology International; 38, 1171-1182; 1996.
38. C.B. Ai, Q.H. Deng, W.Z. Song, L.N. Li; « *Salvianolic acid J, a depside from Salvia flava* »; Phytochemistry; 37, 907-908; 1994.
39. C.B. Ai, L.N. Li; « *Stereostructure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from Salvia miltiorrhiza* »; Journal of Natural Products; 51, 145-149; 1988.
40. M. Wang, J. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E.J. La Voie, T.C. Huang, C.T. Ho; « *Antioxidative phenolic compounds from sage (Salvia officinalis)* »; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 46, 4869-4873; 1998.
41. C.B. Ai, L.N. Li; « *Salvianolic acid G, a caffeic acid dimer with a novel tetracyclic skeleton* »; Chinese Chemical Letters; 2, 17-18; 1991.
42. C.B. Ai, L.N. Li; « *Synthesis of tetramethyl salvianolic acid Fand (–)-trimethyl przewalskinic acid A* »; Chinese Chemical Letters; 7, 427-430; 1996.
43. Y. Tezuka, R. Kasimu, J.X. Li, P. Basnet, K. Tanaka, T. Namba, S. Kadota; « *Constituents of roots of Salvia deserta Schang. (Xinjiang-Danshen)* » ; Chemical and Pharmaceutical Bulletin; 46, 107-112; 1998.
44. L.N. Li, R. Tan, W.M. Chen; « *Salvianolic acid A, a new depside from roots of Salvia miltiorrhiza* »; Planta Medica; 50, 227-228; 1984.
45. Y. Lu, L.Y. Foo; « *Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from Salvia officinalis* »; Tetrahedron Letters; 42, 8223-8225; 2001b.
46. Y. Lu, L.Y. Foo; « *Flavonoid and phenolic glycosides from Salvia officinalis* »; Phytochemistry; 55, 263-267; 2000.

47. B. Winkel-Shirley; « *Biosynthesis of flavonoids and effects of stress* »; *Current Opinio in Plant Biology*; 5, 218-223; 2002.
48. N. Z. Sagdullaeva, R. L. Khazanovich; « *Flavone substances of some Salvia species growing in Uzbekistan* »; *Chemical Abstracts* (78, 94820c); 17-19; 1972.
49. L.P. Smirnova, V.I. Glyzin, A.V. Patudin, A.I. Ban'kovskii; « *Flavones from some Salvia species* »; *Chemical Abstracts* (82, 83016b); 10, 668-669; 1974b.
50. T. Adzet, S. Canigueral, J. Iglesias; « *A chromatographic survey of polyphenols from Salvia species* »; *Biochemical Systematics and Ecology*; 16, 29-32; 1987.
51. F.A. Tomas-Barberan, E. Wollenweber; « *Flavonoid aglycons* »; *Phytochemistry* ; 59, 117-140; 2002.
52. E. Wollenweber; « *Flavones and flavonoids in exudate of Salvia glutinosa* »; *Phytochemistry*; 13,753; 1974.
53. E. Wollenweber, M. Dorr, A. Rustaiyan, J.N. Roitman, E.H. Graven; « *Exudate flavonoids of some Salvia and a Trichostema species* »; *Zeitschrift fur Naturforschung*; 47c, 782-784; 1992.
54. J. Camarasa, S. Canigueral, J. Iglesias, E. Martin; « *Flavonic aglycones from the leaves of Salvia verbenaca L. 5-hydroxy-40,7- dimethoxyflavone, a new flavonoid in the genus Salvia* »; *Plantes Medicinales et Phytotherapie*; 16, 192-196; 1982.
55. A. Ulubelen, M. Miski, P. Neuman, T.J. Mabry; « *Flavonoids of Salvia tomentosa (Labiatae)* »; *Journal of Natural Products*; 42, 261-263; 1979.
56. G.A. Miana, M.S. Deep, A.H. Hassan, M.G. Hassan; « *The isolation and characterization of salvigenin, a flavone from Salvia lanigera* »; *Journal of Chemical Society of Pakistan*; 7, 67-68; 1985.
57. A. Ulubelen, S. Ozturk, S. Isildatici; « *A new flavone from Salvia triloba* »; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 57, 1037-1038; 1968.
58. C.H. Brieskorn, Z. Kapadia; « *Constituents of Salvia officinalis. XXIII: 5-Methoxysalvigenin in leaves of Salvia officinalis* »; *Planta Medica*; 35, 376-378; 1979.

59. H. Viola, M. Marder, C. Wolfman, C. Wasowski, J.H. Medina, A.C. Paladini; «*Central nervous system effects of natural and synthetic flavonoids* »; Chemical Abstracts (130, 218145a); 86, 229-236; 1998.
60. M.R.I. Saleh, N.N. Sabri; «*Phytochemical study of the herb, Salvia verbenaca* »; Journal of Drug Research; 12, 131-137; 1980.
61. J. Rodriguez, H. Tello, L. Quijano; «*Flavonoids of Mexican plants. Isolation and structure of santin and glucoferide* »; Chemical Abstracts (83, 132746e); 5, 41-53; 1974.
62. H.C. Gupta, K.N.N. Ayengar, S. Rangaswami; «*Structure and synthesis of salvitin, a new flavone isolated from Salvia plebeia* »; Indian Journal of Chemistry; 13, 215-217; 1975.
63. C.C. Chen, H.T. Chen, Y.P. Chen, H.Y. Hsu, T.C. Hsieh; «*Isolation of the components of Salviae miltiorrhizae radix and their coronary dilator activities* »; Chemical Abstracts (107, 211619z); 38, 226-230; 1986.
64. N.C. Veitch, R.J. Grayer, J.L. Irwin, K. Takeda; «*Flavonoid cellobiosides from Salvia uliginosa* »; Phytochemistry; 48, 389-393; 1998.
65. I. Masterova, D. Uhrin, V. Kettmann, V. Suchy; «*Phytochemical study of Salvia officinalis L* »; Chemical Abstracts (112, 731917v); Chemical Papers; 43, 797-803; 1989.
66. L. Zhao, X. Liang, L. Li; «*Two minor phenolic glycoside from Salvia cavaleriei* »; Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences; 6, 111-112; 1997.
67. S. Asen; «*Anthocyanins in flowers of Salvia splendens cultivar Violet Flame* »; Proceedings of the American Society for Horticultural Science; 78, 586-592; 1961.
68. A. Cornu, M. Paynot; «*Heredity and chromatographic analysis of the anthocyanin pigments in the flowers and bracts of Salvia horminum* »; Chemical Abstracts (71,57688a); Ann. Amélior. Plant; 19, 5-13; 1969.
69. R. Willstätter, E.K. Bolton; «*Anthocyanins. XI. The anthocyan of red-flowering varieties of Salvia* »; Liebigs Annalen; 412, 113-136; 1916.
70. T. Kondo, M. Yoshikane, K. Yoshida, T. Goto; «*Structure of anthocyanins in scarlet, purple, and blue flowers of Salvia* »; Tetrahedron Letters; 30; 6729-6732; 1989.

71. T. Ishikawa, T. Kondo, T. Kinoshita, H. Haruyama, S. Inaba, K. Takeda, R.J. Grayer, N.C. Veitch; « *An acetylated anthocyanin from the blue petals of Salvia uliginosa* »; *Phytochemistry* ; 52, 517-521; 1999.
72. M. Malecky; « *Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins* » ; thèse de Doctorat ; Paris ; p 9, 13-19, 20, 27; 2005.
73. O. Benaïssa; « *Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres Chrysanthemum et Rhantherium. Activité Biologique* »; Thèse Doctorat; université Mentouri, Constantine; p63; 2011.
74. H. Belbache; « *Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de Centaurea Parviflora Desf* »; mémoire de magister; Université Mentouri, Costantine ; p16-2; 2003.
75. R. Ayad; « *recherche et d2termination structural des métabolites secondaires de l'espèce zygophyllum cornutum* »; mémoir magister ; université Mentounri, Costantine ; pp 35-47; 2008.
76. A. Ulubelen, G. Topcu, E. Tuzlac; « *New Diterpenoids from Salvia divaricata* »; *J. Nat. Prod*; 55, 1518-1521; 1992.
77. A. Ulubelen, G. Topcu, U. Sonmez, C. Eris, U. Ozgen; « *Norsesterterpenes and diterpenes from the aerial parts of Salvia limbata* »; *Phytochemistry* ; 43, 431-434; 1996.
78. A. Ulubelen, E. Tuzlac; « *Terpenoids from Salvia potentillifolia* »; *Planta Medica* ; 53, 578; 1987.
79. A. Ulubelen, G. Topcu, C. Eris, U. Sonmez, M. Kartal, S. Kurucu, C. Bozok-Johansson; « *Terpenoids from Salvia sclarea* »; *Phytochemistry*; 36, 971-974; 1994.
80. G. Topcu, M. Kartal, A. Ulubelen; « *Terpenoids from Salvia tchihatcheffii* »; *Phytochemistry*; 44, 1393-1395; 1997.
81. G. Topcu, A. Ulubelen, T.C.M. Tam, C. Tao-Che; « *Sesterterpenes and other constituents of Salvia yosgadensis* »; *Phytochemistry*; 42, 1089-1092; 1996.
82. G. Gokdil, G. Topcu, U. Sonmez, A. Ulubelen; « *Terpenoids and flavonoids from Salvia cyanescens* »; *Phytochemistry*; 46, 799-800; 1997.

83. T.K. John, G.S. Rao Krishna; « *Studie in terpenoids.Part 43*:Synthesis(+)-2,6-diméthyl-10-(ptolyl) undeca-2,6-(E)-diène, the diterpene of Salvia dorisiana* »; Proc. Indian Acad. Sci.A ; 87A(8), 235-238 ; 1978.
84. A.Ulubelen, N.Tan, G. Topcu ; «*Terpenoids from Salvia candidissima subsp. Candidissima* »; Phytochemistry ; 45, 1221-1223 ; 1997.
85. A. Ulubelen, G. Topcu, N. Tan; « *Diterpenoids from Salvia candidissima* »; Tetrahedron Letters; 33, 7241-7244; 1992.
86. B. Esquivel, A. Vallejo, R. Gavino, J. Cardenas, A. A. Sanchez, T. P. Ramamoorthy, L. Rodriguez-Hahn; «*Clerodane diterpenoids from Salvia melissodora* »; Phytochemistry; 27, 2903-2905; 1988.
87. E. Maldonado, A. Ortega; « *Polystachynes A-E, five cis-neo-clerodane diterpenoids from Salvia polystachya* »; Phytochemistry; 53, 103; 2000.
88. M. D Fernandez, B. Esquivel, J. Cardenas, A.A. Sanchez, R.A. Toscano, L. Rodriguez-Hahn; « *Clerodane and aromatic seco-clerodane diterpenoids from salvia rhyacophua* »; Tetrahedron; 47, 7199-7208; 1991.
89. M.Nieto, O. Gallardo V., P. C. Rossomando, C. E. Tonn; « *8-HYDROXYSALVIARIN AND 7,8-DIDEHYDRORHYACOPHILINE, 2 NEW DITERPENES FROM SALVIA-REFLEXA*»; J. Nat. Prod; 59, 880-882;1996.
90. B. Esquivel, R. M. Dominguez, S. H. Ortega, R. A. Toscano, L. Rodriguez- Hahn; « *Salvigenane and isoalvipuberulan diterpenoids from Salvia leucantha* »; Tetrahedron; 50, 11593-600; 1994.
91. A. Bisio, N. Fontana, G. Romussi, G. Ciarallo, N. De Tommasi, C. Pizza, A. Mugnoli; «*Clerodane diterpenoids from Salvia blepharophylla* »; Phytochemistry; 52, 1535-1540; 1999.
92. A. Ulubelen, G. Topcu, N. Tan; «*Rearranged abietane diterpenes from Salvia candidissima* »; Phytochemistry; 31, 3637-3638; 1992.
93. E. M. Guajardo Touché., E.Gomez Lopez., A. Reyes P., H. Sanchez, F. Honcker., H. Achenbach; « *Parryin, a diterpene with a tricyclic 6-7-5-ring system from Salvia parryi* »; Phytochemistry; 4, 387; 1997.

94. A. Ulubelen ; N. Tan; G. Topcu; D. Sun; W.H. Watson; «TERPENOIDS AND FLAVONOIDS FROM THE AERIAL PARTS OF SALVIA-CANDIDISSIMA »; *Phytochemistry*; 40, 501-504; 1995.
95. A. Ulubelen, G. Topcu, N. Tan; «*diterpenoids from Salvia heldrichiana* »; *Phytochemistry* ; 40, 1473-1475; 1995.
96. B. Esquivel, J.S. Calderon, A.A. Sanchez, T.P. Ramamoorthy, E.A. Flores, R.M. Dominguez; *Rev. Latinoamer. Quim*; 24, 44; 1996.
97. A. Ulubelen, G. Topcu, C.B. Johansson; « *Norditerpenoids and diterpenoids from Salvia multicaulis with antituberculous activity* »; *J. Nat. Prod*; 60, 1275-80; 1997.
98. B.Ahmed; T.A. Al-Howiriny, A.J. Al-Rehaily, J.S. Mossa ; «*Verbenacine and Salvinine :new diterpenes from Salvia verbenacer*»; *Zeitschrift fur Naturforschung C*; 9-14; 2004.
99. G. Cioffi, A. Bader, A. Malafronte, F.D.Piaz, N.D. Tommasi; « *Secondary metabolites from the aerial parts of Salvia palaestina Bentham* »; *Phytochemistry*; 69, 1005-1012; 2008.
100. M.I. houdhary, A. Hussain, A. Adhikari, B.P. Marasini, S.A. Sattar, N. Hussain, S.A. Majid Ayatollahi, A. Rahman; « *Anticancer and α -chymotrypsin inhibiting diterpenes and triterpenes from Salvia leriifolia* »; *Phytochemistry Letters*; 6; 139-143; 2013.
101. G. Buchbauer, W. Jäger, L. Jirovetz, J. Ilmberger, H. Dietrich; « *Therapeutic properties of essential oils and fragrances. In: Bioactive Volatile Compounds from Plants* »; *Amer.Chem. Soc*; 159-165; 1993.
102. G. Roulier; « *Les huiles essentielles pour votre santé Traité pratique d'aromathérapie, propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes*»; Ed Dangles; France; 1992.
103. AFNOR; « *Huiles essentielles, Tome 1- Echantillonnage et méthode d'analyse, Tome 2- Monographies relatives aux huiles essentielles* »; 6ème édition; Afnor; Paris, France; 2000.
104. J.P. Durvelle; «*Fabrication des essences et des parfums : Extraction des essences et des parfums par distillation, par expression et par les dissolvants* »; J. Fritsch; Paris, France; 1893.

105. E. Charabot, J. Dupont, L. Pillet; « *Les huiles essentielles et leurs principaux constituants* »; C. Beranger; Paris, France; 1899.
106. S. B. Unsicker, G. Kunert, J. Gershenzon; « *Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores* »; *Curr. Opin. Plant Biol*; 12(4), 479-485; 2009.
107. C. Duraffourd, J.C. Lapraz; « *Examen de Laboratoire. In Traité de phytothérapie clinique* »; Edition Masson; pp,120-123; 2002.
108. T. Kato, H. Lijima, K. Ishihara, T. Kanek, K. Hirai, Y. Naito, K. Okuda; « *Antibacterial effect of listerine on oral bacteria* »; *Bull. Tokyo. Dent. Coll*; 31(4), 301-307; 1990.
109. K. Ronniger; « *Die britishen Arten und Formen* »; *Feddes Repert*; 20, 321; 1924.
110. V. Cardile, A. Russob, C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, N.A. Arnold, F. Piozzi; « *Essential oils of Salvia bracteata and Salvia rubifolia from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells* »; *Journal of Ethnopharmacology*; 126, 265-272; 2009.
111. T. Askun, K.H.C. Baser, G. Tumen, M. Kurkcuglu; « *Characterization of essential oils of some Salvia species and their antimycobacterial activities* »; *TUBİTAK*; 34;89-95; 2010.
112. M. Akin, B. Demirci, Yavuz Bagci, K.H.C. Baser; « *Antibacterial activity and composition of the essential oils of two endemic Salvia sp. from Turkey* »; *Journal of Biotechnology*; 9(15), 2322-2327; 2010.
113. A. Russo, C. Formisano, D. Rigano, V. Cardile, N.A. Arnold, F. Senatore; « *Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three lebanese Salvia species* »; *Industrial Crops and Products*; 83, 492-499; 2016.
114. R. Sepahvand, B. Delfan, S. Ghanbarzadeh, M. Rashidipour, G.H. Veiskarami, J. Ghasemian-Yadegari; « *Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of Salvia sclareoides* »; *Journal of Tropical Biomedicine*; 5(1), 930-935; 2014.

115. B. Kunduhoglu, M. Kurkcuoglu, M.E. Duru, K.H. Can Baser; «Antimicrobial and anticholinesterase activities of the essential oils isolated from *Salvia dicroantha* Stapf, *Salvia verticillata* L. subsp. *amasiaca* (Freyn and Bornm.) Bornm. and *Salvia wiedemannii* Boiss »; *Journal of Medicinal Plants Research*; 5(29), 6484-6490; 2011.
116. M. Yousefzadi, A. Sonboli, F. Karimi, S.N. Ebrahimi, B. Asghari, A. Zeinalia; « *Antimicrobial Activity of Some Salvia Species Essential Oils from Iran* »; *Z. Naturforsch.*, 514-518; 2007.
117. H. Lakhal, H. Ghorab, S. Chibani, A. Kabouche, Z. Semra, F. Smati, S. Abuhamdah, Z. Kabouche; « *Chemical composition and biological activities of the essential oil of Salvia officinalis from Batna (Algeria)* »; *Der Pharmacia Lettre*; 5 (3),310-314; 2013.
118. A. Russo, V. Cardile, A.C.E. Grazianob, C. Formisano, D. Rigano, M. Canzoneri, M. Bruno, F. Senatore; « *Comparison of essential oil components and in vitro anticancer activity in wild and cultivated Salvia verbenaca* »; *Natural Product Research*;10,1080; 2014.
119. M. Ben taarit, K. Msaada, K. Hosni, T. Chahed, B. Marzouk; « *ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF SALVIA VERBENACA L. GROWING WILD IN TUNISIA* »; *Journal of Food Biochemistry*; 34, 142-151; 2010.
120. H.I. Al-Jaber, M.A. Al-Qudah, L.M. Barhoumi, I.F. Abaza, Fatma U. Afifi; « *Essential oil composition of the aerial parts of fresh and air-dried Salvia palaestina Benth. (Lamiaceae) growing wild in Jordan* »; *Natural Product Research*; 26, 1179-1187; 2012.
121. A. Marchev, I. Ivanov, P. Denev, M. Nikolova, V. Gochev, A. Stoyanova, A. Pavlov, V. Georgiev; « *Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant, and antimicrobial activities of Salvia tomentosa Mill. essential oil* »; *J. BioSci. Biotechnol*, 4(2), 219-229; 2015.
122. A. Jacques; « *Les noms des plantes dans la Rome antique* »; Les Belles Lettres; 2010.
123. A. Allon Jenks; « *Systematics and Ethnobotany of Salvia Subgenus Calosphace and Origins of the Hallucinogenic Sage, Salvia divinorum, Dissertation* »; University of California; 2009.
124. Z. Aydoğmuş, V. Yeşilyurt, G. Topcu; « *Constituents of Salvia microphylla* »; *Natural Product Research*; 20,775-781; 2006.
125. E. Bautista, R.A. Toscano, A. Ortega; « *Microphyllandioliide, a New Diterpene with*

an Unprecedented Skeleton from Salvia microphylla »;ORGANIC LETTERS; 15, 3210-3213; 2013.

126. B. Esquivel, N. Del Socorro Martinez, J. Cardenas, T.P. Ramamoorthy, L. Rodriguez-Hahn; «*The pimarane-type diterpenoids of Salvia microphylla var. neurepia* »; Planta Med; 55, 62-63; 1989.

127. B. Esquivel, J. Cardenas, L. Rodriguez-Hahn, T. P. Ramamoorthy; «*The Diterpenoid Constituents of Salvia fulgens and Salvia microphylla* »; J. Nat. Prod; 50, 738-740; 1987.

128. Z. Aydogmuş, V. Yeşilyurt, G. Topcu; «*Constituents of Salvia microphylla* »; Natural Product Research, Formerly Natural Product Letters; 20; 2006.

129. R.K. Lima, M.d. Gracas Cardoso, M.A. Andrade, P.L. Guimaraes, L.R. Batista, D.L. Nelson; «*Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from Myristica fragrans Houtt and Salvia microphylla H.B.K* »; J Am Oil Chem Soc; 89, 523-528; 2012.

130. M. Lahouel; «*Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux* »; Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine; 2005.

131. K.R. Markham; «*Techniques of flavonoids identification* »; Academic press; p144 London; 1982.

132. J. B. German, R. L. Walzem; «*The health benefits of wine Annu* »; Rev. Nutr; 20, 561- 593; 2000.

133. S. McDonald, P.D. Prenzler, M. Antolovich, K. Robards; «*Phenolic Content and Antioxidant Activity of Olive Extracts* »; Food Chemistry; 73, 73-84; 2001.

134. T.S. Kujala, J.M. Lojonen, K.D. Klika, K. Pihlaja; «*Phenolic and betacyanins in red beetroot (Beta vulgaris) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds* »; J. Agric. Food Chem; 48, 5338-5342; 2000.

135. M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards; «*Methods for testing antioxidant activity* »; Analyst;127,183-198; 2002.

136. M.S. Blois; «*Antioxidant determinations by the use of stable free radical* »; Nature; 181, 1199-1200; 1958.

137. W. Siegenthaler, R. Luthy; « *Current chemotherapy. Proceeding 10th international congress of hemotherapy II* »; Washington DC. Am. Soc. Microbial; 1978.

138. H. Dabena; « *Infectiologie de A à Z. Ed. Arnette* »; France; 500-502; 1997.

139. B. Dayal, R.M. Purohit; « *Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity* »; The flavor industry; 2,484-485; 1971.

140. M. Viuda-Martos , R.N. Yolanda , Z. Sánchez , F. Fernández-López , A. José; « *Antibacterial activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet* »; Flavour Fragrance Journal; 25, 13–19; 2010.

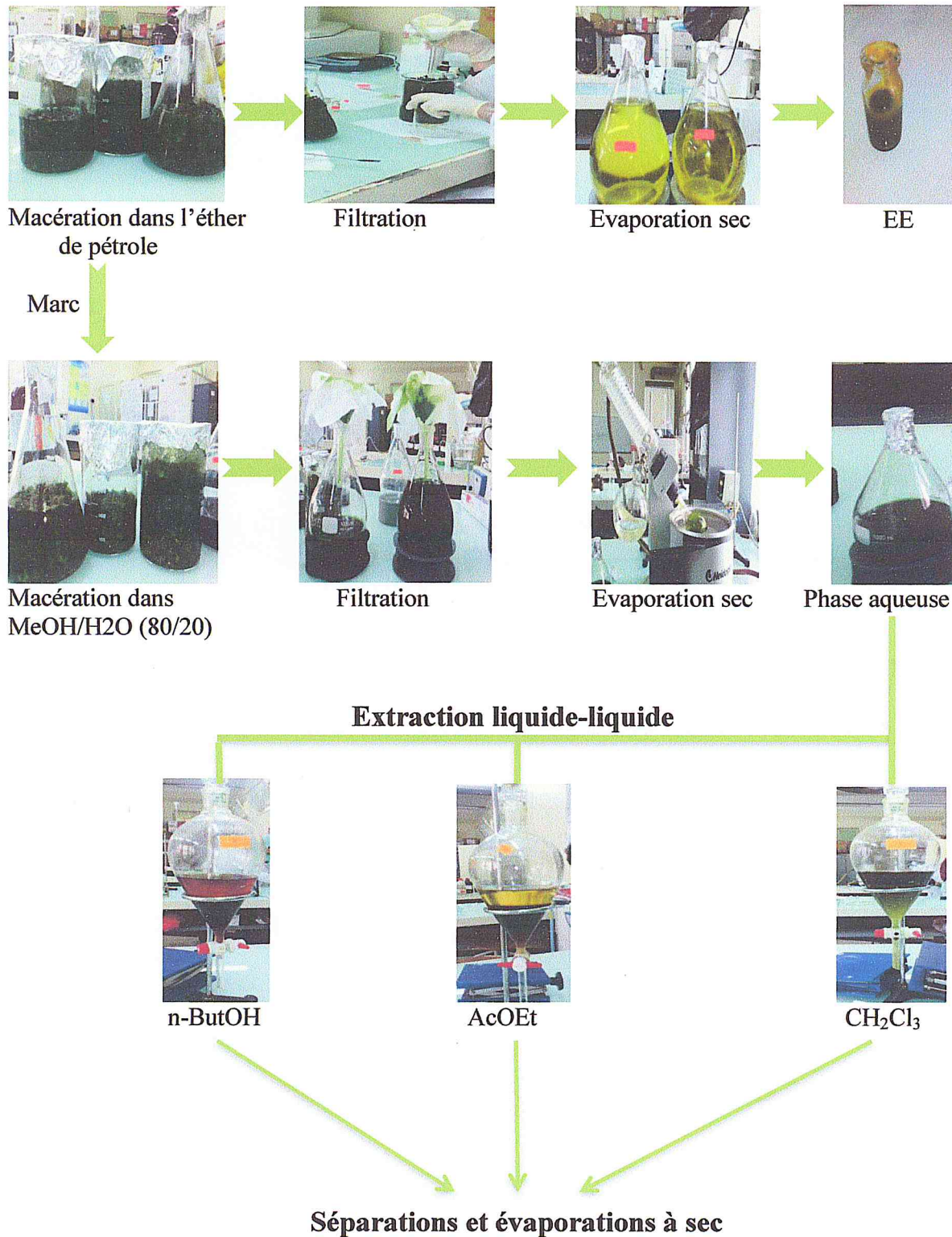
141. S. M. Tharib, S.O. Gnan, G.B.A. Veitch; « *Antimicrobial activity of compounds from Artemisia campestris* »; J. Food. Prot; 46, 681-685; 1983.

142. E. Emst, M.H. Pittler; « *Médecines alternatives: le guide critique*»; Ed. Elsevier Masson; 36; 2005.

143. I. S. Burt; « *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods* »; a review. Inter J Food Microbiol; 94, 223-253; 2004.

Annexe 1

• Protocole d'extraction au laboratoire



Annexe 2

- Différents extraits de la plante *Salvia microphylla*



Extrait éther
de pétrole



Extrait chloroformique



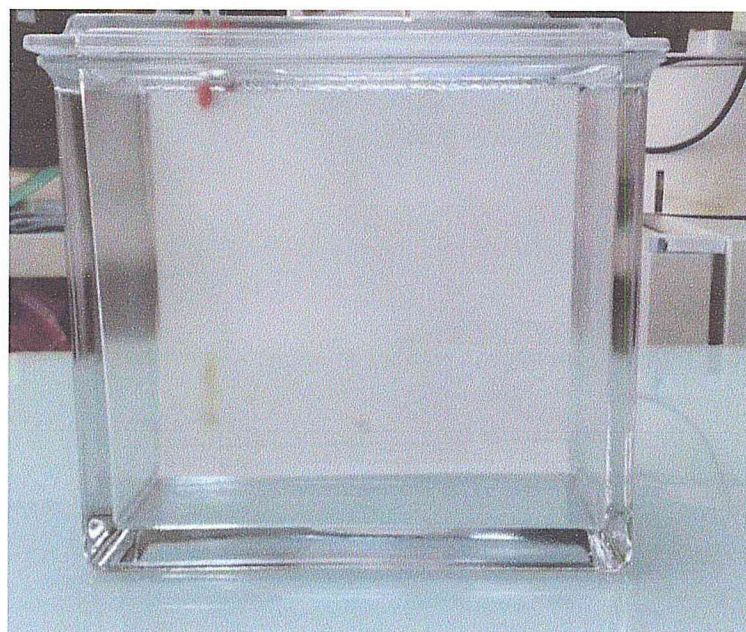
Extrait AcOET



Extrait n-butanolique

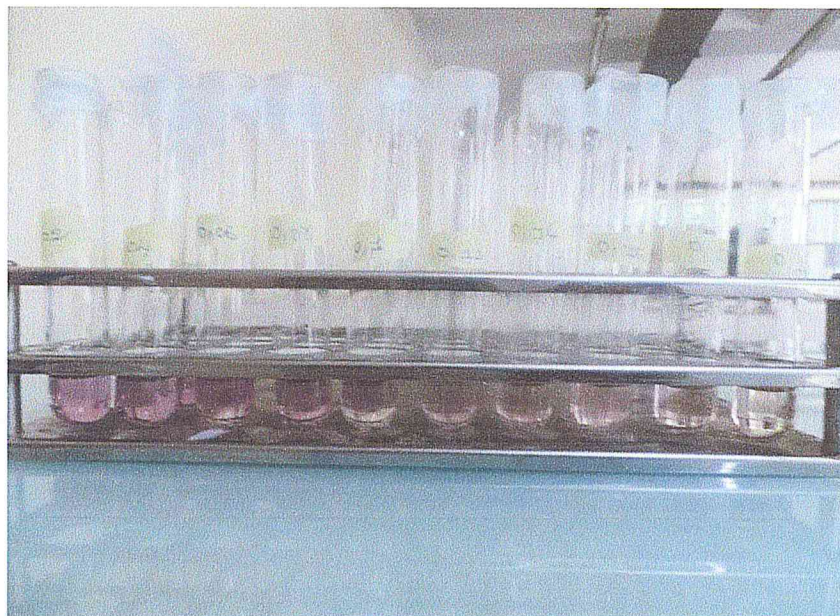
Annexe 3

- la chromatographie sur papier



Annexe 4

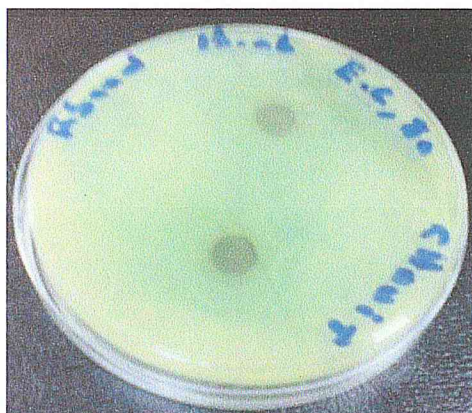
- Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence des extraits à tester (du violet à jaune pâle)



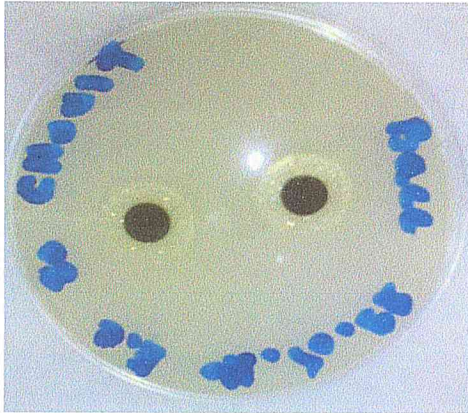
Annexe 5

- Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique et l'huile essentielle de *Salvia microphylla*.

1- La souche *Pseudomonas aeruginosa*



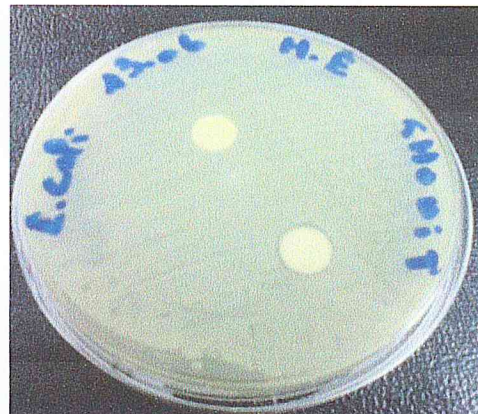
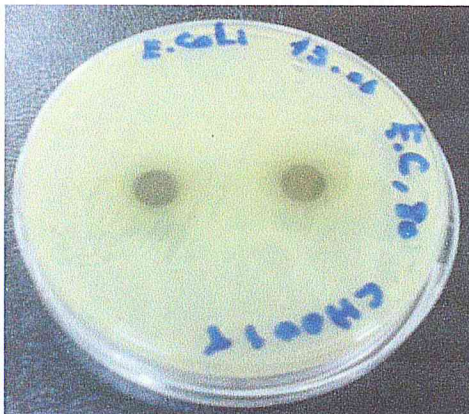
2- La souche *Bacillus cereus*



3- La souche *Staphylococcus aureus*

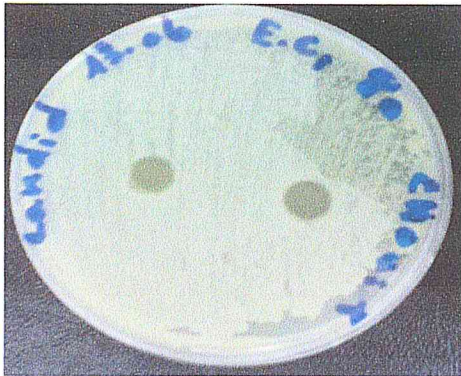


4- La souche *Escherichia Coli*



- Les résultats de l'activité antifongique de l'extrait chloroformique et l'huile essentielle de *Salvia microphylla*.

1- La souche *Candida albicans*



2- La souche *Aspergillus Braziliensis*

