

UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des Sciences

Département de Chimie

THÈSE DE DOCTORAT-LMD

En Chimie

Spécialité : Chimie des substances naturelles et de biomolécules

ETUDE DE L'EXTRACTION ET DE LA VALORISATION DES HUILES
ESSENTIELLES ET DES CONCRETES DE SAUGES D'ALGERIE

Par

CHOUIT Hafsa

Devant le Jury composé de :

H. BOUTOUMI	Professeur, Université Blida 1	Président
S. AKKAL	Professeur, Université Constantine 1	Examineur
A. BADIS	Professeur, Université Blida 1	Examineur
H. BENGUERGOURA	MCA, Université Blida 1	Examinatrice
O. TOUAFEK	MCA, Université Blida 1	Directrice de thèse

Blida, 06 Novembre 2024

ملخص

يهدف هذا العمل إلى تثمين نوعين من نبتة الميرمية في الجزائر من خلال تقييم الأنشطة المضادة للميكروبات، المضادة للأكسدة، المثبطة لأنزيم الكولينستيراز والمضادة للسكري للزيوت الأساسية ومستخلصات الـ *Salvia microphylla* والـ *Salvia officinalis*، وتحديد المركبات الرئيسية الموجودة في هذه المستخلصات.

تم تحديد التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية للأجزاء الهوائية، الأوراق والسيقان لكلا النوعين المدروسين، التي تم الحصول عليها عن طريق التقطير المائي، بواسطة تحليل GC و GC/MS. تم تحديد مركب β -caryophyllène كمكون رئيسي للأجزاء الهوائية والأوراق لـ *Salvia microphylla* بنسبة (0.02±16.75%) و (0.07±17.86%) على التوالي. في حين كان مركب α -Eudesmol المكون السائد في الزيت الأساسي للسيقان بنسبة (0.20±21.47%). وبالمثل، تم تحديد مركب camphre كمكون رئيسي للزيوت الأساسية للأجزاء الهوائية والأوراق لنبات *Salvia officinalis* بنسبة (0.01±23.57%) و (0.18±26.77%) على التوالي. بينما، كان مركب α -Thujone موجوداً في الزيت الأساسي للسيقان بنسبة (0.65±22.99%).

أظهر تحليل محتوى الفينولات والفلافونويدات الإجمالية غنى جميع المستخلصات بهذه المركبات، خصوصاً في مستخلصات أسيتات الإيثيل التي تم الحصول عليها عن طريق النقع، ومستخلصات الإيثانول التي تم الحصول عليها بواسطة جهاز سوكسليت، وذلك لكلا النوعين المدروسين. كشف تحليل LC-MS/MS لمستخلصات أسيتات الإيثيل والبيوتانول، وكذلك لأربع كسور تم الحصول عليها بواسطة كروماتوغرافيا العمود للمستخلصات الإيثانول وثنائي كلور الميثان، عن وجود الأحماض الفينولية والفلافونويدات وبعض التربينويدات.

أظهرت نتائج النشاط المضاد للأكسدة، التي تم تقييمها باستخدام ست طرق مختلفة، أن الزيت الأساسي للسيقان من *Salvia microphylla* قد أظهر النشاط الأعلى في اختبار CUPRAC، مع قيمة IC_{50} بلغت 0.43±7.72 ميكروغرام/مل. كما أظهرت مستخلصات أسيتات الإيثيل والإيثانول لكلا النوعين فعالية عالية مضادة للأكسدة و ذلك بسبب محتواها العالي من المركبات الفينولية.

تم تقييم النشاط الأنزيمي للزيوت الأساسية والمستخلصات ضد الأنزيمات الرئيسية المرتبطة بمرض السكري من النوع الثاني مثل α -glucosidase، وكذلك ضد الأنزيمات المرتبطة بالأمراض العصبية التنكسية مثل أنزيم الأسيتيل كولينستيراز (AChE) وأنزيم البيوتيريل كولينستيراز (BChE). أظهر الزيت الأساسي المستخلص من الأجزاء الهوائية لـ *Salvia microphylla* أفضل نشاط ضد AChE بقيمة IC_{50} بلغت 0.73±23.65 ميكروغرام/مل. بينما أظهر الزيت الأساسي المتحصل عليه من السيقان نشاطاً جيداً ضد BChE بقيمة IC_{50} بلغت 1.44±37.07 ميكروغرام/مل، وهي قريبة جداً من معيار الجالانتامين (IC_{50} : 1.99±34.75 ميكروغرام/مل). بالإضافة إلى ذلك، أظهر مستخلص الكلوروفورم لـ *Salvia microphylla* نشاطاً مثبطاً أكثر وضوحاً ضد BChE بقيمة IC_{50} بلغت 1.96±38.99 ميكروغرام/مل. من جهة أخرى، أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل لنفس النوع نشاطاً مضاداً للسكري، حيث بلغت قيمة IC_{50} 1.80±50.14 ميكروغرام/مل، متفوقاً بذلك على فعالية الأكاربوز، حيث أن قيمة IC_{50} لهذا الأخير قدرت بـ 1.59±275.43 ميكروغرام/مل.

تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية ضد إحدى عشرة سلالة بكتيرية وخميرتين. باستثناء سلالة *Pseudomonas aeruginosa*، أظهرت جميع العينات المختبرة نشاطاً جيداً مضاداً للبكتيريا، أين سجل الزيت الأساسي للسيقان لـ *Salvia microphylla* أعلى قيم. بالإضافة إلى ذلك، تم تسجيل نشاطاً ملحوظاً مضاداً للفطريات و ذلك لجميع الزيوت الأساسية ضد *Candida albicans*.

الكلمات المفتاحية : *Salvia officinalis*، *Salvia microphylla*، GC/MS، LC-MS/MS، الأنشطة المضادة للأكسدة، الأنشطة المضادة للكولينستران، الأنشطة المضادة لمرض السكري، الأنشطة المضادة للميكروبات.

RESUME

L'objectif de ce travail est de valoriser deux espèces de sauge d'Algérie par l'évaluation des activités antimicrobienne, antioxydante, anticholinestérase et antidiabétique des huiles essentielles et des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* et l'identification des principaux composés présents dans ces extraits.

La composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes, des feuilles et des tiges des deux espèces étudiées, obtenues par hydrodistillation, a été déterminée par analyse GC et GC/MS. Le β -caryophyllène a été identifié comme le principal constituant de la partie aérienne et des feuilles de *Salvia microphylla* avec un pourcentage de ($16,75 \pm 0,02$ %) et ($17,86 \pm 0,07$ %), respectivement. Tandis que, l' α -Eudesmol était le composant prédominant dans l'huile essentielle des tiges avec une teneur de ($21,47 \pm 0,20$ %). De même, le composé majoritaire identifié dans les huiles essentielles de la partie aérienne et des feuilles de *Salvia officinalis* était le camphor avec un pourcentage de ($23,57 \pm 0,01$ %) et ($26,77 \pm 0,18$ %), respectivement. Cependant, l' α -Thujone était présent dans l'huile essentielle des tiges avec une teneur de ($22,99 \pm 0,65$ %).

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux a montré la richesse de tous les extraits en ces métabolites secondaires, en plus particulièrement, les extraits d'acétate d'éthyle obtenus par macération et éthanoliques obtenus par Soxhlet, et cela pour les deux espèces étudiées. L'analyse LC-MS/MS des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique, ainsi que des quatre fractions obtenues par chromatographie sur colonne des extraits éthanoliques et dichlorométhane, a révélé la présence des acides phénoliques, des flavonoïdes et de quelques triterpénoïdes.

Les résultats de l'activité antioxydante, évaluée par six méthodes, ont montré que l'huile essentielle des tiges de *Salvia microphylla* a donnée l'activité la plus élevée dans l'essai CUPRAC, avec une valeur d' IC_{50} de $7,72 \pm 0,43$ μ g/ml. Les extraits acétate d'éthyle et éthanolique des deux espèces ont également présenté un fort potentiel antioxydant en raison de leurs teneurs élevées en composés phénoliques.

L'activité enzymatique des huiles essentielles et des extraits a été réalisée contre des enzymes clés impliquées dans le diabète de type 2, telles que l' α -glucosidase et dans les maladies neurodégénératives telles que l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). La meilleure activité contre l'AChE a été observée pour *Salvia microphylla* dans l'huile essentielle obtenue de la partie aérienne (IC_{50} : $23,65 \pm 0,73$ μ g/ml). En revanche,

L'huile essentielle obtenue des tiges a présenté une bonne activité contre la BChE avec une valeur d'IC₅₀ de 37,07±1,44 µg/ml, très proche de celle de standard galantamine (IC₅₀ : 34,75±1,99 µg/ml). En outre, l'extrait chloroformique de *Salvia microphylla* a montré une activité inhibitrice plus marquée contre la BChE, avec un IC₅₀ de 38,99 ± 1,96 µg/ml. Par ailleurs, l'extrait acétate d'éthyle de la même espèce a révélé une activité antidiabétique significative, avec un IC₅₀ de 50,14 ± 1,80 µg/ml, surpassant ainsi l'efficacité de l'acarbose, dont l'IC₅₀ est de 275,43 ± 1,59 µg/ml.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été réalisée contre onze souches bactériennes et deux levures. A l'exception de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, tous les échantillons testés présentent une bonne activité antibactérienne, dont la plus élevée est présentée par l'huile essentielle des tiges de *Salvia microphylla*. En outre, une activité antifongique significative de toutes les huiles essentielles a été observée contre *Candida albicans*.

Mots-clés : *Salvia microphylla*, *Salvia officinalis*, GC/MS, LC-MS/MS, activités antioxydantes, activités anticholinestérases, activités antidiabétiques, activités antimicrobiennes.

ABSTRACT

The objective of this work is to valorize two sage species from Algeria by evaluating the antimicrobial, antioxidant, anticholinesterase, and antidiabetic activities of the essential oils and extracts of *Salvia microphylla* and *Salvia officinalis*, and by identifying the main compounds present in these extracts.

The chemical composition of the essential oils from the aerial parts, leaves, and stems of the two studied species, obtained by hydrodistillation, was determined by GC and GC/MS analysis. β -Caryophyllene was identified as the main constituent in the aerial parts and leaves of *Salvia microphylla*, with a percentage of ($16,75 \pm 0,02\%$) and ($17,86 \pm 0,07\%$), respectively. In contrast, α -Eudesmol was the predominant component in the stem essential oil, with a content of ($21,47 \pm 0,20\%$). Similarly, the major compound identified in the essential oils of the aerial parts and leaves of *Salvia officinalis* was camphor, with a percentage of ($23,57 \pm 0,01\%$) and ($26,77 \pm 0,18\%$), respectively. However, α -Thujone was present in the stem essential oil, with a content of ($22,99 \pm 0,65\%$).

Total polyphenols and flavonoids quantification showed the richness of all extracts in these secondary metabolites, particularly the ethyl acetate extracts obtained by maceration and the ethanolic extracts obtained by Soxhlet, for both studied species. The LC-MS/MS analysis of the ethyl acetate and butanol extracts, as well as the four fractions obtained by column chromatography from the ethanolic and dichloromethane extracts, revealed the presence of phenolic acids, flavonoids, and some triterpenoids.

The results of the antioxidant activity, evaluated by six methods, showed that the essential oil from the stems of *Salvia microphylla* exhibited the highest activity in the CUPRAC assay, with an IC_{50} value of $7,72 \pm 0,43 \mu\text{g/ml}$. The ethyl acetate and ethanolic extracts of both species also demonstrated strong antioxidant potential due to their high phenolic content.

The enzymatic activity of the essential oils and extracts was tested against key enzymes involved in type 2 diabetes, such as α -glucosidase, and in neurodegenerative diseases, such as acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The best activity against AChE was observed for *Salvia microphylla* in the essential oil from the aerial parts (IC_{50} : $23,65 \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$). In contrast, the essential oil from the stems showed good activity against BChE, with an IC_{50} value of $37,07 \pm 1,44 \mu\text{g/ml}$, which is very close to that of the standard galantamine (IC_{50} : $34,75 \pm 1,99 \mu\text{g/ml}$). Furthermore, the chloroform extract of *Salvia microphylla* exhibited a more marked inhibitory activity against BChE, with an IC_{50} of

38,99±1,96 µg/ml. Additionally, the ethyl acetate extract of the same species revealed significant antidiabetic activity, with an IC₅₀ of 50,14±1,80 µg/ml, surpassing the efficacy of acarbose, whose IC₅₀ is 275,43±1,59 µg/ml.

The antimicrobial activity of the essential oils was tested against eleven bacterial strains and two yeasts. Except for the strain *Pseudomonas aeruginosa*, all tested samples showed good antibacterial activity, with the highest activity being observed in the essential oil from the stems of *Salvia microphylla*. Moreover, significant antifungal activity of all the essential oils was observed against *Candida albicans*.

Keywords : *Salvia microphylla*, *Salvia officinalis*, GC/MS, LC-MS/MS, antioxidant activities, anticholinesterase activities, antidiabetic activities, antimicrobial activities.

DEDICACES

Je dédie ce travail à mes chers parents, à Ma mère et Mon père. Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements tout au long de ma vie, que Dieu les protège.

*À mon mari, **Zaki**, en signe d'amour et de gratitude pour ses sacrifices, ses encouragements en vue de l'achèvement de ce travail.*

*À ma chère fille : **Alae Maissem***

*À mes chères sœurs : **Hadjer, Maroua et Amira***

*À mon cher frère **Islam***

*À mes chères amies et collègues de travail : **Madjeda, Fatiha, Nachida, Lamia, Aicha***

*À la mémoire de ma chère amie **Karima***

À toute ma famille.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Avant tout, je souhaite rendre un hommage profond et sincère à la mémoire de mon encadreur, Monsieur **BRADA Moussa**, professeur à l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana qu'Allah lui accorde sa miséricorde.*

*Le professeur M. **BRADA « Rahimahou Allah »**, n'a pas été un simple encadrant de thèse pour moi : il a été un mentor, un guide et un modèle tout au long de mon parcours doctoral. Sa disparition représente une perte immense, mais son œuvre, son soutien indéfectible et ses enseignements continuent de vivre en moi, ainsi que chez tous ceux qui ont eu le privilège de bénéficier de sa sagesse.*

Sa mémoire demeure une source inépuisable d'inspiration, et je lui resterai éternellement reconnaissant non seulement pour m'avoir guidé dans ce parcours scientifique, mais aussi pour m'avoir appris ce que signifie être un chercheur engagé et un être humain remarquable. Son héritage est gravé dans le cœur de tous ceux qui ont eu la chance de travailler à ses côtés.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, Je remercie «Allah», le tout puissant, de m'avoir donné la force, le courage, la volonté et la patience de mener à terme ce modeste travail.

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma plus profonde gratitude et adresser mes sincères remerciements au Docteur **TOUAFEK Ouassila**, Co-directrice puis directrice de ma thèse, d'avoir accepté de diriger ce travail avec beaucoup d'intérêt, mes gratitudes pour ses encouragements, sa disponibilité et sa patience, ainsi pour ses nombreux conseils et ses suggestions qui m'ont été d'une précieuse aide pour valoriser les résultats et améliorer la rédaction de la thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et gratitude.*

*Je tiens à adresser mes vifs remerciements au Professeur **BOUTOUMI Hocine**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de soutenance de ma thèse.*

*Je remercie vivement le Professeur **AKKAL Salah**, de l'Université Constantine 1, pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit et de faire partie de mon jury de thèse.*

*J'exprime mes profonds remerciements au Professeur **BADIS Abdelmalek**, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger mon travail.*

*Mes remerciements vont également au Docteur **BENQUERGOURA Hassiba**, pour avoir accepté d'examiner et de juger ce modeste travail.*

*Mes remerciements les plus sincères s'adressent particulièrement au Professeur **El HATTAB Mohamed**, directeur de Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Biomolécules (LCSN-BioM), pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche au sein de son laboratoire, pour son aide considérable et ses encouragements.*

*J'adresse mes chaleureux remerciements au Professeur **Marie-Laure FAUCONNIER**, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Chimie Générale et organique de l'université de Liège, Belgique, pour ses conseils, sa disponibilité, sa gentillesse et sa bienveillance.*

Mes vifs remerciements s'étendent à tous le personnel du laboratoire de Biochimie du Centre de Recherche en Biotechnologie « CRBT », pour leur accueil, leur aide et leur gentillesse.

*Je remercie vivement les Professeurs **DAGHBOUCHE Yasmina** et **BOUZIDI Naima**, présidentes du Comité de Formation Doctorale, pour leurs précieux conseils et leurs gentilles.*

*J'adresse mes plus profonds remerciements à tous les enseignants et les ingénieurs du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules, pour leur aide et leur soutien, en particulier : Mme **Z. ZEFFOUNI**, Mr **R. ZAHI**, Mme **H. BOUDISSA**, Mlle **F. MESSAOUDI**, Mlle **D. MEDJDOUB**.*

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Merci à tous.

TABLE DES MATIERS

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
Liste des illustrations, graphiques et tableaux	
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1.1 Généralité sur la famille lamiaceae	4
1.1.1 Description botanique et répartition géographique des lamiaceae	4
1.1.2 Importance économique, nutritionnel et pharmacologique des lamiacées	5
1.2 Généralité sur le genre <i>Salvia</i>	6
1.2.1 Description botanique et répartition géographique du genre <i>Salvia</i>	6
1.2.2 Usages traditionnels du genre <i>Salvia</i>	7
1.2.3 Composition chimique du genre <i>Salvia</i>	8
1.2.3.1 Les huiles essentielles	8
1.2.3.2 Les composés phénoliques	20
1.2.3.3 Les Terpénoïdes	29
1.3 Présentation des espèces étudiées	34
1.3.1 Classification dans la systématique botanique	34
1.3.2 Présentation botanique et répartition géographique des espèces étudiées	35
1.3.3 Usages traditionnels des espèces étudiées	37
1.3.4 Composition chimique des espèces étudiées	38
1.3.4.1 Travaux antérieurs sur les huiles essentielles des espèces étudiées	38
1.3.4.2 Travaux antérieurs sur les composés phénoliques des espèces étudiées	43
1.3.4.3 Travaux antérieurs sur les terpénoïdes des espèces étudiées	46
1.4 Étude antérieurs sur les activités biologiques	49
1.4.1 Généralité sur les activités biologiques	49
1.4.1.1 Activité anti-oxydante	49
1.4.1.2 Activité anti-cholinestérerase (anti-Alzheimer)	51

1.4.1.3	Activité antidiabétique	52
1.4.1.4	Activité antimicrobienne	53
1.4.2	Travaux antérieurs sur les activités biologiques des espèces étudiées	54

CHAPITRE 2. MATERIEL ET METHODES

2.1	Matériel	58
2.1.1	Matériel végétal	58
2.1.2	Produits chimiques et micro-organismes utilisés	58
2.2	Étude de l'influence de quelques paramètres liés à la matière végétale sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles des espèces étudiées	60
2.2.1	Influence de la technique d'extraction sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles	60
2.2.1.1	Extraction des huiles essentielles	61
2.2.1.2	Calcul du rendement	62
2.2.1.3	Analyse des huiles essentielles	62
2.2.2	Influence de la période de récolte sur le rendement et la composition chimiques des huiles essentielles	63
2.3	Étude chimique des huiles essentielles et des extraits des deux espèces étudiées	64
2.3.1	Extraction et analyse des huiles essentielles	64
2.3.2	Extraction, séparation et identification des métabolites secondaires de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	66
2.3.2.1	Extraction des métabolites secondaires	66
2.3.2.2	Séparation des métabolites secondaires de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	70
2.3.2.3	Quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux	72
2.3.2.4	Analyse qualitative des composés phénoliques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)	73
2.4	Évaluation des activités biologiques des deux espèces <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	75
2.4.1	Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti-oxydante	75
2.4.1.1	Test de piégeage des radicaux libres DPHH	75

2.4.1.2	Activité du Piégeage de l'ABTS•+ (acide 2,2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic])	77
2.4.1.3	Capacité anti-oxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	78
2.4.1.4	Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	79
2.4.1.5	Test de blanchissement du β -carotène	80
2.4.1.6	Méthode de phénanthroline	81
2.4.2	Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti cholinestérase	82
2.4.3	Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité α -glucosidase	83
2.4.4	Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antimicrobienne	83
2.4.4.1	Méthode de diffusion sur milieu solide	84
2.4.4.2	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	85
2.4.4.3	Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale fongicide (CMF)	86

CHAPITRE 3. RESULTATS ET DISCUSSION 87

3.1	Étude de l'influence de quelque paramètre lié à la matière végétale sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	87
3.1.1	Influence de la technique d'extraction sur le rendement des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i>	87
3.1.1.1	Rendement en huile essentielle	87
3.1.1.2	Composition chimique	88
3.1.2	Étude de la variation mensuelle du rendement et de la composition chimique des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	90
3.1.2.1	Rendement en huile essentielle	90
3.1.2.2	Composition chimique	91
3.2	Étude de la composition chimique et évaluation de l'activité biologique des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	95
3.2.1	Extraction et analyse des huiles essentielles des deux espèces étudiées	95
3.2.1.1	Rendement	95
3.2.1.2	Composition chimique des huiles essentielles des deux plantes étudiées	97

3.2.2	Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles des deux espèces étudiées	105
3.2.2.1	Activité antioxydante	105
3.2.2.2	Activité anticholinestérase	110
3.2.2.3	Activité inhibitrice de l' α -glucosidase	117
3.2.2.4	Activité antimicrobienne	120
3.3	Étude phytochimique des extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	130
3.3.1	Extraction, séparation et identification des métabolites secondaires de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	130
3.3.1.1	Rendement de l'extraction par différentes méthodes	130
3.3.1.2	Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux	132
3.3.1.3	Analyse qualitative des composés phénoliques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)	137
3.3.2	Évaluation des activités biologiques des extraits des deux espèces <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	142
3.3.2.1	Activité antioxydante	142
3.3.2.2	Activité anticholinestérase	161
3.3.2.3	Activité inhibitrice de l' α -glucosidase	163
	CONCLUSION	165
	PERSPECTIVES	168
	APPENDICES	169
	REFERENCES	187
	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	223

LISTE DES ILLUSTRATION GRAPHIQUE ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées	5
Figure 1.2	Appareillage utilisé pour entraînement à la vapeur d'eau	11
Figure 1.3	Montage pour hydrodistillation des huiles essentielles	12
Figure 1.4	Montage d'extraction assistée par chauffage par induction électromagnétique	13
Figure 1.5	2-phénylchromane	21
Figure 1.6	Voies de biosynthèse des flavonoïdes	22
Figure 1.7	<i>Salvia microphylla</i>	35
Figure 1.8	<i>Salvia officinalis</i>	36
Figure 1.9	Structure des principaux composés phénoliques isolés à partir de <i>Salvia officinalis</i>	45
Figure 1.10	Structure de quelques terpénoïdes isolés de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	47
Figure 1.11	Structure des principaux terpénoïdes isolés à partir de <i>Salvia officinalis</i> ; (a) les monoterpènes; (b) les diterpènes; (c) les triterpènes; et (d) sesquiterpènes	48
Figure 1.12	Principaux composés naturels possédant des propriétés antioxydantes	50
Figure 1.13	Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman's	51
Figure 2.1	Localisation géographique du site de récolte des deux espèces étudiées	58
Figure 2.2	Protocole d'extraction des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	65
Figure 2.3	Les étapes de l'extraction par macération de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	67
Figure 2.4	Les étapes de l'extraction au Soxhelt de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	69
Figure 2.5	Réduction du radical DPPH' en présence d'un antioxydant	76
Figure 2.6	Génération du radical-cation ABTS ^{•+} avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant AH	77
Figure 2.7	Réduction du complexe chromogène de (neocuproine) (Cu(II)-Nc)	78

Figure 2.8	Formation complexe ferreux-phénanthroline en présence d'un antioxydant	81
Figure 2.9	Principe de la méthode de diffusion sur disque	85
Figure 3.1	Rendement (%) des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> selon trois méthodes d'extraction	87
Figure 3.2	Variation de la teneur en monoterpènes et sesquiterpènes majeurs de <i>Salvia microphylla</i> selon différentes méthodes d'extraction	89
Figure 3.3	Influence de la période de récolte sur le rendement en huile essentielle de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	90
Figure 3.4	Variation de la teneur des monoterpènes et des sesquiterpènes majoritaires des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> selon la période de récolte	92
Figure 3.5	Variation de la teneur des principaux monoterpènes des huiles essentielles de <i>Salvia officinalis</i> en fonction de la période de récolte	93
Figure 3.6	Variation de la teneur des principaux sesquiterpènes des huiles essentielles de <i>Salvia officinalis</i> en fonction de la période de récolte	94
Figure 3.7	Rendement d'extraction (%) des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i>	95
Figure 3.8	Rendement d'extraction (%) des huiles essentielles de <i>Salvia officinalis</i>	96
Figure 3.9	Teneur des différentes classes chimiques des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i>	99
Figure 3.10	Teneur des différentes classes chimiques des huiles essentielles de <i>Salvia officinalis</i>	103
Figure 3.11	Capacité antioxydant (A _{0.5}) par réduction du cuivre (CUPRAC) pour les huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i>	108
Figure 3.12	Variation de l'absorbance en fonction de concentration des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> et des standards dans le test de CUPRAC	108
Figure 3.13	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de <i>Salvia microphylla</i> (a) et <i>Salvia officinalis</i> (b)	111
Figure 3.14	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (IC ₅₀) des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	112

Figure 3.15	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de <i>Salvia microphylla</i> (a) et <i>Salvia officinalis</i> (b)	115
Figure 3.16	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (IC ₅₀) des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> .	116
Figure 3.17	Activité inhibitrice de l' α -glucosidase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de <i>Salvia microphylla</i> (a) et <i>Salvia officinalis</i> (b)	118
Figure 3.18	Activité inhibitrice de l' α -glucosidase (IC ₅₀) des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	119
Figure 3.19	Teneurs des polyphénols totaux des différents extraits des parties aériennes de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	133
Figure 3.20	Teneurs des flavonoïdes totaux des différents extraits des parties aériennes de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	135
Figure 3.21	Variation du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations de <i>Salvia microphylla</i> (a) et de <i>Salvia officinalis</i> (b)	146
Figure 3.22	Les valeurs d'IC ₅₀ des extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> ainsi que des standards dans le test DPPH	147
Figure 3.23	Variation du taux de piégeage de ABTS ⁺⁺ en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>Salvia microphylla</i> (a) et de <i>Salvia officinalis</i> (b)	148
Figure 3.24	Comparaison des valeurs d'IC ₅₀ des extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> avec les standards dans le test ABTS	149
Figure 3.25	Variation des absorbances dans le test CUPRAC en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>Salvia microphylla</i> (a) et de <i>Salvia officinalis</i> (b)	151
Figure 3.26	Valeurs A _{0.5} des extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> ainsi que des standards selon la méthode CUPRAC	152
Figure 3.27	Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>Salvia microphylla</i> (a) et de <i>Salvia officinalis</i> (b)	153
Figure 3.28	Comparaison des valeurs d'A _{0.5} des extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> avec les standards dans le test FRAP	154

Figure 3.29	Variation du pourcentage d'inhibition de blanchissement du β -carotène par les extraits chloroformique de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> en fonction des différentes concentrations	155
Figure 3.30	Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>Salvia microphylla</i> (a) et de <i>Salvia officinalis</i> (b) dans le test de phénanthroline	157
Figure 3.31	Valeurs $A_{0.5}$ des extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> ainsi que des standards obtenues par la méthode de phénanthroline	158
Figure 3.32	Variation du pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinestérase des extraits de <i>Salvia microphylla</i> (a) et <i>Salvia officinalis</i> (b)	162
Figure 3.33	Variation du pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des extraits de <i>Salvia microphylla</i> .	164

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Usages et propriétés de quelques espèces du genre <i>Salvia</i>	7
Tableau 1.2	Composants majoritaires ($\% \geq 5.0$) d'huiles essentielles des espèces du genre <i>Salvia</i>	15
Tableau 1.3	Distribution des acides phénoliques dans le genre <i>Salvia</i>	24
Tableau 1.4	Distribution des flavonoïdes aglycones dans le genre <i>Salvia</i>	26
Tableau 1.5	Distribution des flavonoïdes glycosides dans le genre <i>Salvia</i>	28
Tableau 1.6	Distribution des anthocyanines dans le genre <i>Salvia</i>	29
Tableau 1.7	Distribution des sesquiterpènes dans le genre <i>Salvia</i>	30
Tableau 1.8	Composants majoritaires ($\% \geq 5.0$) des huiles essentielles de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	38
Tableau 1.9	Composants majoritaires ($\% \geq 5.0$) des huiles essentielles de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> provenant de différents pays	40
Tableau 1.10	Composants majoritaires ($\% \geq 5.0$) des huiles essentielles de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> récoltée en Algérie	42
Tableau 1.11	Les principaux composés phénoliques isolés de l'espèce <i>Salvia officinalis</i>	44
Tableau 1.12	Les principaux terpénoïdes isolés de l'espèce <i>Salvia microphylla</i>	46
Tableau 2.1	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait dichlorométhane (D) de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	71
Tableau 2.2	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait éthanolique (E) de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	72
Tableau 3.1	Les composés majoritaires des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i> obtenues par trois méthodes d'extraction	88
Tableau 3.2	Composition chimique des huiles essentielles isolées des parties aériennes, des feuilles et des tiges de <i>Salvia microphylla</i>	97
Tableau 3.3	Composition chimique des huiles essentielles isolées des parties aériennes, des feuilles et des tiges de <i>Salvia officinalis</i>	101
Tableau 3.4	Activités antioxydantes des huiles essentielles des parties aériennes, des feuilles et des tiges de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	107
Tableau 3.5	Inhibition du CUPRAC par les huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i>	108

Tableau 3.6	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	111
Tableau 3.7	Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	115
Tableau 3.8	Test d'inhibition de l' α -glucosidase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	118
Tableau 3.9	Diamètres des zones d'inhibition mesurés pour les différents microorganismes testés	121
Tableau 3.10	Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Salvia microphylla</i>	124
Tableau 3.11	Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Salvia officinalis</i>	126
Tableau 3.12	Rendement d'extraction (%) de <i>Salvia microphylla</i> (SM) et <i>Salvia officinalis</i> (SO)	130
Tableau 3.13	Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits des parties aériennes de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	132
Tableau 3.14	Composés identifiés par LC-MS/MS de l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	139
Tableau 3.15	Composés identifiés par LC-MS/MS des fractions les plus antioxydants des extraits dichlorométhane et éthanolique de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> (MFD2, MFE3, OFD4 et OFE4)	141
Tableau 3.16	Résultat du test de piégeage des radicaux libres de DPPH des extraits EDSM et EESM, ainsi que leurs fractions	143
Tableau 3.17	Inhibition du radical DPPH par les différents extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	146
Tableau 3.18	Inhibition du radical DPPH par les différents extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	148
Tableau 3.19	Inhibition du CUPRAC par les extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	151
Tableau 3.20	Pouvoir réducteur des extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i> en fonction de la concentration	153
Tableau 3.21	Activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène en présence des extraits de <i>Salvia microphylla</i> et <i>Salvia officinalis</i>	156

Tableau 3.22 Activité phénanthroline des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* 157

Tableau 3.23 Pourcentages d'inhibition de l'activité de butyrylcholinestérase des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* 162

INTRODUCTION

Les organismes vivants sont capables de produire des substances naturelles que l'homme exploite pour diverses raisons. Les plantes sont à elles seules une source immense de molécules chimiques complexes et variées. De nos jours, la majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutique sont extraites directement de la plante entière ou de l'un de ses organes.

Les plantes médicinales sont un enjeu important d'innovation dans le domaine du médicament mais au-delà de cette première considération, elles sont également un enjeu de développement économique.

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant l'utilisation intensive de produits chimiques synthétiques, notamment dans le domaine médical et alimentaire. En effet, les antioxydants de synthèse utilisés pour prévenir l'oxydation des lipides se sont avérés responsables des effets indésirables et néfastes sur la santé humaine. Par exemple, le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le gallate de propyle (PG) sont notamment suspectés de causer des dommages au foie et d'induire certains cancers [1, 2]. Pour pallier ces risques, les antioxydants naturels ont apparus comme une alternative prometteuse aux antioxydants de synthèses qui sont de moins en moins utilisés dans l'industrie alimentaire.

Dans le domaine de la microbiologie médicale les plantes restent encore sous exploitées. Il est certain que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes. De plus, l'usage excessif d'agents antimicrobiens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans l'élevage animal favorise l'émergence de souches résistantes. Il est devenu très indispensable de trouver de nouveaux agents thérapeutiques. De nombreuses études *in vitro* ont démontré que les substances bioactives provenant de diverses espèces végétales présentent un spectre large d'activité sur une gamme de flore fongique dont inclus les champignons toxigènes [3].

Les huiles essentielles sont largement utilisées comme médecine alternative dans diverses industries telles que les industries pharmaceutiques, agricoles, cosmétiques et alimentaires en raison de leurs propriétés antivirales, antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, antiparasitaires, antidiabétiques, anticancéreuses, d'aromathérapie et leurs

propriétés de parfum [4]. Les polyphénols sont des sources potentielles de constituants chimiques naturels doués d'activité antioxydante, ils se distinguent par leur capacité à inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, offrant ainsi une protection naturelle contre le processus d'auto-oxydation [5,6].

L'Algérie recèle d'importantes potentialités en matière de plantes aromatiques et médicinales, malheureusement elles ne sont pas exploitées. La valorisation de cette flore demeure un sujet de grande importance pour notre pays. Aussi, le développement et la mise en œuvre des procédés d'extraction, ainsi que la maîtrise des différentes étapes allant de la mise en exploitation à l'analyse des produits finis, sont d'actualité.

C'est dans ce contexte que le présent travail se propose d'entreprendre des études phytochimique et biologique de deux plantes médicinales et aromatiques algériennes du genre *Salvia* (Lamiaceae). Environ 900 espèces du genre *Salvia* sont représentées dans cinq sous-genres répandus dans le monde entier [7]. Plus de 275 espèces se développent en Amérique, 90 sont distribuées en Turquie et Près de 23 espèces de *Salvia* cultivées en Algérie, dont *S. buchananii*, *S. jaminiana*, *S. verbenaca subsp.*, *S. clandestina*, *S. barrilieri*, *S. argentea subsp.* et *S. algeriensis Desf.* ont fait l'objet de diverses études [8-10]. Plusieurs espèces de *Salvia* ont été appliquées comme plantes médicinales et utilisées, entre autres, pour sa capacité à prévenir les maladies neurovégétatives, stimuler les activités anti-tumorales [11], améliorer les fonctions de la mémoire, et utilisées à grande échelle pour ajouter de la saveur aux aliments, comme herbe séchée ou comme huile essentielle [12], mais aussi pour traiter les infections microbiennes, les troubles cérébraux simples [13], l'inflammation, la malaria, le cancer et pour désinfecter les maisons après une maladie [14, 15]. La composition chimique de l'huile essentielle des espèces de *Salvia* a été rapportée dans de nombreux articles de synthèse [10, 16, 17]. Les composés les plus importants de cette huile essentielle sont les monoterpènes tels que l' α -Pinène, le β -Pinène, le camphre, le 1,8-cinéole, le thujone et le bornéol ; et les sesquiterpènes tels que le β -Caryophyllène, le germacrène D, l'oxyde de Caryophyllène. Plusieurs recherches sur les activités biologiques de diverses espèces de *Salvia* ont révélé que les HEs possèdent des activités spasmolytiques, œstrogéniques, antimicrobiennes, antifongiques, antioxydantes, anti-inflammatoire, anticholinestérasiques, hypoglycémique et antidiabétiques [18-20]. Un grand nombre de composés isolés de l'espèce *Salvia* sont des diterpénoïdes qui possédant des activités biologiques très intéressantes.

Dans cette optique et compte tenu des vertus thérapeutiques que présentent les sauges, nous nous sommes intéressés à l'analyse de la composition chimique et l'étude des activités antioxydante, antimicrobienne, antidiabétique et anti Alzheimer des huiles essentielles et des extraits de deux espèces assez répandues en Algérie, *Salvia officinalis* et *Salvia microphylla*.

Il faut noter que les études réalisées sur les huiles essentielles et les extraits de *Salvia microphylla* récoltée en Algérie, ainsi que l'huile essentielle des tiges de *Salvia officinalis* seront abordées pour la première fois dans ce modeste travail.

Notre travail décrit dans ce manuscrit est divisé en trois chapitres :

Dans le premier chapitre, nous entreprenons une revue de la littérature portant sur les connaissances botaniques et phytochimiques relatives au genre *Salvia*. Cette partie est consacrée à une exploration approfondie des métabolites secondaires qui caractérisent ce genre. De plus, nous examinons de manière détaillée les activités biologiques et pharmacologiques associées.

Le deuxième chapitre est consacré au matériel et méthodes analytiques utilisés pour la détermination structurale des composés et évaluation des activités biologiques des huiles essentielles et des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

Les résultats obtenus et leurs discussions sont détaillés dans le troisième chapitre. En dernier lieu, nous terminons par une conclusion avec les perspectives envisageables.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Généralité sur la famille Lamiaceae

1.1.1 Description botanique et répartition géographique des Lamiaceae

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses et comprennent environ 233 à 263 genres et de 6900 à 7200 espèces [21,22] qui se répartissent sur tout le globe (Figure 1.1). Elle est aussi répandue dans les zones tropicales que dans les zones tempérées du monde [23], mais principalement en région méditerranéenne [24]. Elles sont divisées en sept sous familles : *Viticoideae*, *Chloant-hoïdeae*, *Ajugoideae*, *Scutellariöideae*, *Lamioïdeae*, *Nepetoïdeae* et *Symphore-matoïdeae* [25]. Les Lamiacées constituent une famille très importante dans la flore algérienne représentée par 28 genres et 146 espèces [26] contre 8 genres et 12 espèces répartis dans tout le Sahara [27].

La famille des Lamiaceae (labiées) du Latin (Labia : lèvre) signifiant que les fleurs ont une forme caractéristique à deux lèvres [28,29], Les plantes de cette famille sont souvent des arbustes, sous arbrisseaux ou des plantes herbacées vivaces ou annuelles, en général odorante, producteurs d'huiles essentielles, rarement arbres ou lianes, à tiges quadrangulaires et à feuilles simples sans stipules, opposées-décussées et rarement pinnées, largement répartis autour du monde et dans tout type de milieux. De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes mellifères, fréquentées par les abeilles [30].

Les fleurs généralement sont hermaphrodites, et habituellement pentamère, à symétrie bilatérale, mais parfois presque radiaire. Elles sont regroupées à l'aisselle des feuilles supérieures en glomérules, eux-mêmes souvent regroupées en épis plus ou moins denses. Leur calice persistant est formé de 5 sépales diversement soudés avec souvent 2 lèvres.

La corolle possède un tube plus ou moins long et généralement à deux lèvres: deux pétales forment la lèvre supérieure et trois autres pétales, une lèvre inférieure.

Les étamines sont au nombre de cinq, mais l'une d'elles est presque toujours avortée: deux des quatre étamines fertiles sont plus longues et deux plus courtes, l'androcée est dit didyname. L'ovaire est supère, les deux carpelles sont profondément lobés, le style sort de

la base des lobes (style gynobasique). Le fruit est le plus souvent un schizocarpe (tetrakène lisse) mais avec parfois un aspect charnu ou drupacé.

Les Lamiacées possèdent souvent un épiderme très riche en poils tecteurs et en poils sécréteurs. Ces deux catégories de poils se retrouvent au niveau de tous les organes aériens.

Ce sont des plantes odorantes contiennent des huiles essentielles dont l'odeur se dégage au simple toucher. En effet, la localisation de ces huiles est très externes, elles se forment dans des poils à essence et se localisent sous la cuticule qui se soulève.



Figure 1.1 : Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées [31,32].

1.1.2 Importance économique, nutritionnel et pharmacologique des Lamiacées

Les Lamiacées est une vaste famille, qui regroupe un grand nombre d'espèces d'intérêt économique, pharmacologique et nutritionnel majeur [23]. Cette famille joue un rôle essentiel en tant que fournisseur majeur d'huiles essentielles, de tisanes et d'antibiotiques naturels dans les domaines de l'aromathérapie et de l'industrie cosmétique. De plus, certaines de ses huiles sont appréciées pour leurs vertus hydratantes. Certaines espèces sont utilisées en cuisine (dans les préparations culinaires) comme condiment et arômes alimentaires, on peut citer par exemple (le basilic, le thym, la menthe, la bugle, la sauge, le romarin, l'hysope, la lavande, la marjolaine, la mélisse, etc...). De nombreuses autres plantes de la famille des lamiacées, telles que la lavande, le teucrium, le thym, le sauge, sont utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne depuis des siècles [29]. Dans le domaine de la parfumerie, bien que les parfums synthétiques deviennent de plus en plus courants, les plantes restent indispensables. Les artisans de la parfumerie de luxe continuent de les distiller pour extraire leurs précieux parfums et maintenir la qualité de leurs produits. Les analyses

phytochimiques des huiles essentielles des espèces de *Thymus* ont montrées des effets anti bactériens et anti-inflammatoires, en plus de leurs utilisations dans les industries cosmétiques et alimentaires [33,34].

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 connus pour leurs diverses activités biologiques tels que les stérols, les flavonoïdes, les iridoïdes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes [35,36].

1.2 Généralité sur le genre *Salvia*

1.2.1 Description botanique et répartition géographique du genre *Salvia*

Salvia constitue le plus grand genre de plantes de la famille Lamiaceae. Dans le Lamiacées, *Salvia* fait partie de la tribu Mentheae au sein de la sous-famille Nepetoideae [7]. 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 gorge 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 griffées en forme 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 réduites à deux structures courtes avec anthères deux cellules, la cellule supérieure fertile, et moins imparfaite. Les styles de fleurs sont deux palatines. Les fruits sont ovoïdes ou oblongues nucléolées lisses, ils ont un revêtement mucilagineux dans de nombreuses espèces [37]. 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 l'Amérique du Sud, (environ 500 espèces), Asie centrale et la Méditerranée (250 espèces) et Asie de l'Est (90 espèces) [38].

1.2.2 Usages traditionnels 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 tuberculose [39]. La décoction des racines est également utilisée en Afrique du Sud pour le traitement des maux d'estomac et la diarrhée [40]. 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 connues pour leurs nombreuses activités biologiques, comme l'activité antibactérienne, antioxydante, antitumorale, antidiabétique, antimicrobienne, anxiolytique, sédative et anti-inflammatoire [41-45]. L'usage et propriétés de quelques espèces du genre *Salvia* sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1.1 : Usages et propriétés de quelques espèces du genre *Salvia*.

Espèce	Usages et Propriétés	Référence
<i>S. officinalis</i>	Traitement de l'eczéma et la tuberculose. Une décoction de racines est employée pour traiter les problèmes cardiaques et soulager les symptômes de la ménopause.	[46,47]
<i>S. cavaleriei</i>	Traitement de la dysenterie, les furoncles et les blessures dues aux chutes.	[48]
<i>S. desoleria</i>	Traitement de règles, des maladies digestives et du système nerveux central.	[49]
<i>S. fruticosa</i>	Pour soigner les rhumes et les maux d'estomac.	[50]
<i>S. palaestina</i>	Effets anti-prolifératifs modérés contre certains types des cellules tumorales.	[51]
<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.	[52]

<i>S. divinorum</i>	Elle est employée sous forme d'infusion comme tonique ou remède pour traiter diverses affections. La feuille peut être appliquée sur le front du patient pour soulager les maux. La plante est aussi utilisée pour lutter contre la diarrhée, l'anémie et les rhumatismes.	[53]
<i>S. sclarea</i>	Les huiles essentielles sont employées à la fois comme parfums et insectifuges. Elles peuvent également être utilisées pour éliminer les puces et les tiques sur les animaux domestiques, ainsi que pour désinfecter les tapis.	[54]
<i>S. miltiorrhiza</i>	Les racines de cette plante sont reconnues pour leurs propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies cardiovasculaires, hépatiques, rénales et cérébrovasculaires. Elle est également employée comme remède contre l'angoisse, le stress, l'irritabilité et les insomnies.	[55-57]

1.2.3 Composition chimique du genre *Salvia*

Le genre *Salvia* se caractérise par une composition chimique complexe et variée, riche en métabolites secondaires tels que les huiles essentielles, les composés phénoliques et les terpènes.

1.2.3.1 Les huiles essentielles

1.2.3.1.1 Généralité sur les huiles essentielles

1.2.3.1.1.1 Définition et localisation

Les huiles essentielles et les arômes extraits à partir d'herbes aromatiques et d'épices résultent d'un mélange complexe de substances volatiles [58]. La thérapie par les huiles essentielles a évolué progressivement à travers différentes civilisations, notamment la civilisation arabe, égyptienne et grecque [59,60].

Les huiles essentielles sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur. Bien qu'elles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de

la plante, elles confèrent les caractéristiques pour lesquelles les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, la cosmétologie et les industries pharmaceutiques [61]. Les huiles essentielles sont capables de se fondre dans des graisses et des solvants apolaires [62]. Elles sont généralement des liquides dont la coloration peut varier de l'incolore au brun clair. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau, se situant généralement entre 0,850 et 0,950. En ce qui concerne leur point d'ébullition, il varie de 160°C à 240°C. Il est important de noter qu'en présence de lumière, les huiles essentielles ont la capacité de subir une réaction d'oxydation. De plus, les huiles essentielles ont la capacité d'absorber le chlore et l'iode, ce qui peut s'accompagner d'un dégagement de chaleur. Elles ont également la possibilité de se combiner avec l'eau pour former des hydrates [62].

Les huiles essentielles peuvent être trouvées dans diverses parties des plantes, notamment les feuilles (menthe, thym, laurier), les fleurs (sauge officinale, lavande vraie), les graines (noix de muscade), les fruits (anis, fenouil), les racines (vétiver), les rhizomes (gingembre), bois et les écorces (cannelle, santal). Elles sont exclusivement présentes chez les spermatophytes: familles des Conifères, Lamiacées, Myrtacées, Apiacées, Lauracées, Rutacées et Astéracées. Ces huiles essentielles sont localisées dans le cytoplasme de certaines cellules végétales sécrétrices spécialisées, qui sont situées dans un ou plusieurs organes de la plante [63]. De plus, il est important de noter que les huiles essentielles extraites de différents organes dans les mêmes plantes peuvent présenter des variations significatives dans leur composition chimique [64].

1.2.3.1.1.2 Rôle écologique et intérêts des huiles essentielles

Les huiles essentielles émises par les plantes sous forme de vapeur ont un impact écologique significatif. Elles assurent la protection des cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons [65], empêchent la dessiccation des plantes par une évaporation excessive, et offrent une protection contre la lumière en régulant son intensité soit par diminution ou par concentration, maintenant ainsi une humidité adéquate autour des plantes des régions arides [66]. Les composés organiques volatils présents dans les huiles essentielles permettent à la plante d'établir une communication avec d'autres plantes voisines ainsi qu'entre ses propres organes [67]. Ces composés jouent également un rôle essentiel dans la défense des plantes en protégeant leurs parties reproductives contre les insectes et les herbivores [68, 69]. Elles attirent les insectes et favorisent la pollinisation par leurs odeurs caractéristiques [70].

Il existe environ 3000 types d'huiles essentielles, dont 300 sont considérées comme particulièrement importantes sur le plan commercial en raison de leurs applications dans des domaines tels que la pharmacie, la cosmétique, l'alimentation, l'agriculture et la parfumerie [4]. Les huiles essentielles sont couramment employées dans le domaine de l'aromathérapie, qui fait partie de la phytothérapie. L'aromathérapie se base sur l'utilisation des huiles essentielles pour traiter diverses affections. Les huiles essentielles sont également utilisées par inhalation, massage 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 Grecques, Macédonienne, Perse, Égyptienne, etc... Elle a été employée dans les infections des yeux et des oreilles, les gingivites, les hémorroïdes et pour arrêter la transpiration [71]. Par ailleurs, les huiles essentielles sont également utilisées en médecine dentaire. Un exemple bien connu est la Listerine, inventée au XIXe siècle, qui est un puissant antiseptique chirurgical. Elle est également utilisée sous forme de bain de bouche pour le soin de la santé bucco-dentaire [72]. De plus, l'eugénol est utilisé en dentisterie en raison de ses propriétés antiseptiques et analgésiques [73].

Dans l'industrie, les huiles essentielles sont utilisées dans le domaine du cosmétique pour plusieurs raisons. Elles servent à donner une fragrance agréable aux produits, à masquer l'odeur des principes actifs, à améliorer la convivialité des produits grâce à une sensation agréable lors de leur utilisation, et à agir comme conservateurs en raison de leurs propriétés antimicrobiennes [74]. Dans le domaine de la parfumerie, malgré la montée de la chimie de synthèse, les huiles essentielles conservent un rôle essentiel. Par exemple, l'huile essentielle d'*Aniba rosaeodora* Ducke, principalement composée de 70 à 90 % de linalol, offre une richesse olfactive supérieure à la molécule pure en raison de la présence de composants minoritaires [75].

1.2.3.1.1.3 Les techniques d'extraction des huiles essentielles

Diverses techniques sont employées pour extraire les composés bioactifs, tels que les huiles essentielles. Le choix de la technique appropriée dépend de la localisation histologique des essences au sein de la plante ainsi que de leur utilisation dans différentes industries. Ces méthodes englobent des techniques d'extractions conventionnelles et des techniques innovantes.

A. Techniques d'extraction et conventionnelles

➤ Entraînement à la vapeur d'eau

L'extraction par entraînement à la vapeur est une méthode ancienne et officiellement approuvée pour extraire les huiles essentielles à partir de matières végétales. Elle implique de placer la matière végétale dans un alambic sur une grille, puis de la soumettre à de la vapeur d'eau, sans la faire tremper dans l'eau. La vapeur est injectée depuis le bas de l'alambic et traverse la plante jusqu'au sommet. La vapeur chargée en huile essentielle est ensuite dirigée dans une colonne à col de cygne, puis elle est condensée avant d'être recueillie dans une fiole florentine (comme illustré dans la figure 1.2). Les huiles essentielles qui sont plus légères ou plus lourdes que l'eau se séparent en deux phases non miscibles et peuvent être facilement séparées. Le principe de cette technique repose sur le fait que la pression de vapeur totale est égale à la pression ambiante à environ 100°C, ce qui permet d'évaporer les composants volatils ayant des points d'ébullition compris entre 150 et 300°C à une température proche de celle de l'eau. En général, l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau est la méthode la plus largement acceptée pour produire des huiles essentielles à grande échelle, comme le mentionnent les références [76, 77].

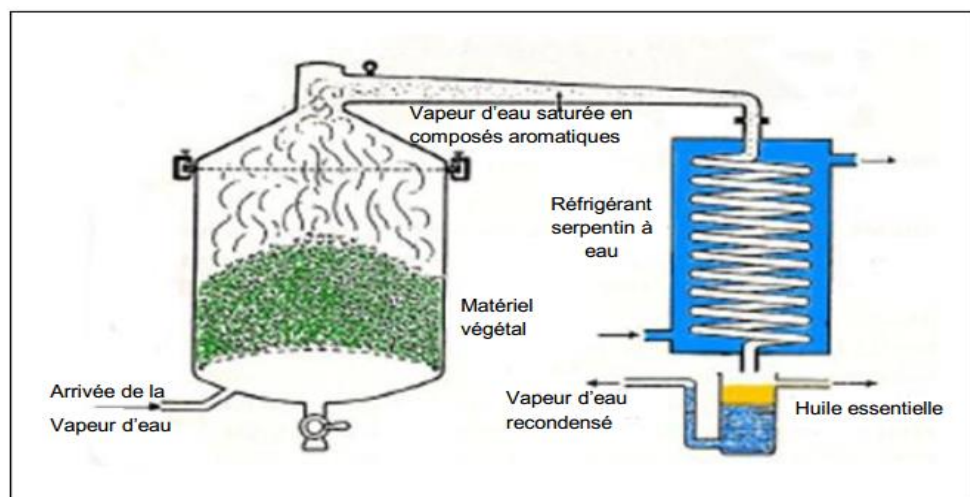


Figure 1.2 : Appareillage utilisé pour entraînement à la vapeur d'eau [78].

➤ Hydrodistillation

L'extraction des produits bioactifs, ainsi que les huiles essentielles peut être réalisée selon différents procédés classiques, basés sur des techniques anciennes. Parmi les méthodes conventionnelles, on trouve l'hydrodistillation, c'est la méthode la plus simple, et la plus utilisée. Contrairement à la méthode de distillation à la vapeur d'eau, la technique

recommandée par la pharmacopée française pour extraire les huiles essentielles des épices séchées et effectuer des contrôles de qualité en laboratoire consiste à immerger directement la matière végétale dans de l'eau. Ce mélange solide-liquide est ensuite chauffé jusqu'à ébullition à la pression atmosphérique dans un appareil appelé alambic. Sous l'effet de la chaleur, les composés aromatiques volatils contenus dans les cellules végétales sont libérés (voir figure 1.3). Le mélange résultant, composé de ces composés aromatiques volatils et d'eau, forme un azéotrope, ce qui signifie qu'ils peuvent être évaporés ensemble à la même pression, puis condensés et séparés dans une fiole florentine en raison de leurs différences d'immiscibilité et de densité. De plus, un système de cohobation est souvent utilisé pour recycler l'eau distillée en la faisant passer par un siphon, ce qui permet d'améliorer le rendement et la qualité des huiles essentielles [76].

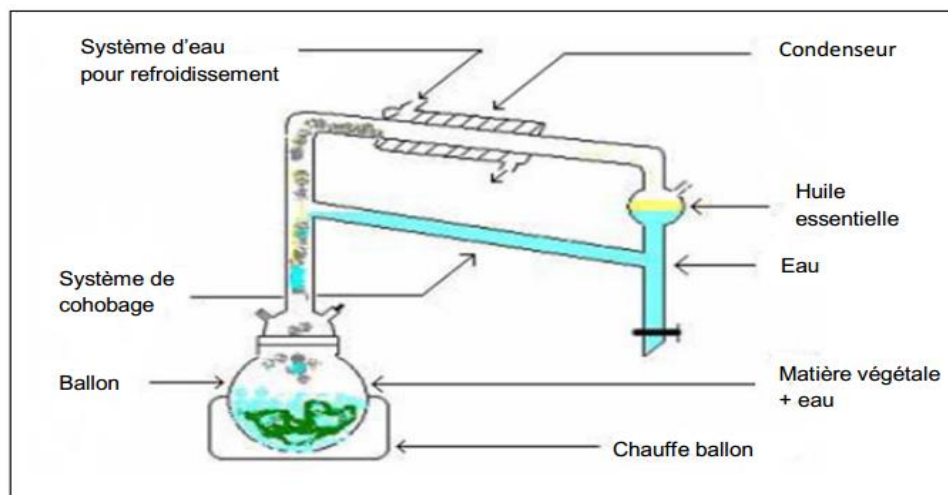


Figure 1.3 : Montage pour hydrodistillation des huiles essentielles [78].

Il y'a d'autres techniques qui sont utilisées pour l'extraction des huiles essentielles comme l'hydrodiffusion, l'expression à froid, l'extraction par solvants organiques et l'enfleurage.

B. Techniques d'extraction innovante

Certaines méthodes d'extraction innovantes ont émergé ces dernières années pour surmonter les limitations des techniques traditionnelles. Ces nouvelles approches s'inspirent des principes de l'extraction verte, visant à réduire les pertes de constituants, la dégradation des composés insaturés par la chaleur et l'utilisation de solvants potentiellement toxiques. Elles offrent de nombreux avantages tels que la réduction du temps d'extraction, la préservation de la composition des extraits, la diminution de la consommation d'énergie et

l'utilisation de petites quantités de solvant, voire l'absence totale de solvant. Parmi ses procédés récents, nous pouvons citer: l'extraction assistée par micro-ondes et par ultrasons, qui améliorent l'efficacité et réduisent le temps d'extraction [79, 80]. On trouve également l'extraction par induction électromagnétique, une méthode électrothermique qui permet de chauffer des matériaux conducteurs d'électricité. Lorsqu'un conducteur électrique est déplacé dans un champ magnétique statique, cela génère un courant électrique dans cet objet, c'est ce que l'on appelle l'induction (figure 1.4) [81]. Ces méthodes récentes visent à améliorer la qualité et la durabilité des extraits tout en minimisant les impacts environnementaux.

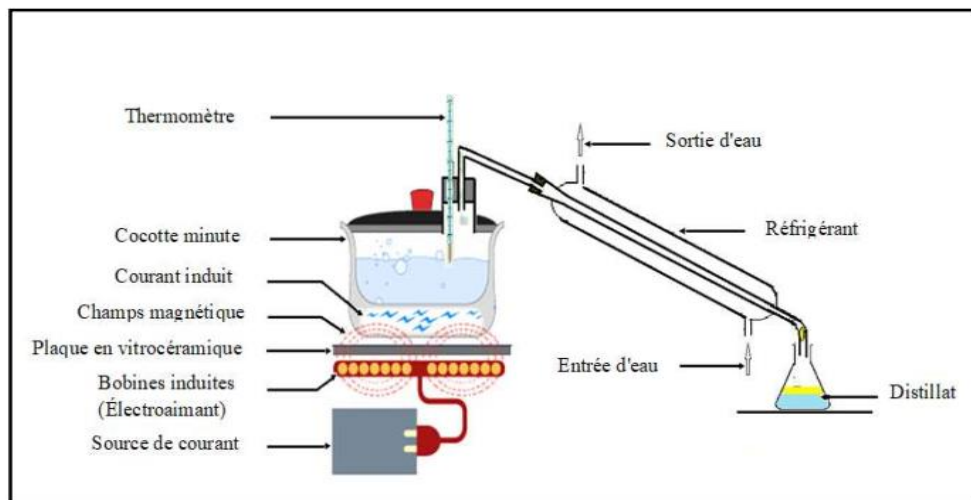


Figure 1.4: Montage d'extraction assistée par chauffage par induction électromagnétique.

1.2.3.1.1.4 Méthodes d'analyse des huiles essentielles

L'analyse chimique des huiles essentielles est une étape cruciale pour leur valorisation et leur commercialisation. Il est indispensable de disposer d'outils analytiques rapides, fiables et appropriés afin d'identifier et de quantifier les divers composants de ces mélanges complexes. En général, l'étude de la composition chimique d'une substance naturelle peut être réalisée par plusieurs approches différentes notamment:

A. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique essentielle pour l'identification de nombreux composés volatils présents dans les huiles essentielles (HE). La CPG offre une excellente capacité de séparation, combinée à une variété de détecteurs, ce qui en fait un outil crucial pour déterminer les différents constituants des HE. Fondamentalement, la chromatographie repose sur la distribution des composants à séparer

entre deux phases non miscibles : une phase stationnaire à grande surface spécifique et une phase mobile qui traverse la phase stationnaire dans une direction précise.

Dans cette technique d'analyse, les composés à étudier sont vaporisés, puis transportés par la phase mobile gazeuse (généralement des gaz vecteurs tels que H₂, N₂ ou He) à travers une colonne. À la sortie de cette colonne de chromatographie, les analytes sont séparés dans le temps en fonction de leur pression de vapeur relative (volatilité) et de leur interaction avec la phase stationnaire. Lorsque les analytes atteignent le détecteur (le détecteur à ionisation de flamme "DIF" ou "FID" étant le plus couramment utilisé), un signal est enregistré, générant un chromatogramme sous forme de pics. Chaque pic est caractérisé par un temps de rétention, qui correspond à la durée écoulée entre l'injection de l'analyte et son arrivée au détecteur, ainsi qu'une aire sous la courbe, permettant de déterminer l'identité du constituant et sa proportion dans le mélange [82].

Cependant, comme les détecteurs tels que le FID, le détecteur de conductivité thermique (DCT) et d'autres ne fournissent pas d'informations structurales sur les molécules analysées, les indices de rétention sont souvent utilisés comme critère principal pour l'attribution des pics. Ce système d'indice de rétention repose sur le classement de chaque analyte en fonction de sa position entre les deux n-paraffines (alkanes normaux). En outre, le calcul de cet indice est basé sur une interpolation linéaire de la longueur de la chaîne carbonée de ces paraffines. Ces indices calculés sont couramment désignés dans la littérature comme indice de rétention (IR) ou indice de rétention linéaire (IRL). Pour caractériser les composés volatils, la série de référence la plus couramment utilisée est celle des n-alcane [83].

B. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés en combinant la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) avec des instruments tels que le spectromètre de masse (MS). La CPG couplée à la MS est la méthode la plus couramment utilisée pour analyser les huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder une molécule avec des électrons, ce qui la fragmente en plusieurs morceaux chargés positivement. Ces fragments constituent le spectre de masse de la molécule. Souvent, ce spectre de masse est caractéristique d'une molécule spécifique, ce qui signifie qu'il est théoriquement possible d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux des composés de référence stockés dans des bibliothèques de spectres informatisées disponibles commercialement [84]. Dans la pratique, l'utilisation combinée de la spectrométrie de masse

(en utilisant à la fois des données de laboratoire et des données de la littérature) ainsi que des indices de rétention calculés à partir de deux colonnes de CPG de polarité différente permet généralement d'identifier de nombreux composants dans des mélanges complexes tels que les huiles essentielles [85, 86]. Il existe d'autres méthodes d'analyse visant à l'identification qualitative et quantitative des différents composants d'une huile essentielle, notamment HPLC, RMN et IR.

1.2.3.1.2 Les travaux réalisés sur les huiles essentielles des différentes espèces du genre *Salvia*

Les huiles essentielles extraites des différentes espèces du genre *Salvia* ont été l'objet de nombreuses études visant à déterminer leur composition chimique. Dans cette première partie, nous explorerons les travaux de recherche bibliographiques portant sur la composition chimique des huiles essentielles isolées à partir de plusieurs origines géographiques de ce genre. La composition chimique de certaines huiles essentielles de *Salvia* est présentée dans les tableaux 1.2, seuls les composés majoritaires (ayant une teneur % $\geq 5,0$) sont mentionnés.

Tableau 1.2: Composants majoritaires (% $\geq 5,0$) d'huiles essentielles des espèces du genre *Salvia*.

Localité / Espèce	Composés majoritaires	Pourcentage % de composé	Référence
Turquie			
<i>S. aucherisubsp Aucheri</i>	α -Pinène	7,6	[87]
	Camphène	7,3	
	β -Pinène	6,1	
	1,8-cinéole	39,2	
	Camphre	20,7	
<i>S. aramiensis</i>	β -Pinène	10,2	
	1,8-cinéole	55,6	
	Camphre	5,7	
<i>S. fruticosa</i>	α -Pinène	5,8	
	1,8-cinéole	52,8	
	Camphre	5,8	
<i>S. verticillatassubsp Amasiaca</i>	β -Pinène	21,4	
	1,8-cinéole	16,1	
	α -Copaène	5,4	
	Alloaromadendrène	5,1	

<i>S. heldreichiana</i>	a-Pinène	5,6	[88]
	1,8-cinéole	5,6	
	Linalool	9,4	
	Cryptone	5,3	
	Bornéol	5,9	
<i>S. dichroantha</i>	Oxide Caryophyllene	22,4	[89]
	Caryophyllenol II (=Caryophylla-2(12), 6 dien-5b-ol)	5,5	
	Phytol	5,6	
<i>S. wiedemanni</i>	α -Pinène	36,2	
	β -Pinène	13,3	
	1,8-Cinéole	14,2	
	p-Cymène	5,4	
	Camphre	7,4	
<i>S. Tomentosa</i>	α -Pinène	25,1	[87]
	1,8-cinéole	7,0	
	Camphre	14,9	
	Bornéol	13,2	
<i>S. verticillata</i>	β -Copaène	5,7	[89]
	β -Caryophyllène	7,6	
	Germacrène D	36,6	
	Acid Hexadécanoïque	6,7	
<i>S. palaestina</i>	β -Caryophyllène	31,6	[90]
	Germacrène D	20,9	
	Bicyclogermacrène	10,8	
	Spathuléol	9,5	
<i>S. cryptantha</i>	1,8-cinéole	16,4	[88]
	Camphre	19,1	
	Bornéol	11,9	
	Viridiflorol	11,5	
Liban			
<i>S. rubifolia</i>	α -Pinène	7,1	[91]
	α -Thujone	5,1	
	trans-Pinocarvyl acétate	5,5	
	γ -Muuroène	11,8	
	γ -Cadinène	5,5	

<i>S. aurea</i>	Aromadendrène	10,7	[92]
	α -Amorphène	12,0	
	Oxide Caryophyllène	12,5	
	Elemenone	6,0	
	Aristolone	11,4	
<i>S. palaestina</i>	Linalool	8,6	[90]
	β -Caryophyllène	16,6	
	Germacrène D	7,2	
<i>S. judaica</i>	α -Copaène	8,7	
	Oxide Caryophyllène	12,8	
	Acide tétradécanoïque	5,8	
<i>S. viscosa</i>	Thymol	6,9	[92]
	α -Cubébène	8,3	
	Oxide Caryophyllène	12,7	
	β -Copaèn-4- α -ol	5,4	
Iran			
<i>S. sclareoides</i>	Bêta-trans-ocimène	11,83	[93]
	Linalool	27,60	
	Trans-Caryophyllène	16,58	
	Germacrène-D	9,98	
<i>S. palaestina</i>	β -Caryophyllène	6,1	[90]
	Germacrène D	14,0	
	1-Epi-cubinol	9,8	
<i>S. hydrangea</i>	(+)- Spathulénol	16,07	[94]
	1,8- cinéole	13,96	
	trans- Caryophyllène	9,58	
	β - Pinène	8,91	
	β -eudesmol	5,33	
<i>S. tebesana Bunge</i>	7-épi- α -Eudesmol	17,5	[95]
	(E)-Nérolidol	12,1	
	(E)-Caryophyllène	7,7	
	α -pinène	7,5	
	Oxyde de caryophyllène	6,8	

<i>S. multicaulis Vahl</i>	1,8-Cinéole	21,0	
	α -Pinène	16,5	
	β -Caryophyllène	8,9	
	Bornéol	8,3	
<i>S. verticillata L</i>	β -Caryophyllène	31,5	
	Germacrène D	16,2	
	Limonène	15,5	[96]
	α -Pinène	10,4	
	α -Humulène	9,4	
<i>S. sclarea L</i>	Sclaréol	11,0	
	Germacrène D	9,8	
	Linalool	9,0	
	α -Terpinéol	7,4	
	Géraniol	4,8	
Italie			
<i>S. hispanica</i>	(Z)-caryophyllène	11,5	[97]
	(E)-caryophyllène	10,6	
<i>S. verbenaca</i>	Benzaldehyde	7,3	
	β -Phellandrène	5,9	
	Acide Hexadecanoïque	23,1	[98]
	Acide (Z)-9-Octadecenoïque	11,1	
Mexique			
<i>S. cacaliifolia Benth</i>	γ -Curcumène	27,64	
	β -Bisabolène	18,01	[99]
	Bicyclogermacrène	8,54	
	Curzérénone	7,68	
Équateur			
<i>S. pichinchensis Benth</i>	cis-cadin-1(6),4-diène	17,11	
	γ -curcumène	13,75	
<i>S. pichinchensis Benth</i>	(E)-caryophyllène	12,58	[100]
	(E, E)- α -farnésène	10,00	
	α -gurjunène	9,46	
	alloaromadendrene	6,96	

Tunisie			
<i>S. verbenaca</i>	α -Terpinéol	5,3	
	Méthyle eugenol	9,4	
	β -Caryophyllène	7,1	
<i>S. verbenaca</i>	Viridiflorol	21,6	
	Camphène	17,6	
	Nonane	10,3	
	Tricyclène	18,8	[101]
	Méthyle eugenol	7,7	
	Térpinolène	7,3	
<i>S. verbenaca</i>	β -Phellandrène	8,2	
	Méthyle eugenol	5,1	
	α -pinéne	5,5	
	(Z)- β -Ocimène	29,5	
	β -Thujone	7,9	
Jordanie			
<i>S. palaestina</i>	α -Copaène	18,58	
	β -Cubébène	8,75	[90]
	Germacrène D	26,02	
	δ -Cadinène	7,58	
	Nonadécane	5,23	
Bulgarie			
<i>S. Tomentosa</i>	α -Pinène	6,0	
	Camphre	7,9	[102]
	Bornéol	10,3	
	β -Pinène	9,0	

1.2.3.2 Les composés phénoliques

1.2.3.2.1 Généralité sur les composés phénoliques

1.2.3.2.1.1 Définition et classification

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.

Les polyphénols se trouvent dans toutes les parties des végétaux, y compris les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs, les pollens, les fruits, les graines et le bois [103]. Ils sont également présents dans diverses sources naturelles telles que les fruits rouges ainsi que le raisin [104].

Les composés phénoliques peuvent être classés en deux grands groupes : les acides phénoliques et les flavonoïdes.

A. Les acides phénoliques

Les acides 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 phytochimiques avec des effets prebiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est très faible car ils sont considérés non toxiques [105]. 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 rats [106].

B. Les flavonoïdes

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) présentent une source très importante d'antioxydants dans notre alimentation. Il y en a 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 1.5).

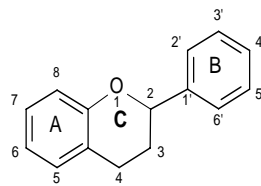


Figure 1.5 : 2-phénylchromane.

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 1.6.

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 polymérisation [107].

- Les enzymes de la biosynthèse

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 : leucoanthocyanidinedioxygénase, LCR : leucoanthocyanidine réductase.

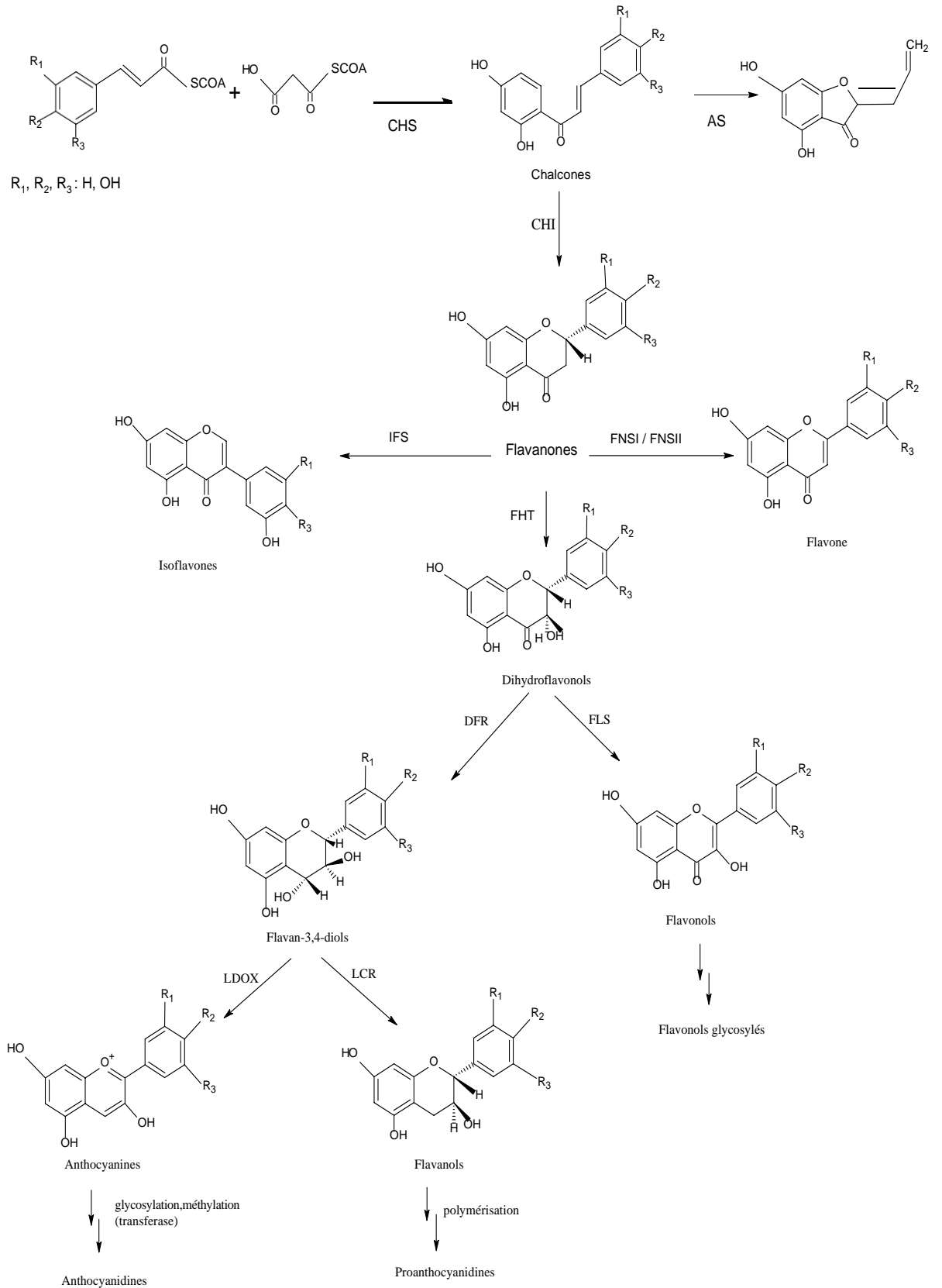


Figure 1.6 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes.

1.2.3.2.1.2 Méthodes d'extraction et d'identification des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est fortement influencée par plusieurs facteurs, notamment le temps d'extraction, le choix du solvant adapté aux molécules cibles, la température, le pH, la taille des particules du matériel végétal, ainsi que le rapport échantillon-solvant. Ces conditions doivent être rigoureusement contrôlées afin de prévenir les réactions d'oxydation, les dégradations thermiques et les modifications biochimiques susceptibles d'altérer la composition et les propriétés des extraits [108].

Parmi les techniques d'extraction classiques, nous citons la macération qui est une technique douce adaptée pour l'extraction des composés phénoliques thermolabiles [109].

L'extraction par Soxhlet présente l'avantage d'utiliser un seul lot de solvant recyclé, permettant une exposition continue du matériau dans l'unité d'extraction à un solvant toujours frais. Cependant, cette méthode n'est pas adaptée aux composés thermosensibles [110].

Étant donné la grande diversité des composés phénoliques, leur quantification précise au sein d'un extrait requiert généralement l'emploi de différentes techniques analytiques, chacune ciblant un groupe spécifique de ces molécules. Par exemple, la méthode de Folin-Ciocalteu est utilisée pour déterminer la teneur en phénols totaux, reposant sur des réactions de réduction chimique en présence de composés phénoliques. Bien que ces méthodes soient simples et rapides, elles présentent des limites en termes de sensibilité et de spécificité pour les composés individuels [111]. Pour le dosage des flavonoïdes, on utilise des méthodes basées sur les réactions des extraits phénoliques avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3) [112].

L'isolement, la purification et l'identification des molécules phénoliques peuvent être réalisés par diverses techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur colonne, la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie liquide haute performance (HPLC). Parmi celles-ci, l'HPLC couplée à un détecteur à diodes array (DAD) ou à un spectromètre de masse (MS) est particulièrement prisée pour la caractérisation des polyphénols. Le DAD permet de recueillir des données spectrales UV/visibles, facilitant ainsi l'identification des composés par comparaison du temps de rétention et du spectre avec ceux d'un standard [113]. La Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem (LC-MS/MS), offre une sensibilité accrue et une grande spécificité grâce à la détection sélective par masse. Cette méthodologie repose sur la séparation des ions en phase gazeuse

selon leur rapport masse/charge (m/z) et permet non seulement de détecter, identifier et quantifier les molécules d'intérêt, mais aussi de caractériser leur structure chimique par fragmentation [114].

1.2.3.2.2 Les travaux antérieurs sur les composés phénoliques du genre *Salvia*

Les principaux composés phénoliques présents dans le genre *Salvia* sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes et les coumarines.

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 de la sauge rouge ou *Danshen chinois* (*Salvia miltiorrhiza*) et *Salvia 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 l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque [115] et l'acide 2,4 diméthoxybenzoïque [116]. La majorité des acides phénoliques présents dans les espèces *Salvia* sont exclusivement ceux de dérivés de l'acide caféique, Ces acides phénoliques sont regroupés en acides monomères (l'acide caféique), dimères (l'acide rosmarinique), trimères (l'acide lithospermique et l'acide salvianolique A), tétramères (l'acide salvianolique B) et d'autres oligomères [117]. La distribution des acides phénoliques dans le genre *Salvia* est présentée dans le tableau suivant. Tableau 1.3: Distribution des acides phénoliques dans le genre *Salvia*.

Acides phénoliques isolés	Espèce	Référence
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (acide protocatéchique)	<i>S. sonchifolia</i>	[115]
Acide 2,4 diméthoxybenzoïque	<i>S. candidissima</i>	[116]
Acide caféique	<i>S. albimaculata</i>	[118]
	<i>S. bowleyana</i>	[119]
	<i>S. calycina</i>	[120]
	<i>S. horminum</i>	[121]
	<i>S. limbata</i>	[122]
	<i>S. plebeia</i>	[123]
	<i>S. sonchifolia</i>	[115]
	<i>S. triloba</i>	[120]
Acide chlorogénique	<i>S. albimaculata</i>	[118]
	<i>S. horminum</i>	[121]
	<i>S. triloba</i>	[120]
Acide rosmarinique	<i>S. bowleyana</i>	[119]
	<i>S. flava</i>	[124]
	<i>S. miltiorrhiza</i>	[125]
	<i>S. sonchifolia</i>	[115]

Rosmarinate de méthyle	<i>S. bowleyana</i>	[119]
	<i>S. sonchifolia</i>	[115]
Acide salvianolique A	<i>S. flava</i>	[124]
	<i>S. miltiorrhiza</i>	[126]
Acide salvianolique B	<i>S. bowleyana</i>	[119]
	<i>S. flava</i>	[124]
	<i>S. miltiorrhiza</i>	[125]
	<i>S. sonchifolia</i>	[115]
Acide salvianolique C	<i>S. bowleyana</i>	[119]
	<i>S. miltiorrhiza</i>	[125]
Acide salvianolique D		
Acide salvianolique E	<i>S. miltiorrhiza</i>	[127]
Acide salvianolique F	<i>S. miltiorrhiza</i>	[128]
Acide salvianolique G	<i>S. miltiorrhiza</i>	[129]
Acide salvianolique H	<i>S. cavaleriei</i>	
Acide salvianolique I	<i>S. cavaleriei</i>	[48]
Acide salvianolique J	<i>S. flava</i>	[124]
Acide salvianolique K	<i>S. deserta</i>	[130]
acide yunnaneique A		
acide yunnaneique B		
acide yunnaneique C	<i>S. yunnanensis</i>	[131]
acide yunnaneique D		
acide yunnaneique E		
acide yunnaneique F		
acide yunnaneique G	<i>S. yunnanensis</i>	[132]
acide yunnaneique H		
Acide lithospermique	<i>S. yunnanensis</i>	[133]

Les flavonoïdes sont largement distribués dans le genre du *Salvia* [134-137], étant principalement présents sous forme de flavones, flavonols et leurs glycosides. Les Flavones 6- hydroxylés ont été signalés à être particulièrement taxonomique de ce genre [138]. 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 [139, 140]. La répartition des flavonoïdes aglycones au sein du genre *Salvia* est présentée dans le tableau 1.4 ci-dessous.

Tableau 1.4: Distribution des flavonoïdes aglycones dans le genre *Salvia*.

Flavonoïdes aglycones	Espèce	Référence
5, 7,4'-Trihydroxyflavone (apigénine)	<i>S. aegyptiaca</i>	[141]
	<i>S. albimaculata</i>	[118]
	<i>S. horminum</i>	[121]
	<i>S. kopolnovii</i>	[135]
	<i>S. limbata</i>	[122]
	<i>S. nemorosa</i>	[135]
	<i>S. pedicellata</i>	[134]
	<i>S. sclarea</i>	[135]
	<i>S. glutinosa</i>	[139]
	<i>S. verbenaca</i>	[142]
5,4'-Dihydroxy 7-méthoxyflavone (genkwanine)	<i>S. dorrii</i>	
	<i>S. microsiphon</i>	[140]
5-Hydroxy 7,4'-diméthoxyflavone	<i>S. stenophylla</i>	
	<i>S. dorrii</i>	
	<i>S. hypoleuca</i>	[140]
	<i>S. macrosiphon</i>	
	<i>S. verbenaca</i>	[142]
5, 7,3',4'-Tétrahydroxyflavone (Lutéoline)	<i>S. aegyptiaca</i>	[141]
	<i>S. albimaculata</i>	[118]
	<i>S. dorrii</i>	[140]
	<i>S. horminum</i>	[121]
	<i>S. hypoleuca</i>	[140]
	<i>S. limbata</i>	[122]
	<i>S. pedicellata</i>	[134]
	<i>S. stenophylla</i>	[140]
	<i>S. verbenaca</i>	[142]
	<i>S. tomentosa</i>	[143]
6, 7,4'-Triméthoxyflavone (salvigenine)	<i>S. lanigera</i>	[144]
	<i>S. triloba</i>	[145]
5,3',4'-Trihydroxy 7-méthoxyflavone	<i>S. euphratica</i>	[134]
	<i>S. hypoleuca</i>	[140]
5, 7,4'-Trihydroxy 3'-méthoxyflavone (chrysoeriol)	<i>S. candidissima</i>	[116]
	<i>S. dorrii</i>	[140]
	<i>S. mirzayana</i>	
	<i>S. candidissima</i>	[116]

5-Hydroxy 7,3',4'-triméthoxyflavone	<i>S. euphratica</i>	[134]
5,4'-Dihydroxy 6,7-diméthoxyflavone (cirsimaritine)	<i>S. columbariae</i>	[140]
	<i>S. dorrii</i>	
5,4'-Dihydroxy 6,7-diméthoxyflavone (cirsimaritine)	<i>S. macrosiphon</i>	[140]
	<i>S. mirzayana</i>	
5,7-Dihydroxy 6,4'-diméthoxyflavone (pectolinarigenine)	<i>S. hypoleuca</i>	[140]
	<i>S. pedicellata</i>	[134]
5,6-Dihydroxy 7,4'-diméthoxyflavone	<i>S. hypoleuca</i>	[140]
	<i>S. stenophylla</i>	
5,3',4'-Trihydroxy 6,7-diméthoxyflavone (cirsiliol)	<i>S. columbariae</i>	[140]
	<i>S. dorrii</i>	
	<i>S. guranitica</i>	[146]
	<i>S. hypoleuca</i>	
	<i>S. macrosiphon</i>	[140]
	<i>S. stenophylla</i>	
5-Hydroxy 6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone	<i>S. verbenaca</i>	[147]
	<i>S. lavanduloides</i>	[148]
5-Hydroxy 6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone	<i>S. macrosiphon</i>	[140]
	<i>S. mirzayana</i>	
5,8,4'-Trihydroxy 7-méthoxyflavone (salvitine)	<i>S. plebeia</i>	[149]
5,3'-Dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone	<i>S. miltiorrhiza</i>	[150]
5,7,4'-Trihydroxyflavonol (kaempférol)	<i>S. dorrii</i>	[140]
5,7,3',4'-Tétrahydroxyflavonol (quercétine)	<i>S. dorrii</i>	[140]
5,7,3',4'-Tétrahydroxy 3-méthoxyflavone	<i>S. compressa</i>	[140]
5,7,4'-Trihydroxy 3,3'-diméthoxyflavone	<i>S. pedicellata</i>	[134]
5,7-Dihydroxy 3,6,4'-triméthoxyflavone (santine)	<i>S. pedicellata</i>	[134]
3,7,4'-Trihydroxy 5,6-diméthoxyflavone	<i>S. columbariae</i>	[140]

Flavone O-glycosides sont apparemment courante dans *Salvia* et la plupart d'entre eux sont flavone 7-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 l'apigénine 7-Cellobioside [151], l'apigénine 7-rutinoside [121] et l'apigénine 7-cellobioside-4'-glucoside [151]. Le tableau 1.15 montre la répartition des flavonoïdes glycosides dans le genre *Salvia*.

Tableau 1.5: Distribution des flavonoïdes glycosides dans le genre *Salvia*.

Flavonoïdes glycosides isolés	Espèce	Référence
Apigénine-7-glucoside (cosmosiine)	<i>S. aegyptiaca</i>	[141]
	<i>S. albimaculata</i>	[118]
	<i>S. calycina</i>	[120]
	<i>S. horminum</i>	[121]
	<i>S. limbata</i>	[122]
Apigénine 7-Xyloside	<i>S. spp. (3)</i>	[136]
Apigénine 7-Cellobioside	<i>S. uliginosa</i>	[151]
Apigénine 7-Rutinoside	<i>S. horminum</i>	[121]
Apigénine 7-Cellobioside-4'-glucoside	<i>S. uliginosa</i>	[151]
Lutéoline-7-glucoside (cinaroside)	<i>S. aegyptiaca</i>	[141]
	<i>S. albimaculata</i>	[118]
	<i>S. calycina</i>	[120]
	<i>S. euphratica</i>	[134]
	<i>S. horminum</i>	[121]
	<i>S. limbata</i>	[122]
Lutéoline 7-Rutinoside	<i>S. horminum</i>	[121]
6-hydroxy 6,7-Diméthoxylutéoline -5-glucoside	<i>S. verbenaca</i>	[147]
Kaempférol-3-glucoside (astragaline)	<i>S. cavaleriei</i>	[152]
Quercétine 3-Glucoside (isoquercitrine)	<i>S. cavaleriei</i>	[152]

Les anthocyanes sont particulièrement abondants dans les fleurs rouges ou pourpres du *Salvia* [153, 154]. Les anthocyanes du *Salvia* ont d'abord été étudiés par Willstatter et Bolton [155] et le pigment appelé salvianin a été identifié comme pélargonidine 3- (6-caffeoylglucoside) -5-(4,6-dimalonylglucoside) [156]. Le tableau 1.6 illustre la distribution des anthocyanines dans le genre *Salvia*.

Tableau 1.6: Distribution des anthocyanines dans le genre *Salvia*.

Anthocyanines isolés	Espèce	Référence
Pélargonidine-3-(6-cafféoylglucoside)-5-(4,6-dimalonyl-glucoside) (salvianine)	<i>S. splendens</i>	[156]
Pélargonidine-3-(6-Cafféoylglucoside)-5-(6-malonyl-glucoside)	<i>S. splendens</i>	[156]
Pélargonidine-3-(6-Cafféoylglucoside)-5-glucoside	<i>S. splendens</i>	[153-156]
Pélargonidine-3-(6-p-Coumaroylglucoside)-5-glucoside	<i>S. splendens</i>	[153]
Cyanidine-3-(6-Caffeoylglucoside)-5-glucoside	<i>S. coccinea</i>	[153]
Cyanidine-3-(6-p-Coumaroylglucoside)-5-glucoside	<i>S. horminum</i>	[154]
Delphinidine-3-(6-caffeoylglucoside)-5-(4,6-dimalonyl-glucoside) (salviadelphine)	<i>S. splendens</i>	[156]
Delphinidine-3-(6-Caffeoylglucoside)-5-glucoside	<i>S. splendens</i>	[153]
Delphinidine-3-(6-p-Coumaroylglucoside)-5-(6-malonyl-glucoside)	<i>S. farinacea</i> <i>S. uliginosa</i>	[156] [157]

1.2.3.3 Les Terpénoïdes

1.2.3.3.1 Généralité sur les terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des composés synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même les animaux. L'exploitation de la majorité de ces composés s'effectuait sous forme des huiles essentielles extraites de plantes par le procédé de l'hydrodistillation [158, 159].

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.

Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des plantes. 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 [160].

Les diterpènes 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 gommés naturelles et les gibbérellines [161]. 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.

Les triterpènes sont des molécules à 30 atomes de carbone. Ils ont comme précurseur le squalène. 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, glycoside ou ester.

1.2.3.3.2 Les travaux antérieurs sur les terpénoïdes du genre *Salvia*

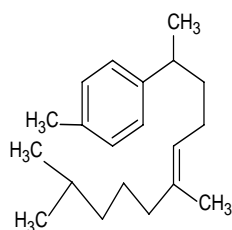
Le genre *Salvia* est une source riche et variée de terpènes, avec une prédominance de sesquiterpènes et de diterpènes (abiétanes et néo-cerdanes), mais aussi la présence de sesterterpènes et de triterpènes.

La répartition des différents types de sesquiterpènes dans le genre *Salvia* peut varier selon les espèces, influençant ainsi leur utilisation en médecine traditionnelle et en phytothérapie moderne. Le tableau 1.7 présente une vue d'ensemble de la distribution des sesquiterpènes au sein de différentes espèces du genre *Salvia*.

Tableau 1.7 : Distribution des sesquiterpènes dans le genre *Salvia*.

Sesquiterpènes isolés	Espèce	Référence
Salvinine	<i>S. divaricata</i>	[162]
	<i>S. candidissima</i>	[116]
	<i>S. limbata</i>	[163]
Spathulenol	<i>S. cyanescens</i>	[164]
	<i>S. sclarea</i>	[165]
	<i>S. yosgadensis</i>	[166]
	<i>S. cyanescens</i>	[164]
Oxyde de caryophyllène	<i>S. sclarea</i>	[165]
	<i>S. yosgadensis</i>	[166]
1β-acetoxyeudesm-4(15), 7-dien-8α,12-olide	<i>S. yosgadensis</i>	[166]
1β-Acetoxy-8β-hydroxyeudesm-4(15),7(11)-dien-8α, 12-olide	<i>S. potentillifolia</i>	[167]
Lédol	<i>S. tchihatcheffii</i>	[168]

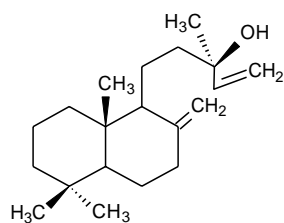
Plus de 535 diterpènes appartenant aux 142 espèces du genre *Salvia* ont été répertoriés, ils sont répartis dans différents types, catégories et groupes. A notre connaissance un seul diterpène monocyclique, le 2,6-diméthyl-10-(ptolyl) undeca-2,6-(E) diène a été isolé de l'espèce *Salvia dorisiana*, il est caractérisé par un cycle aromatique et une longue chaîne latérale [169].



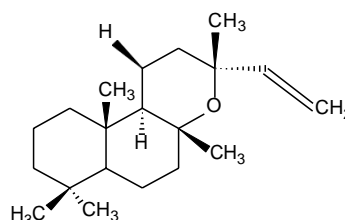
2,6-diméthyl-10-(ptolyl) undeca-2,6-(E)-diène

Les diterpènes bicycliques isolés des espèces du genre *Salvia* sont constitués de 4 types de squelettes.

- Les labdanes tels que le Manool [170] et le Manoyloxide [171] qui ont été isolés de l'espèce *Salvia-candidissima*.

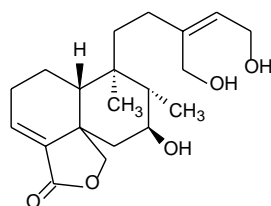


Manool

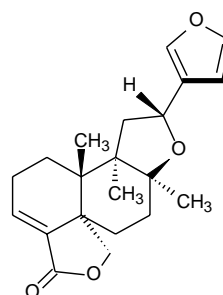


Manoyloxide

- Les clérodanes et les néo-clérodanes tels que le Portulide, isolé de l'espèce *Salvia melissodora* [172] et le Dehydrokerline, isolé de l'espèce *Salvia polystachya* [173].

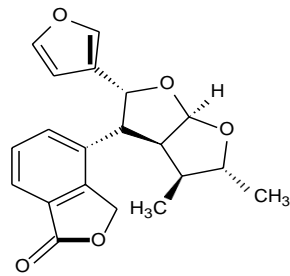


Portulide C

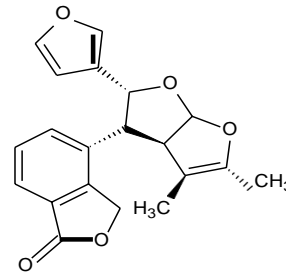


Dehydrokerline

- Les séco-clérodanes tels que le Rhyacophilline et le 7,8-didehydrorhyacophilline qui ont été isolés des espèces *Salvia rhyacophylla* [174] et *Salvia reflexa* [175], respectivement.

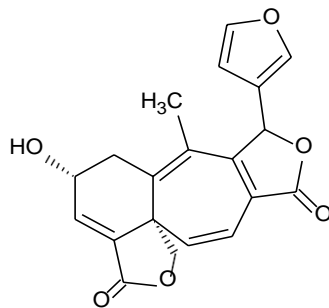


Rhyacophilline

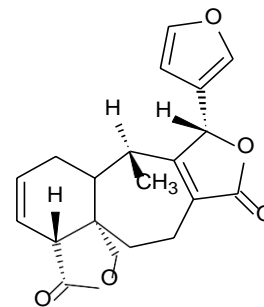


7,8-Didehydrorhyacophilline

- Les clérodanes arrangés, comme par exemple le salvianduline qui a été isolé de l'espèce *Salvia leucantha* [176] et le Blephanolide qui a été isolé de l'espèce *Salvia blepharophylla* [177].

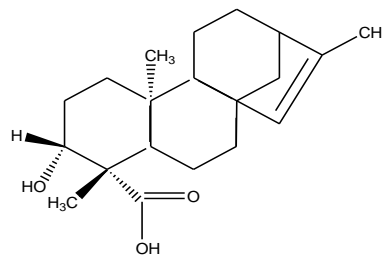


Salvianduline E

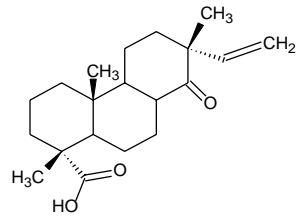


Blephanolide B

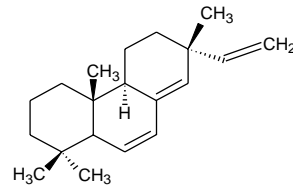
Les études effectuées sur ce genre ont montré qu'il existe également 4 types de diterpènes tricycliques à savoir: les pimaranes, les abiétanes, les cassanes et les kauranes. Il faut noter que les abiétanes sont les plus abondants. A notre connaissance, il y a un seul diterpène tétracyclique de type kaurane, qui a été isolé de l'espèce *Salvia verbenaca* [178].

Verbénacine isolé de l'espèce *Salvia verbenaca* [178]

- Les pimaranes

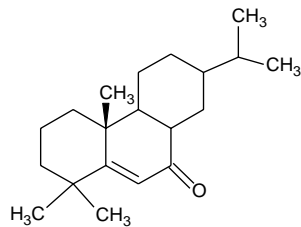


Acide 14-oxopimarique isolé de l'espèce *Salvia candidissima* [179]

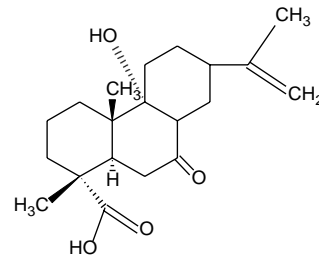


Isopimara-6,8(14),15-triène isolé de l'espèce *Salvia Salvia parryi* [180]

- Les abiétanes

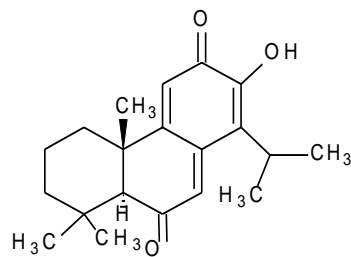


Pachystazone isolé de l'espèce *Salvia candidissima* [181]

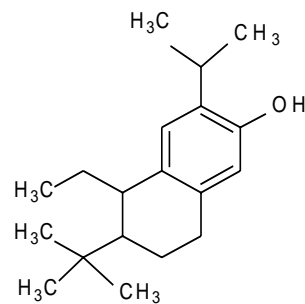


Acide wiedenmannique isolé de l'espèce *Salvia heldrichiana* [182]

- Les cassanes



Mattenquinone isolé de l'espèce *Salvia melissodora* [183]



Sempervirole isolé de l'espèce *Salvia multicaulis* [184]

Parmi Triterpènes isolés du genre *Salvia*, nous citons deux types de squelettes, le 2-acétoxyupeol et le lupin-2,3-diol qui ont été isolés à partir du *Salvia leriifolia* [185] et l'oléanane (l'Acide 2 α , 3 α , 16 α -trihydroxy-24-nor-4 (23), 12-oleandien-28-oïque) qui a été isolé à partir des parties aériennes de *Salvia palaestina Benth* [186].

1.3 Présentation des espèces étudiées

1.3.1 Classification dans la systématique botanique

Le nom générique *Salvia* est un emprunt au latin «*salvia*» désignant diverses sauges [187] chez Pline, terme dérivant lui-même de *saluus* «plante donnant la santé».

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

Espèce :	<i>Salvia microphylla</i>	<i>Salvia officinalis</i>
En Français:	La sauge de Graham	La sauge officinale
Synonymes :	<i>Salvia grahamii</i>	Miramia ou siwak ennabie
Autres noms	Sauge à petites feuilles	sauge à feuilles larges

Salvia microphylla est connu sous le nom de « mirto de montes » ou « myrte des montagnes » au Mexique. Par ailleurs, *Salvia officinalis* porte différentes appellations selon les régions. En Turquie, elle est largement connue sous le nom d'adaçayı, signifiant "le thé des îles". En Algérie, on la nomme miramia ou siwak ennabie [188]. Elle est connue aussi sous le nom "Essalma" chez les Andalous et "Salbia" chez les botanistes en Espagne. Elle est également appelée sauge, sauge de jardin, sauge doré, sauge de cuisine, vraie sauge, sauge culinaire.

1.3.2 Présentation botanique et répartition géographique des espèces étudiées

A. *Salvia microphylla*

La sauge de Graham ou sauge à petites feuilles est originaire du sud des États-Unis et du Mexique. Cette espèce pousse à l'état sauvage mais elle s'hybride facilement. De nombreux hybrides et cultivars ont été introduits dans l'horticulture depuis les années 1990. *Salvia microphylla* 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) [189] 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 (figure 1.7).



Figure 1.7 : *Salvia microphylla* [190].

Salvia microphylla est un buisson compact qui perd ses feuilles en hiver et prospère lorsqu'il est exposé à une forte luminosité. Elle pousse facilement dans les régions tempérées chaudes et a la particularité de croître rapidement. Cette variété de sauge est très généreuse en fleurs, offrant une floraison constante de mai jusqu'aux premières gelées. Elle peut résister à des températures aussi basses que -12 °C, mais pour maintenir sa vitalité, il est recommandé de la tailler de manière significative avant la saison hivernale. Il est à noter que chez certains cultivars, la couleur des fleurs peut évoluer au fil des saisons : elle est rouge au printemps et en automne, puis devient bicolore (rouge et blanc) pendant les mois les plus chauds.

B. *Salvia officinalis*

Salvia officinalis est une plante vivace qui pousse sous forme d'un sous-arbuste très ramifié, atteignant jusqu'à 60 cm de hauteur. Ses feuilles sont simples, opposées, persistantes, et dégagent une forte odeur aromatique. La face inférieure des feuilles est recouverte de poils blancs, tandis que la surface supérieure est généralement de couleur verte ou gris verdâtre, avec une bordure dentelée [191, 192]. Les tiges de la plante peuvent être dressées ou couchées, et elles sont couvertes de branches veloutées de couleur verte foncée (Figure 1.8).

Les fleurs de la sauge officinale sont disposées en 6 à 8 verticilles, avec chaque verticille contenant de 4 à 10 fleurs. Ces fleurs forment une inflorescence en épi et sont de grande taille, mesurant de 20 à 35 mm de long. Elles ont une forme bilabée et sont de couleur bleu-violacé clair. Les pédoncules des fleurs sont courts, et elles sont généralement visibles de mai à août. Les fleurs de la sauge officinale sont pentamères, ce qui signifie qu'elles ont des parties en multiples de cinq, comprenant 4 étamines et 2 carpelles soudés. L'ovaire est supère et divisé en 4 loges, avec un style et 2 stigmates [193] (Figure 1.8).



Figure 1.8 : *Salvia officinalis* [194].

Salvia officinalis est une plante aromatique originaire des régions méditerranéennes orientales [195], notamment du bassin méditerranéen, de l'Espagne à la Turquie, ainsi que du nord de l'Afrique. Elle est également cultivée en Algérie [196]. La sauge prospère dans des sols légers, perméables, voire rocaillieux, et elle préfère une exposition ensoleillée. Elle s'épanouit particulièrement dans des terrains chauds et calcaires, et elle présente une résistance à la sécheresse [197].

1.3.3 Usages traditionnels des espèces étudiées

A. *Salvia microphylla*

Salvia microphylla est couramment utilisée en médecine populaire, dans les rituels de guérison au Mexique et en Amérique centrale [189]. Au cours de ces rituels, une infusion préparée à partir des fleurs de cette plante est consommée tout au long de la journée. En dehors de ces traditions, *Salvia microphylla* est également fréquemment utilisée pour soulager les maux d'estomac et les troubles gastro-intestinaux. Les personnes affectées boivent une infusion de cette plante, parfois en association avec la grande camomille (*Tanacetum parthenium*), afin de traiter la diarrhée.

B. *Salvia officinalis*

Salvia officinalis est une plante médicinale qui a une longue histoire d'utilisation remontant à l'Antiquité. Son nom latin, "*Salvia*" est dérivé du mot latin "salvare" qui signifie "sauver" ou "guérir" ce qui reflète son utilisation traditionnelle pour ses propriétés curatives. Il existait un dicton populaire disant «Pour quelle raison un homme devrait-il mourir alors que de la sauge pousse dans son jardin». Voici un aperçu des propriétés médicinales et pharmacologiques de *Salvia officinalis* [198]:

- Utilisation historique: Les Égyptiens utilisaient la sauge pour traiter l'infertilité ;
- Asthme: Les feuilles séchées de sauge ont été fumées pendant longtemps pour soulager les symptômes de l'asthme ;
- Antitranspirant: La sauge est utilisée en médecine traditionnelle pour réduire la transpiration excessive ;
- Gargarisme: Elle est également utilisée en gargarisme pour soulager les maux de gorge ;
- Régularité menstruelle: On lui attribue la capacité d'améliorer la régularité du cycle menstruel chez certaines femmes ;
- Ménopause: Elle peut aider à réduire les bouffées de chaleur, un symptôme fréquent de la ménopause ;
- Problèmes gastro-intestinaux: La sauge est utilisée pour lutter contre les gastro-entérites et peut contribuer à améliorer la digestion ;
- Fonction hépatique: Des études suggèrent qu'elle peut aider à améliorer la fonction hépatique ;
- Appétit et digestion: Elle est également utilisée pour stimuler l'appétit et faciliter la digestion ;
- Amélioration de la capacité mentale: La sauge est réputée pour ses effets positifs sur la

capacité mentale, bien que les mécanismes précis ne soient pas toujours clairs ;

- Problèmes circulatoires et nerveux: Les infusions de sauge sont appliquées pour traiter plusieurs affections liées à la circulation sanguine et aux problèmes du système nerveux [199] ;
- Utilisation dans l'industrie alimentaire, la parfumerie et la cosmétique: Outre ses utilisations médicinales, la sauge est également employée dans la préparation des aliments, la fabrication de tisanes [200], la parfumerie et l'industrie cosmétique [201].

1.3.4 Composition chimique des espèces étudiées

1.3.4.1 Travaux antérieurs sur les huiles essentielles des espèces étudiées

Plusieurs études ont examiné la variation de la composition chimique des huiles essentielles de *Salvia microphylla* récoltées pendant leur période de floraison. Le tableau 1.8 présente les constituants majoritaires présents dans les huiles essentielles de *Salvia microphylla* provenant de différentes parties de la plante et de diverses origines.

Tableau 1.8 : Composants majoritaires ($\% \geq 5,0$) des huiles essentielles de l'espèce *Salvia microphylla*.

Composés majoritaires	Localité et pourcentage % de composé				
	Les feuilles fraîches		Les parties aériennes		Les fleurs
	Brazil [202]	Californie [203]	Italie [204]	Tunisie [205]	Italie [206]
α -Pinène	-	-	5,89	-	-
Camphène	-	-	5,31	-	-
1,8- Cinéole	-	6,20	8,43	11,25	-
Camphre	-	10,00	-	-	-
Thymol	-	-	-	-	8,10
Acétate d'isobornyle	-	-	9,13	-	-
Cis p-Menthan-3-one	-	-	-	10,74	-
Carvacrol	-	-	-	-	10,90
(E) caryophyllène	15,35	5,50	10,80	13,32	-
Bicyclogermacrène	6,17	-	-	-	-
Davana éther	-	-	-	-	16,30
(-) Spathulénol	-	-	-	6,77	-
Guaiol	-	24,60	-	-	-
γ - Eudesmol	6,17	-	-	6,06	-
β - Eudesmol	8,74	-	5,27	9,71	-
α - Eudesmol	14,06	18,00	6,41	-	-
Hexahydrofarnésyl acétone	-	-	-	-	11,90
2,6, 10,14-Tétraméthyl-7-(3-méthylpent-4 énylidène) pentadécane	-	-	-	-	5,30

Le tableau 1.8 présenté met en lumière la diversité chimique des huiles essentielles extraites de différentes parties de la plante *Salvia microphylla*, provenant de diverses régions géographiques. Cette diversité est influencée par des facteurs à la fois géographiques et botaniques. L'analyse des différentes parties de la plante (feuilles, parties aériennes, fleurs) provenant de diverses régions (Brésil, Californie, Italie, Tunisie) met en évidence une complexité notable. Si certains composés, tels que le (E)-caryophyllène, le β -eudesmol et l' α -eudesmol, sont présents dans la majorité des échantillons, leurs proportions varient significativement. Par exemple, les feuilles brésiliennes se distinguent par une forte concentration en sesquiterpènes, tandis que l'huile essentielle extraite des feuilles fraîches de Californie se caractérise par une teneur élevée en guaiol. Les huiles essentielles issues des parties aériennes de *salvia microphylla* cultivé en Italie et en Tunisie présentent un profil plus équilibré, avec une diversité de monoterpènes et de sesquiterpènes. En revanche, l'huile essentielle extraite des fleurs italiennes de *Salvia microphylla* affiche une composition chimique complètement différente, dominée par des phénols comme le thymol et le carvacrol et en composés terpéniques spécifiques (davana éther, hexahydrofarnésyl acétone). Contrastant nettement avec les profils observés dans les autres parties de la plante. Ces variations s'expliquent par une combinaison de facteurs, notamment, le génotype, les conditions environnementales et le stade de développement de la plante.

À ce jour, aucune recherche scientifique n'a été effectuée concernant la composition chimique de l'espèce *Salvia microphylla* originaire d'Algérie, constituant ainsi une lacune importante dans la connaissance de cette plante.

De nombreux travaux réalisés concernant la composition chimique des huiles essentielles de *Salvia officinalis* ont été rapporté dans la littérature. Les analyses GC et GC-MS ont révélé une prédominance de monoterpènes, notamment le camphre, le 1,8-cinéole et le thujone, qui se compose d'un mélange d' α -thujone et de β -thujone. D'autres composés tels que le bornéol, l'acétate de bornyle et l' α - pinène ont également été identifiés. De plus, ces huiles essentielles renferment des sesquiterpènes tels que le viridiflorol, l' α -humulène et le β -caryophyllène. Le tableau ci-dessous résume les composés majoritaires des huiles essentielles de l'espèce *Salvia officinalis* provenant de différentes régions (Tableau 1.9).

Tableau 1.9 : Composants majoritaires (% \geq 5.0) des huiles essentielles de l'espèce *Salvia officinalis* provenant de différents pays.

Composés majoritaires	Localité et pourcentage % de composé										
	Tunisie [16, 207]		Italie [208]			Maroc [209]	Croatie [210]	Liban [211]	Iran [212]	Serbie [213]	Allemagne [214]
	Chott Meriam	El Marsa	Orsomarso	Civita	Buonvicino						
α -Pinène	-	-	-	-	-	7,46	-	-	-	-	-
Camphène	-	-	6,27	7,53	-	-	-	-	-	-	5,26
β -Pinène	-	-	-	9,14	-	-	-	-	-	-	6,54
1,8- Cinéole	14,40	22,22	9,86	8,80	9,21	11,46	8,10	14,64	11,97	13,80	15,52
α -Thujone	18,83	21,43	9,26	-	7,63	-	26,50	38,56	38,05	43,20	8,05
β -Thujone	-	-	-	-	8,10	21,80	13,80	-	5,88	5,60	-
Camphre	25,14	33,61	16,84	16,16	18,92	15,33	23,60	29,53	16,08	17,60	13,49
Bornéol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,47
β -Caryophyllène	-	-	-	-	-	6,76	-	-	-	-	-
α -Humulène	-	-	-	-	-	-	-	5,92	-	-	8,21
Viridiflorol	7,98	-	-	-	-	6,20	9,30	-	-	-	-

D'après le Tableau 1.9 la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* s'avère très variable, dépendant de son origine géographique. Elle est de chemotypes camphre, 1,8-cinéole et α -thujone pour la plupart des espèces étudiées. Le camphre représente le composant majeur des huiles essentielles de *Salvia officinalis*, avec des concentrations allant de 13,49 % à 33,61 %, soulignant son importance dans la fragrance et les propriétés de l'huile. Le 1,8-cinéole se distingue également par sa présence constante et élevée, avec des concentrations variant de 8,1% à 22,22 %, ce qui indique son rôle prépondérant dans l'huile. L' α -thujone est également se distingue par sa concentration particulièrement élevée dans l'huile essentielle de Serbie (43,2 %), du Liban (38,56 %) et de l'Iran (38,05 %). De même, le β -thujone est bien représenté dans les échantillons du Maroc (21,80 %) et en Croatie (13,8 %), mais est moins présent dans d'autres régions. Des différences notables apparaissent avec des composés comme le β -pinène et le camphène, qui ne se trouvent que dans les huiles essentielles provenant d'Italie (Orsomarso et Civita) et d'Allemagne. L'absence ou la présence sporadique de certains composants, comme le β -caryophyllène, l' α -humulène et le viridiflorol dans certains échantillons, met en évidence les variations géographiques et les spécificités locales de cette huile essentielle.

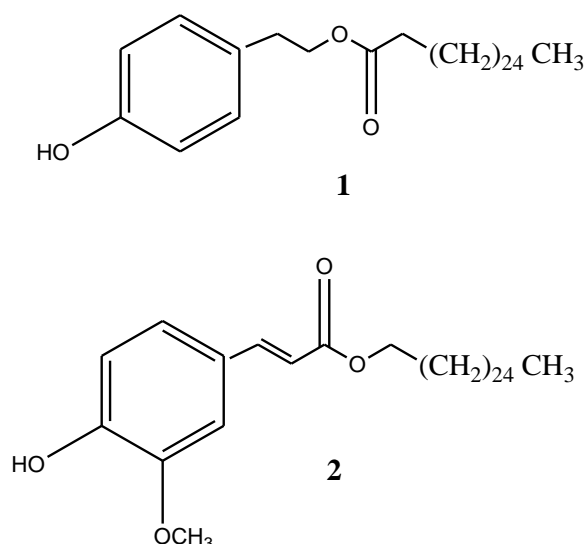
La composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Salvia officinalis* récoltée en Algérie est présentée dans le tableau 1.10, l'huile essentielle de *Salvia officinalis* de l'Algérie se caractérise par une grande diversité chimique, en fonction de son origine géographique. Parmi les constituants dominants, on trouve des concentrations élevées de 1,8-cinéole, particulièrement dans les huiles essentielles issues des régions de Hamma (15,42%) et Batna (15,92%). De même, L' α -thujone est également bien représenté, avec des niveaux maximaux dans les échantillons de Kherrata (25,20%) et Batna (24,52%). Quant au camphre, il est largement présent, notamment dans les huiles essentielles de Hamma (25,29%) et Kherrata (18,73%). Des différences notables apparaissent également dans la composition des huiles essentielles. Par exemple, l'acétate de cischrysanthényle, présent à 64,82% dans l'huile essentielle de Bouira, est complètement absent dans les autres échantillons. De plus, certains composés tels que le β -Thujone et le β -caryophyllène sont présents de manière sporadique, voire inexistante, selon la région. Le caryophyllène oxyde, le manool et le β -silinène sont chacun présents exclusivement dans une seule région.

Tableau 1.10 : Composants majoritaires (% \geq 5.0) des huiles essentielles de l'espèce *Salvia officinalis* récoltée en Algérie.

Composés majoritaires	Kherrata	Hamma	Alger	Laghouat	Mascara	Batna	Batna	Constantine	Bouira
	[215]	[216]	[217]	[218]	[219]	[220]	[221]	[222]	[223]
1,8- Cinéole	11,75	15,42	12,30	10,06	11,40	11,80	15,92	8,11	-
α -Thujone	25,20	16,84	19,60	15,68	8,80	16,70	24,52	-	14,70
β -Thujone	-	-	8,00	-	-	-	6,50	16,44	-
Camphre	18,73	25,29	20,40	16,41	9,50	14,90	16,86	8,99	-
Acétate de cischrysanthényle	-	-	-	-	-	-	-	-	64,82
β -caryophyllène	-	6,01	-	-	8,19	-	-	5,85	-
Viridiflorol	10,56	-	-	11,69	-	10,10	6,30	10,93	-
Caryophyllène oxide	-	6,07	-	-	-	-	-	-	-
Manool	-	-	-	15,00	-	-	-	-	-
β -silinène	-	-	-	-	11,26	-	-	-	-

1.3.4.2 Travaux antérieurs sur les composés phénoliques des espèces étudiées

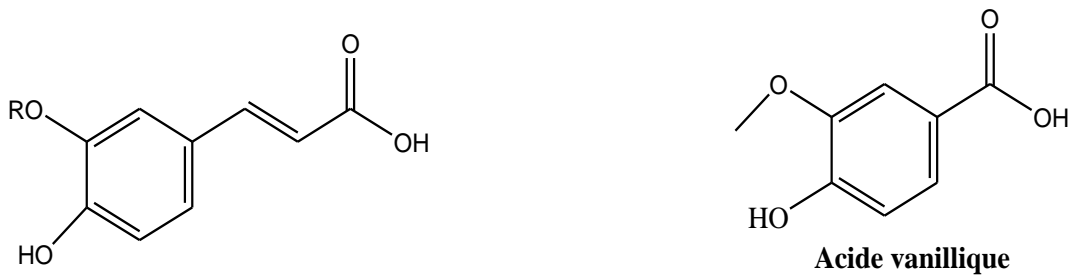
Peu d'études ont été réalisées sur les extraits de l'espèce *Salvia microphylla*. A notre connaissance deux esters phénoliques ont été isolés de l'espèce *Salvia microphylla*; eicosaheptanoic acid 2-(p-hydroxyphenyl) ethyl ester (**1**) et l'hexacosylferulate (**2**) [224].



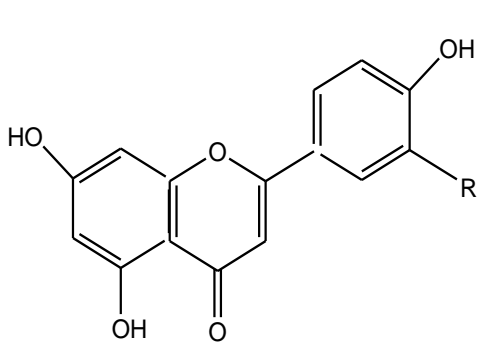
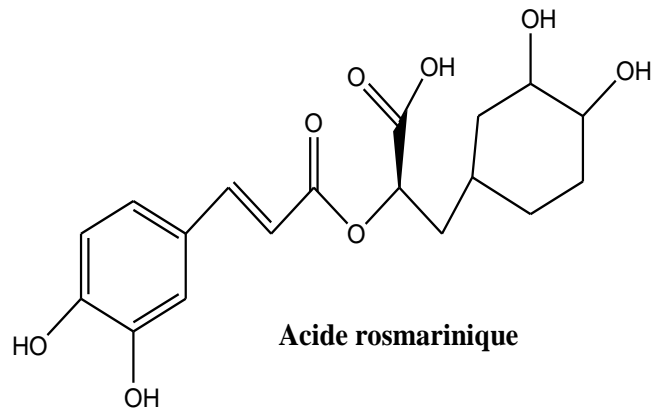
De nombreuses études ont été menées sur les extraits de l'espèce *Salvia officinalis*. Ces études ont montrées que cette plante contient une grande variété de composés biologiquement actifs, parmi lesquels on trouve les composés phénoliques qui sont les composants les plus abondants. Tels que les acides phénoliques, comme l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide férulique, l'acide saugerinique et l'acide rosmarinique, ainsi que les flavonoïdes, tels que la lutéoline, l'apigénine et la quercétine (figure 1.12) [225, 226]. Les principaux composés phénoliques extraits de l'espèce *Salvia officinalis* sont présentés dans le tableau 1.11 et leurs structures sont illustrées dans la figure 1.9.

Tableau 1.11: Les principaux composés phénoliques isolés de l'espèce *Salvia officinalis*

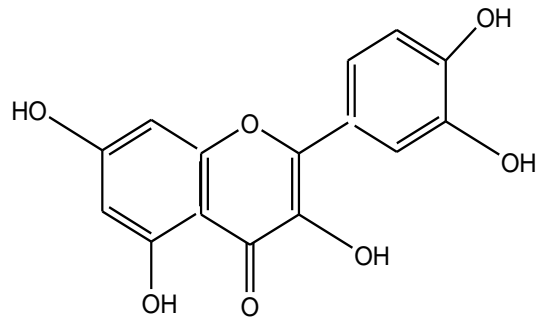
Classe	Composé isolé et N° de structure	Référence
Acides phénoliques	Acide 4-hydroxybenzoïque	[227]
	Acide vanillique	[228]
	Acide caféique	[227]
	Acide férulique	[228]
	Acide rosmarinique	[228]
	6-féruloyl- α -glucose	[229]
	Acide Salvianolique L	[230]
	Acide p coumarique 4- (2-Apiosyl) glucoside	[231]
Les flavonoïdes aglycones	5, 7,4'-Trihydroxyflavone (apigénine)	
	5,4'-Dihydroxy 7-méthoxyflavone (genkwanine)	[228]
	5-Hydroxy 7,4'-diméthoxyflavone	
	5, 7,3',4'-Tétrahydroxyflavone (Lutéoline)	[232]
	6-Hydroxyapigénine (scutellareine)	[228]
	5,4'-Dihydroxy 6,7-diméthoxyflavone (cirsimaritine)	
	5, 6, 7,4'-Tetraméthoxyflavone	[233]
	8-Hydroxyapigénine (isoscutellareine)	[228]
Les flavonoïdes glycosides	5, 7,3'-Trihydroxy-4'-méthoxyflavanone (hesperetine)	
	Apigénine-7-glucoside (cosmosiine)	[234]
	6-Hydroxyapigénine-6-méthoxy-7-glucoside (homoplantagenine)	[228]
	6-Hydroxylutéoline-7-glucoside	[231]



R=H Acide caféique
R=CH₃ Acide férulique



R= OH Lutéoline
R= H Apigénine



Quercétine

Figure 1.9 : Structure des principaux composés phénoliques isolés à partir de *Salvia officinalis* [235].

1.3.4.3 Travaux antérieurs sur les terpénoïdes des espèces étudiées

Les principaux terpénoïdes isolés de l'espèce *Salvia microphylla* sont les diterpénoïdes, des sesquiterpénoïdes et des triterpénoïdes.

Tableau 1.12 : Les principaux terpénoïdes isolés de l'espèce *Salvia microphylla*.

Classe	Composé isolé et N° de structure	Référence
sesquiterpénoïdes	β -eudesmol (3)	
	8 α -hydroxy- β -eudesmol (4)	[224]
	Acide 12-méthoxycarnosique (5)	
	Microphyllandioline (6)	[236]
diterpénoïdes	Acide 14 α -hydroxyisopimarique (7)	[237]
	14 α , 18-dihydroxyisopimaradiène (8)	[238]
	Acide 7 α -acétoxysandaracopimarique (9)	[237]
	Acide 7 α -hydroxysandaracopimarique (10)	
	7-oxosandaracopimarate de méthyle (11)	[238]
	7 α -hydroxysandaracopimarate de méthyle (12)	
	Sandaracopimara-8(14),15-dien-7 α , 18-diol (13)	[237]
triterpénoïdes	lupéol (14)	
	Acide oléanolique (15)	[224]
	3-acétate d'érythrodiol (16)	

Les structures de ces terpénoïdes sont schématisées et représentés dans la figure 1.10:

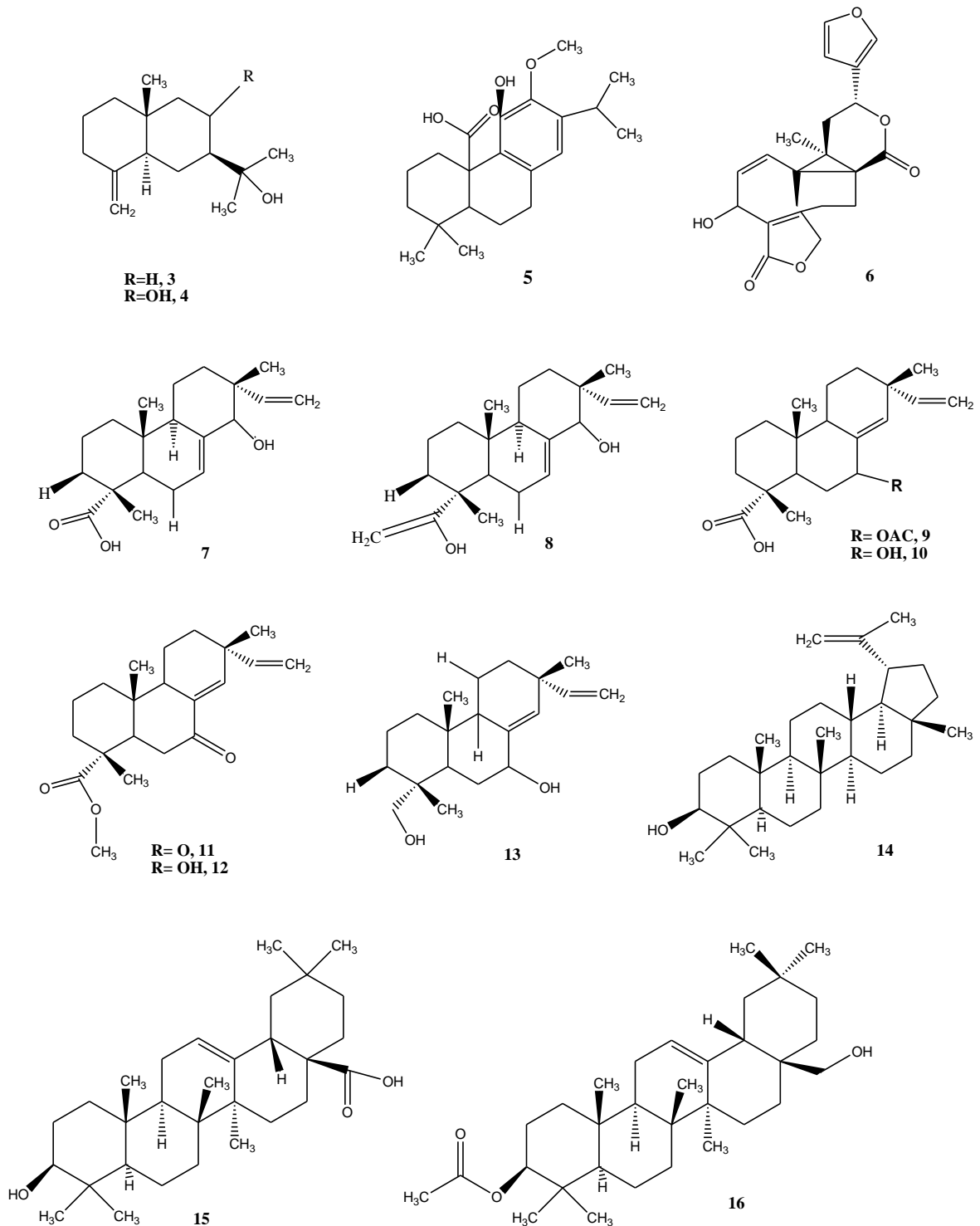


Figure 1.10 : Structure de quelques terpénoïdes isolés de l'espèce *Salvia microphylla*.

Salvia officinalis contient une grande variété de composés biologiquement actifs, parmi lesquels on trouve les monoterpènes, les diterpènes et les triterpènes. Les composants monoterpéniques les plus courants de cette plante, sont l' α -thujone, la β -thujone, le 1,8-cinéole et le camphre [239-241]. Les diterpènes prédominants comprennent l'acide carnosique, le carnosol, le rosmadial et le manool [239-241]. De plus, on trouve des

triterpènes tels que l'acide oléanolique et l'acide ursolique dans la plante [239-241]. Ainsi que, les sesquiterpènes α -humulène et viridiflorol [241-243] sont présents dans les extraits de cette espèce (figure 1.10) [241-243].

Les structures de quelques Terpénoïdes isolé de l'espèce *Salvia officinalis* sont schématisées et représentés dans la figure ci-dessous :

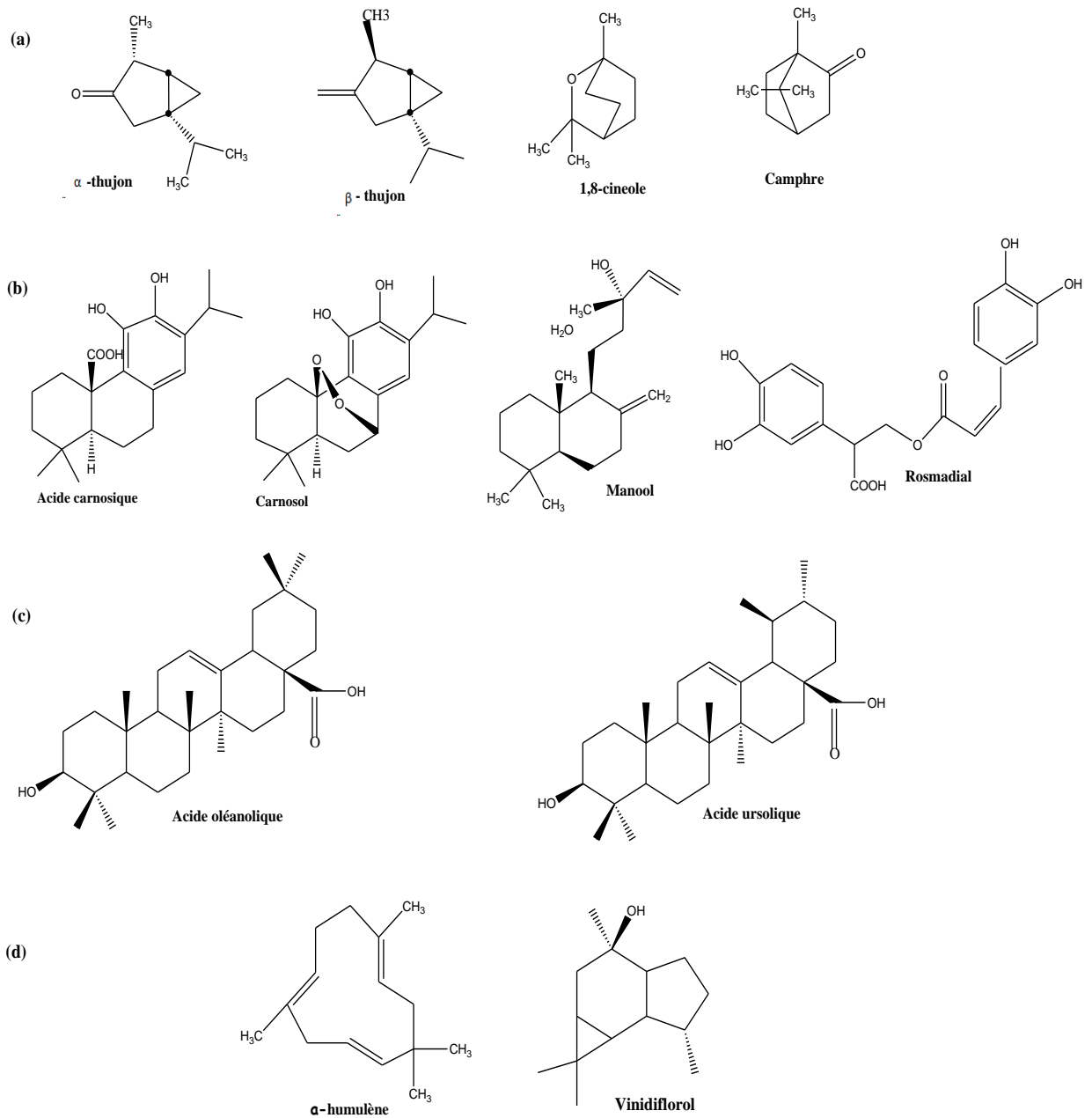


Figure 1.11 : Structure des principaux terpénoïdes isolés à partir de *Salvia officinalis*; (a) les monoterpènes; (b) les diterpènes; (c) les triterpènes; et (d) sesquiterpènes [235].

1.4 Etudes antérieures sur les activités biologiques

1.4.1 Généralité sur les activités biologiques

1.4.1.1 Activité antioxydante

L'intérêt croissant pour les antioxydants naturels, en raison de leurs bienfaits thérapeutiques, est alimenté par la demande croissante de solutions alternatives aux antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) [1]. Ces antioxydants synthétiques suscitent des inquiétudes en raison de leurs effets indésirables sur la santé, notamment des dommages au foie et des soupçons de lien avec certains cancers [2].

Les huiles essentielles et les extraits naturels se sont révélés être des sources prometteuses d'antioxydants naturels. Ils agissent en inhibant la peroxydation des lipides et en stoppant le mécanisme d'auto-oxydation [5, 6, 244, 245]. Ce développement de la recherche sur les plantes médicinales en vue d'obtenir des phytomédicaments revêt une grande importance pour divers secteurs, notamment la thérapie, l'industrie agroalimentaire, la cosmétique et la parfumerie.

De nombreuses méthodes ont été développées pour évaluer *in vitro* de l'activité antioxydante des aliments, des extraits ou des composés individuels. La plupart de ces méthodes consistent à mélanger des substances oxydantes, comme les radicaux libres, avec un échantillon contenant des antioxydants qui ont la capacité d'entraver la formation de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir de deux manières principales : soit en transférant un atome d'hydrogène (cinétique rapide de certains acides et dérivés phénoliques), soit en transférant un électron (cinétique lente des dérivés glycosylés et des anthocyanes) [246,247]. Les méthodes qui se fondent sur le transfert d'atome d'hydrogène évaluent la capacité globale d'un antioxydant à inhiber les radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène, tandis que les méthodes basées sur le transfert d'électron mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira divers composés, y compris les métaux, les carbonyles et les radicaux.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) [248] ainsi que les composés phénoliques (Figure 1.12).

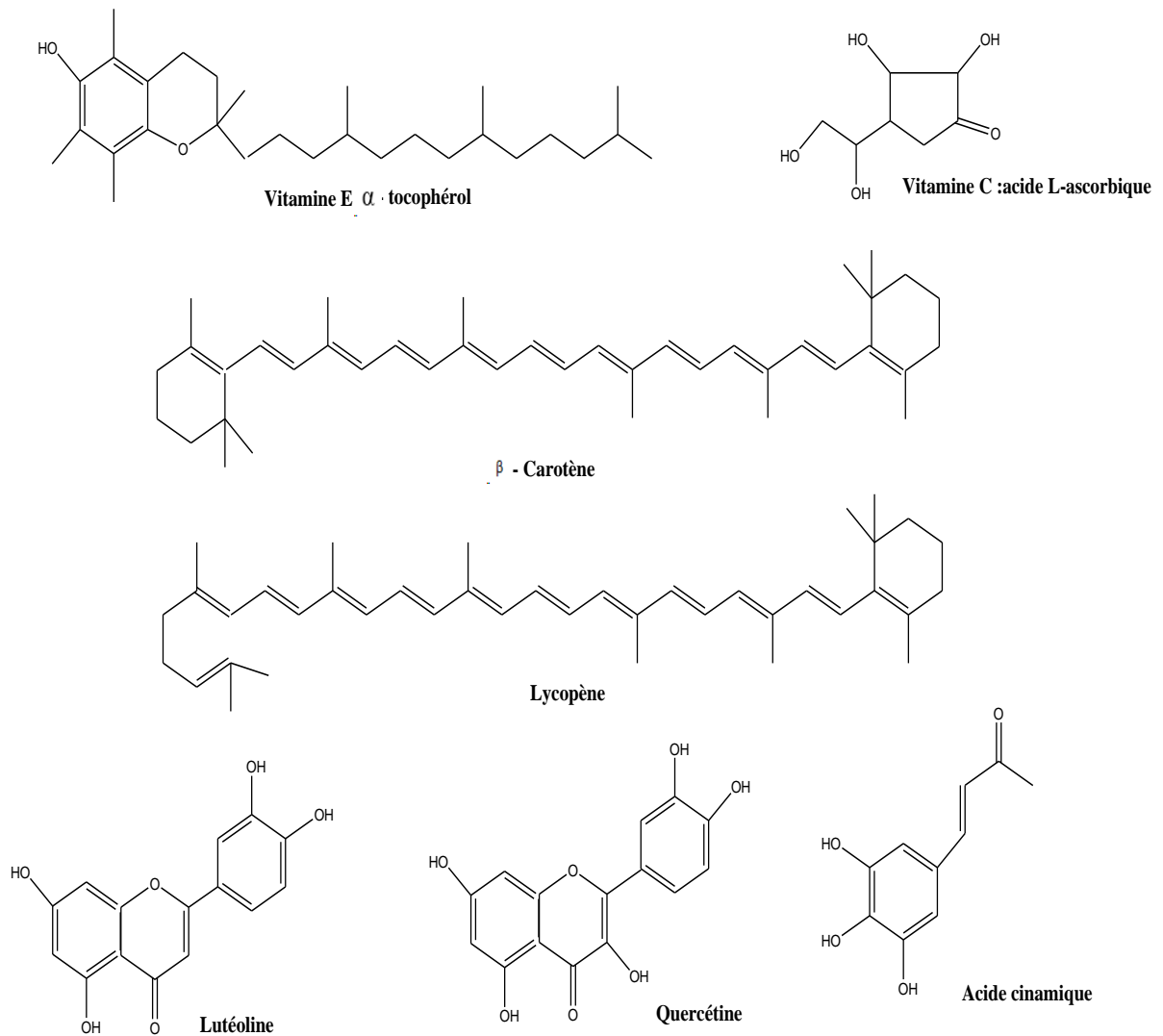


Figure 1.12 : Principaux composés naturels possédant des propriétés antioxydantes.

En raison de la complexité des processus d'oxydation et de la variété des antioxydants, qui peuvent avoir des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'existe pas de méthode universelle permettant de mesurer de manière précise l'activité antioxydante. Souvent, il est nécessaire de combiner les réponses de différents tests complémentaires pour obtenir une indication de la capacité antioxydante de l'échantillon à tester [249-251].

Diverses approches sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante, à savoir : le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du cation radical l'ABTS⁺, la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC, le pouvoir réducteur (FRAP) et test de blanchissement du β-carotène et la méthode de Phénanthroline.

1.4.1.2 Activité anticholinestérase (anti-Alzheimer)

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui entraîne une perte progressive de la mémoire et d'autres fonctions cognitives. Cette maladie est associée à un déficit d'acétylcholine, un neurotransmetteur important pour la mémoire. L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme qui accélère la décomposition rapide de l'acétylcholine en choline et acide acétique, ce qui entraîne son désactivation. Les substances anticholinestérases inhibent l'enzyme cholinestérase, ce qui entraîne une augmentation de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau (réduction de la dégradation de l'acétylcholine). Cette augmentation de l'acétylcholine peut donc aider à soulager les symptômes de la maladie d'Alzheimer. L'activité anticholinestérase est déterminée par la méthode d'Ellman (figure 1.13) [252].

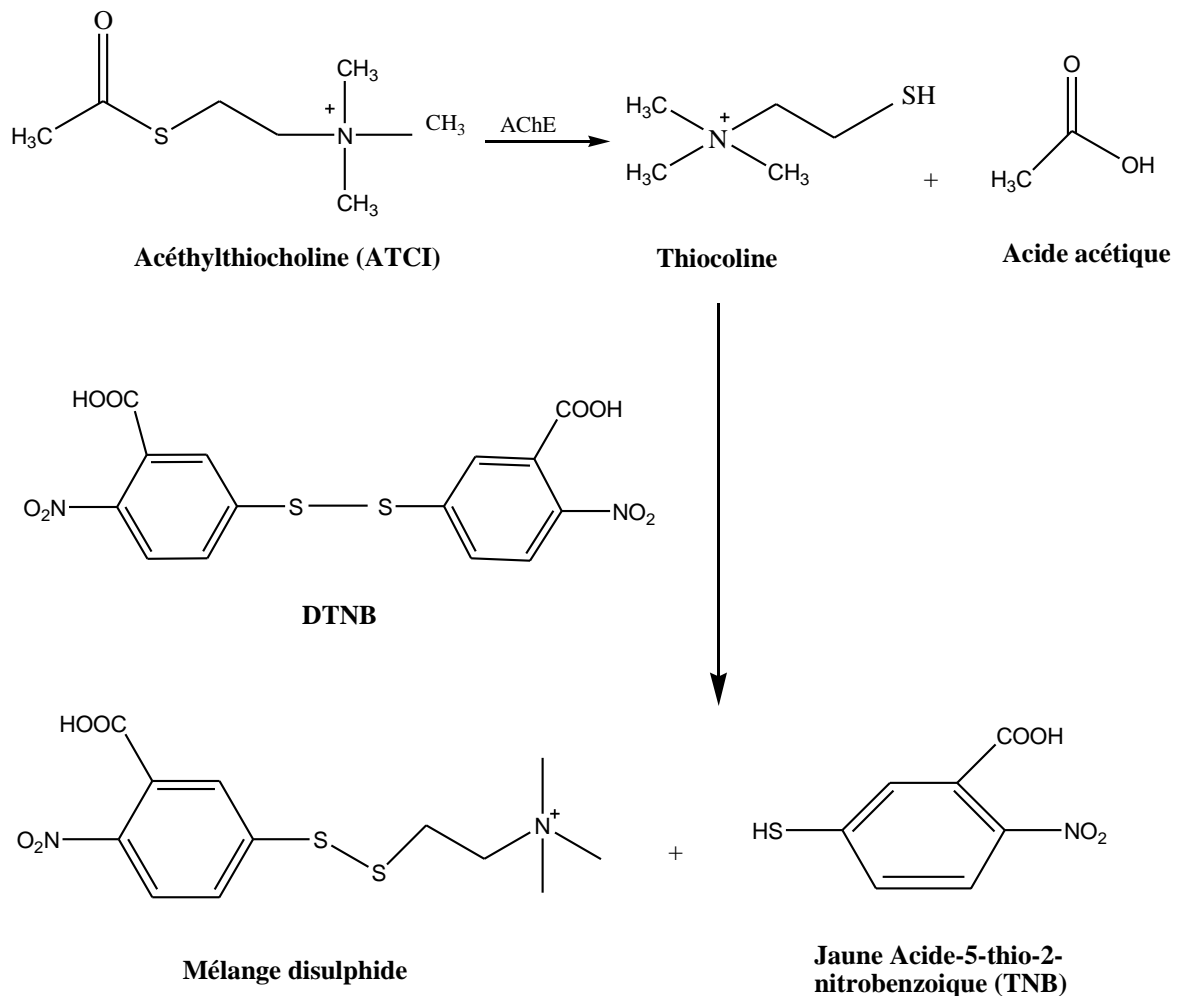


Figure 1.13 : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman.

1.4.1.3 Activité antidiabétique

Le diabète sucré est un trouble endocrinien chronique qui affecte le métabolisme des glucides, des protéines, des lipides, des électrolytes et de l'eau. Il comprend un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie, dans lesquelles les niveaux de sucre dans le sang sont élevés soit parce que le pancréas ne produit pas assez d'insuline, soit parce que les cellules ne répondent pas à l'insuline produite [253]. Par conséquent, une approche thérapeutique pour traiter le diabète consiste à diminuer l'hyperglycémie postprandiale [254]. Cela peut être réalisé en inhibant les enzymes de l'hydrolyse des glucides, telles que l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase [255]. L'alpha-glucosidase et l'alpha-amylase sont des enzymes importantes impliquées dans la digestion des glucides et facilitent l'absorption intestinale. L'alpha-amylase est impliquée dans la dégradation des glucides à longue chaîne (amidon) et l'alpha glucosidase décompose les disaccharides en glucose.

Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase sont utilisés comme médicaments antidiabétiques oraux pour traiter le diabète sucré de type 2. Ils agissent en empêchant la digestion des glucides tels que l'amidon. Les glucides sont normalement convertis en sucres simples qui peuvent être absorbés par l'intestin [256]. Les inhibiteurs de l'alpha glucosidase agissent comme des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme alpha glucosidase nécessaire à la digestion des glucides. Les alpha-glucosidases intestinales hydrolysent les glucides complexes en glucose et d'autres monosaccharides dans l'intestin grêle. L'inhibition de ces systèmes enzymatiques contribue à réduire la vitesse de digestion des glucides [257]. Moins de quantités de glucose sont absorbées parce que les glucides ne sont pas décomposés en molécules de glucose. Chez les diabétiques, l'effet à court terme de ces thérapies médicamenteuses est de diminuer les niveaux élevés de glucose dans le sang. Les inhibiteurs enzymatiques synthétiques actuellement utilisés provoquent des effets secondaires gastro-intestinaux tels que diarrhée, flatulences, ballonnements abdominaux, etc. [258]. Par conséquent, les inhibiteurs naturels de l'alpha-amylase et de l'alpha-glucosidase issus de plantes alimentaires peuvent être utilisés comme une thérapie efficace pour traiter l'hyperglycémie postprandiale avec des effets secondaires minimales.

1.4.1.4 Activité antimicrobienne

Actuellement, la découverte de nouveaux antibiotiques est un objectif exclusivement important. Les produits naturels restent l'une des principales sources de nouvelles molécules médicamenteuses aujourd'hui. Ils sont dérivés de bactéries procaryotes, de micro-organismes eucaryotes, de plantes et de divers organismes animaux. Les produits microbiens et végétaux occupent la majeure partie des composés antimicrobiens découverts jusqu'à présent [259]. Les plantes et d'autres sources naturelles peuvent fournir une vaste gamme de composés complexes et structuralement diversifiés. Récemment, de nombreux chercheurs se sont concentrés sur l'investigation d'extraits de plantes et de micro-organismes, d'huiles essentielles, de métabolites secondaires purs et de nouvelles molécules synthétisées en tant qu'agents antimicrobiens potentiels [260-262]. Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large, car elles inhibent la croissance de différents types de micro-organismes, dont les bactéries, les moisissures et les levures. Leur activité est due à leur composition chimique, notamment à la présence de composés volatils majeurs.

Le mode d'action des huiles essentielles est principalement lié à la structure de la paroi bactérienne et à la perméabilité de leur membrane. L'huile essentielle exerce son activité antimicrobienne en perturbant la bicouche lipidique des bactéries, grâce à sa nature hydrophobe. Cela provoque une augmentation de la perméabilité membranaire, entraînant une fuite des constituants cellulaires. De plus, l'acidification de l'intérieur de la cellule bactérienne bloque la production d'énergie et la synthèse des structures cellulaires, tandis que la destruction du matériel génétique conduit finalement à la mort de la bactérie [263]. En revanche, les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes que celles à Gram positif en raison des différences structurelles de leur membrane externe [264].

Diverses méthodes de laboratoire peuvent être utilisées pour évaluer ou cribler l'activité antimicrobienne *in vitro* d'un extrait, d'un composé pur ou huile essentielle. Les méthodes les plus connues et de base sont la méthode de diffusion sur disque pour déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, et les méthodes de dilution en milieu liquide ou en gélose. Qui sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de CMI (concentration minimale inhibitrice), car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans l'agar (dilution en agar) ou dans le milieu de culture liquide (macrodilution ou microdilution).

La détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) ou concentration minimale fongicide (CMF), également connue sous le nom de concentration minimale létale

(CML), est la méthode la plus courante pour estimer l'activité bactéricide ou fongicide. La CMB est définie comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien nécessaire pour tuer 99,9 % de l'inoculum final après 24h d'incubation dans des conditions normalisées décrites dans le document M26-A [265].

1.4.2 Travaux antérieurs sur les activités biologiques des espèces étudiées

De nombreuses études ont été réalisées sur les espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*, explorant non seulement la composition chimique de leurs huiles essentielles et extraits, mais aussi leurs activités biologiques. Notre étude se concentre uniquement sur les recherches les plus récentes.

➤ *Salvia microphylla*

Lima et ses collaborateurs [202] ont évalué les propriétés bactéricides et antioxydantes de l'huile essentielle extraite des feuilles fraîches de *Salvia microphylla*. Ils ont utilisé le test de diffusion en gélose pour mesurer l'activité bactéricide, et les tests au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) et au β -carotène/ acide linoléique pour évaluer l'activité antioxydante. Ils ont démontré que l'huile essentielle présente une bonne activité bactéricide, et que l'activité est très significative selon le test au β -carotène/acide linoléique, avec une IC_{50} de 770 $\mu\text{g/mL}$.

Pour vérifier la possibilité d'utiliser des extraits de *Salvia microphylla* comme ingrédient fonctionnel pour traiter ou diminuer les maladies de la peau, Choi et al. [266] ont étudié les propriétés antioxydantes de l'extrait éthanolique à l'aide des méthodes DPPH et ABTS. Ils ont également examiné l'activité anti-inflammatoire de cet extrait en analysant l'inhibition de la production d'oxyde nitrique (NO) et l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) dans des macrophages RAW 264,7 activés par le lipopolysaccharide (LPS). Cette étude a démontré que l'extrait éthanolique possède une excellente activité antioxydante. De plus, les résultats ont révélé que cet extrait non seulement neutralise le NO, mais réduit également l'inflammation en inhibant l'expression de l'iNOS. Par conséquent, l'extrait éthanolique de *Salvia microphylla* pourrait être utilisé efficacement dans les cosmétiques comme conservateur naturel doté d'activités antioxydante et anti-inflammatoire, ainsi que comme matière première pour soulager les irritations cutanées.

Par ailleurs, Jo et *al.* [267] ont confirmé que l'extrait éthanolique de *Salvia microphylla* présente une activité antioxydante remarquable, stimule la synthèse de pro-collagène et inhibe la production de métalloprotéinase matricielle (MMP-1), soulignant ainsi son potentiel en tant qu'ingrédient fonctionnel pour les cosmétiques.

D'autre part, les extraits méthanoliques de *Salvia microphylla* se révèlent être de puissants inhibiteurs de la génotoxicité provoquée par le méthyl parathion chez les souris albinos suisses [268].

En outre, l'extrait chloroformique obtenu à partir des parties aériennes de *Salvia microphylla* récoltée au Mexique a montré une activité insectistatique et insecticide efficace contre la chenille légionnaire d'automne. Ces résultats suggèrent que cet extrait pourrait être utilisé comme moyen de lutte efficace contre ce ravageur [269].

L'espèce *Salvia microphylla* récoltée en Tunisie a fait l'objet de plusieurs études sur ses activités biologiques [205]. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de cette plante ont montré une activité antimicrobienne intéressante contre les souches étudiées. En revanche, l'extrait obtenu par infusion n'a pas démontré de pouvoir antibactérien aux concentrations testées. Toutefois, cet extrait a révélé des propriétés antioxydantes nettement supérieures à celles de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique.

Les études réalisées sur des extraits éthanoliques de *Salvia officinalis* et *Salvia microphylla* ont montré une activité neuroprotectrice significative dans un modèle animal de maladie d'Alzheimer induite par la scopolamine. Ces extraits ont atténué la déposition de bêta-amyloïde, inhibé l'activité de l'acétylcholinestérase et réduit les marqueurs de stress oxydatif. Ces résultats suggèrent que ces espèces de *Salvia* cultivées en Jordanie et en Égypte pourraient offrir de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer [270].

Une étude supplémentaire a révélé que l'extrait éthanolique de *Salvia microphylla* provenant du Mexique pourrait jouer un rôle dans la prévention de l'obésité et du stress oxydatif. Cet extrait a montré des propriétés anti-lipase en inhibant la lipase pancréatique porcine (PPL), ainsi que des propriétés antioxydantes, neutralisant les radicaux libres nocifs. Ces résultats suggèrent que *Salvia microphylla* pourrait être une plante médicinale prometteuse pour la gestion du poids et la protection des cellules [271].

➤ *Salvia officinalis*

De nombreuses études rapportées dans la littérature ont examiné l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits de *Salvia officinalis*. L'extrait éthanolique de cette espèce, récoltée en Égypte [272], a démontré une bonne activité antioxydante lors du test DPPH, avec une IC₅₀ de 23,21 ± 1,17 µg/mL, ainsi que des valeurs de 1864,71 et 1793,80 µM équivalents Trolox/mg d'extrait pour le test ABTS.

Par ailleurs, l'huile essentielle extraite des feuilles de sauge récoltées au Vietnam [273] et au Maroc [274] a montré une activité antioxydante modérée dans le test au DPPH, avec des valeurs IC₅₀ de 457,597 µg/mL et 309,42 mg/mL, respectivement.

Les extraits de *Salvia officinalis*, récoltée en Roumanie et obtenus par méthanol, éthanol, éther diéthylique et hexane, ont révélé une activité antioxydante significative, l'extrait méthanolique affichant la plus grande capacité antioxydante [275].

La littérature a également rapporté les activités antioxydantes et antimicrobiennes des huiles essentielles de *Salvia officinalis* récoltées dans différentes régions de l'Algérie. Toutes les huiles essentielles ont montré une activité antioxydante et antimicrobienne significative [215, 216, 221-223].

Zatout et ses collaborateurs ont étudié les propriétés antimicrobiennes et antibiofilm de l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Salvia officinalis*, récoltée dans la région des Aurès en Algérie [220]. Cette huile essentielle a démontré des activités antibactériennes et antibiofilm remarquables. En conséquence, elle pourrait constituer une alternative efficace aux antibiotiques traditionnels contre les formes planctoniques et biofilmées des isolats de CoNS (staphylocoques à coagulase négative), grâce à ses capacités antibactériennes et de formation d'antibiofilm élevées.

En revanche, l'huile essentielle obtenue à partir des parties aérienne de la même espèce récoltées à Laghouat [218] a révélé des propriétés antioxydantes modérées par rapport à l'acide ascorbique dans le test DPPH, ainsi que des propriétés antimicrobiennes notables contre les souches étudiées. De plus, cette huile a montré une inhibition de la croissance contre diverses lignées cellulaires de cancers du sein, du col de l'utérus, de la leucémie et de la prostate, suggérant une utilisation potentielle en tant que nutraceutique pour la prévention du cancer.

L'espèce *Salvia officinalis* récoltée à Mostaganem a été l'objet de plusieurs études sur ses activités biologiques [276]. L'huile essentielle de cette plante a montré une activité antimicrobienne notable contre *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*, bien

que ses propriétés antioxydantes aient été relativement faibles. Cependant, l'extrait méthanolique de la même plante a présenté des activités antioxydantes et antibactériennes intéressantes.

Les extraits éthanoliques de *Salvia officinalis* récoltés dans deux régions de l'Algérie, à savoir Mascara [277] et Tiaret [278], ont montré des propriétés antibactériennes, antioxydantes et anti-inflammatoires considérables.

Par ailleurs, l'huile essentielle de *Salvia officinalis* récoltée en Tunisie a révélé une puissante capacité de piégeage des radicaux libres, ainsi que des activités anti-inflammatoires, anti-Alzheimer et anti-goutte modérées [16].

Un nombre croissant d'études scientifiques soutiennent l'utilisation de *Salvia officinalis* comme moyen de prévention et de traitement de la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives [279-285].

Une étude chimique portant sur l'espèce *Salvia officinalis* récoltée en Roumanie a révélé que l'extrait éthanolique de cette plante possède de puissantes propriétés inhibitrices sur l'acétylcholinestérase (AChE), la butyrylcholinestérase (BChE) et l'alpha-glucosidase. De plus, cet extrait présente une activité antimicrobienne notable [286].

L'extrait de décoction d'hydro-méthanol, ainsi que les fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol obtenues à partir de *Salvia officinalis* récolté dans la région de Tlemcen, ont révélé des activités inhibitrices sur l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase. En outre, ces extraits ont montré une faible activité hémolytique [287].

Une étude menée par des chercheurs libanais sur la *Salvia officinalis* récoltée au Liban a révélé que l'huile essentielle de cette plante présente des propriétés antidiabétiques et anti-inflammatoires [211].

➤ Conclusion

Cette étude bibliographique nous a permis de conclure que l'huile essentielle de *Salvia microphylla* n'a pas été étudiée pour ses activités anticholinestérase. De plus, les activités antidiabétiques de cette espèce n'ont fait l'objet d'aucune investigation scientifique à ce jour.

La composition chimique des huiles essentielles des tiges pour les deux plantes étudiées, *Salvia microphylla* et *salvia officinalis*, ainsi que les activités biologiques n'ont pas également été rapporté dans la littérature.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel

2.1.1 Matériel végétal

Pendant la période de floraison en juillet 2018, les parties aériennes fraîches (tiges, feuilles et fleurs) de deux plantes *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ont été récoltées à Blida (située au sud-ouest d'Alger, Algérie, latitude : 36°28'12''N; longitude : 2°49'39''E; altitude : 252 m ; température moyenne : 17,9 °C ; précipitations moyennes : 791 mm). Ces deux espèces ont été identifiées au Jardin Botanique du Hamma, à Alger. Les échantillons récoltés ont été séchés à l'air, à l'ombre et à température ambiante pendant 10 jours. Par la suite, ils ont été découpés en petits morceaux et stockés dans des conditions appropriées jusqu'à leur utilisation.

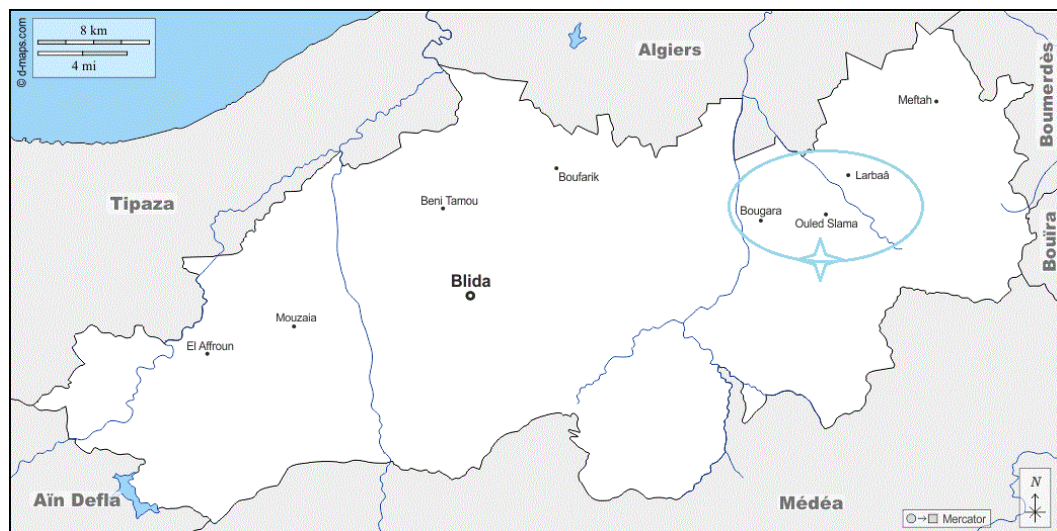


Figure 2.1 : Localisation géographique du site de récolte des deux espèces étudiées.

2.1.2 Produits chimiques et micro-organismes utilisés

Toutes les mesures d'activité antioxydante, enzymatique et antimicrobienne ont été effectuées sur un lecteur de microplaques à 96 puits, Perkin Elmer Multimode Plate Reader En Spire au Centre National de Recherche en Biotechnologie, Constantine.

➤ Solvants et réactifs

Concernant les tests anti radicalaires, les réactifs utilisés dans la présente étude sont : Le réactif de Folin Ciocalteu (FCR), le 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyl (DPPH), l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), l' α -tocophérol, l'acide ascorbique, l'acide tannique, l'acide gallique, la quercétine, l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS⁺), la néocuproïne, l'acide trichloroacétique (TCA), le ferricyanure de potassium (K₃Fe (CN)₆), 1,10-phénanthroline, l'acide linoléique, le β -carotène, le monopalmitate de polyoxyéthylène sorbitane (Tween 40) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) ont tous été achetés auprès de Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Allemagne). Le carbonate de sodium (Na₂CO₃), l'acétate de potassium (CH₃COOK), le chlorure d'aluminium (Al Cl₃), le sulfate de sodium (Na₂SO₄), le chlorure de fer (III) (FeCl₃), le chlorure de cuivre (II) (CuCl₂) et l'acétate d'ammonium (CH₃COONH₄) ont été acquis auprès de Biochem Chemopharma (France). Et pour les tests enzymatiques : l'iodure d'acétylthiocholine, l'iodure de S-Butyrylthiocholine, l'acide 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB), l'acétylcholinestérase d'anguille électrique (*Electrophorus electricus*, AChE, Type-VI-S, EC 3.1.1.7, 827,84 U/mg, Sigma), la butyrylcholinestérase de sérum de cheval (BChE, EC 3.1.1.8, 7,8 U/mg, Sigma), la galantamine, l' α -Glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Type I, ≥ 10 unités/mg de protéine), le 4-Nitrophényl α -D-glucopyranoside ($\geq 99\%$) et l'acarbose ($\geq 95\%$) ont été obtenus chez Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Stern-Heim, Allemagne). Tous les autres produits chimiques et solvants utilisés sont de grade analytique.

➤ micro-organismes

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été testée contre les micro-organismes suivants : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25843, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* ATCC 14028, *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 23308, *Enterobacter cloacae* ATCC13047, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 14110, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 49594, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 14975, *Candida albicans* ATCC 1023 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Les souches de référence (ATCC, American type culture collection) ont été obtenues auprès de l'Institut Pasteur (Alger), en utilisant les méthodes conventionnelles du (NCCLS) [288] et du (CLSI) [289].

2.2 Étude de l'influence de quelques paramètres liés à la matière végétale sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles des espèces étudiées

La composition chimique et le rendement des huiles essentielles dépendent d'une série de facteurs intrinsèques et extrinsèques auxquels la plante est soumise tout au long de son cycle de développement. Parmi ces facteurs, on peut citer la période de récolte, la partie de plante utilisée, le lieu de récolte, le séchage, la méthode d'extraction [290-292]. Chaque étape de la production des huiles essentielles est importante, ainsi la variation de la teneur des composés ou l'apparition de nouvelles molécules peuvent également être influencées par toutes les étapes de traitement, allant de la collecte de la matière végétale au stockage des huiles essentielles [293]. Cette section de l'étude a pour objectif d'analyser l'évolution de la composition chimique des huiles essentielles tout au long du cycle végétatif. Les deux espèces, *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*, ont été récoltées mensuellement de Janvier à Novembre. D'autre part, nous nous sommes intéressés à évaluer l'influence de trois procédés d'extractions distincts (l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'induction électromagnétique) sur la qualité et la quantité des huiles essentielles de l'espèce *Salvia microphylla*. Cette étude a permis de déterminer la technique optimale d'extraction et d'identifier les périodes optimales de récoltes pour chaque espèce étudiée en fonction des propriétés recherchées dans les huiles essentielles, en tenant compte de son impact sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles obtenues.

2.2.1 Influence de la technique d'extraction sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles

Le matériel végétal utilisé correspond à la partie aérienne composée des tiges, des feuilles et des fleurs de l'espèce *Salvia microphylla*. La récolte s'est effectuée en juillet 2018 dans la région de Blida. les parties aériennes recueillies sont séchées à l'air libre, à l'ombre et à température ambiante pendant 10 jours.

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par trois méthodes d'extraction, telles que l'extraction par hydrodistillation, l'extraction par entraînement à la vapeur et l'extraction par induction électromagnétique.

2.2.1.1 Extraction des huiles essentielles

2.2.1.1.1 Extraction par hydrodistillation

100g des parties aériennes sèches de *Salvia microphylla* ont été soumis à une hydrodistillation conventionnelle à l'aide d'un appareil de type Clevenger. La matière végétale (100 g) a été placée dans un ballon rond de 2 L avec 2/3 de sa capacité d'eau distillée, puis extraite pendant 3 heures après ébullition. Les différentes huiles essentielles obtenues ont été séparées de l'eau et stockées jusqu'à l'analyse dans des flacons en verre fumés et stériles à une température de 4 à 5 °C après avoir éliminé les traces d'eau en utilisant du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄).

2.2.1.1.2 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction, Les parties aériennes de *Salvia microphylla* sont placées dans une ampoule à décanter spécialement conçue pour l'extraction par entraînement à la vapeur. Cette ampoule est équipée d'un adaptateur permettant le passage de la vapeur d'eau issue de l'ébullition de l'eau présente dans le ballon de 2 litres. La vapeur d'eau passe à travers la matière végétale, emportant avec elle les composés volatiles. Cette vapeur est ensuite condensée dans le réfrigérant et le mélange d'huile essentielle et d'hydrolat est récupéré dans une ampoule à décanter. En raison de la différence de densité, on observe deux phases : une phase aqueuse (eau aromatique) et une phase moins dense que l'eau (huile essentielle). A la fin l'huile essentielle est récupérée par décantation, puis séchée avec du sulfate de sodium anhydre et conservée dans des flacons en verre fumés et stériles à 4°C.

2.2.1.1.3 Extraction par induction électromagnétique

Les parties aériennes de *Salvia microphylla* sont soumis à une extraction assistée par chauffage par induction électromagnétique. Brièvement, dans une cocotte-minute de cinq litres, 100g de la matière végétale ont été immergées dans l'eau. Le mélange est ensuite porté à l'ébullition pendant 45 min en utilisant une plaque chauffante de 1800 W, où le transfert d'énergie vers l'objet à chauffer se fait par induction électromagnétique (IEM). Ensuite, la vapeur d'eau chargée en composés volatils se recondense en passant dans le réfrigérant. A la fin on a observé deux phases, une phase aqueuse (eau aromatique) et une phase organique moins dense que l'eau (huile essentielle). L'huile essentielle a été récupérée par décantation, séchée avec du sulfate de sodium anhydre et conservée à 4°C pour une analyse ultérieure.

2.2.1.2 Calcul du rendement

Le rendement de l'huile essentielle est exprimé comme le rapport entre la quantité d'huile essentielle obtenue et la quantité de matière végétale traitée. Cette mesure est généralement déterminée en utilisant la formule suivante :

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

R (%) : Le rendement des huiles essentielles en pourcentage.

M_{HE} : La masse d'huile essentielle récupérée en gramme (g).

M_{MV} : La masse de matière végétale sèche utilisée pour l'extraction en gramme (g).

2.2.1.3 Analyse des huiles essentielles

L'huile essentielle a été dissoute dans de l'hexane à une concentration de 2 mg/ml. Les différentes huiles essentielles de deux plantes *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) dans le but d'identifier la composition chimique et de déterminer respectivement le pourcentage moyen des composés. Ces analyses ont été effectuées au laboratoire de Chimie Générale et Organique et au laboratoire de Chimie Analytique à la Faculté de Gembloux Agro Bio Tech, Université de Liège, Belgique.

➤ Analyse GC

Les analyses des huiles essentielles ont été réalisées sur un système Agilent HP GC 6890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La séparation a été effectuée sur une colonne capillaire HP-5 revêtue de 5 % de phényl-méthylsiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d'épaisseur de film, Agilent Technologies, Hewlett-Packard, CA, USA). Le programme de température était le suivant : 40 °C pendant 1 minute, puis augmenté progressivement lors de la première rampe à 200 °C à 6 °C/min, suivie d'une seconde rampe à 280 °C à 30 °C/min, et finalement rester à 280 °C pendant 2 minutes. L'injection a été réalisée en mode splitless à 280 °C avec un rapport de 1/90 ; le volume injecté était de 1 µL. La température du détecteur a été maintenue à 300 °C, le gaz porteur était de l'hélium à 1 ml/min.

➤ Analyse par GC/MS

L'analyse a été effectuée à l'aide d'un GC-MS Agilent 5973 couplé à un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 équipé d'un injecteur split-splitless à 250 °C (mode sans diviosin). Une colonne capillaire HP-5MS Agilent (30 m × 0,25 mm, df = 0,25 µm) a été utilisée. Les conditions analytiques étaient les suivantes : programme de température : de 40 à 250 °C à 6 °C/min. Le gaz porteur était de l'hélium à 1 ml/min. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode EI à 70 eV, dans la plage de masse de m/z : 35 à 500 amu. Les températures de la source et du quadrupôle ont été fixées à 230 °C et 150 °C, respectivement. L'identification des composants a été réalisée sur la base des indices de rétention linéaire chromatographique (LRI) et en comparant les spectres enregistrés avec une bibliothèque de données calculées (Wiley 275.L). Pour les hydrocarbures sesquiterpéniques, des confirmations supplémentaires ont été obtenues en comparant les spectres de masse avec des données de la littérature [84 ,294]. Les calculs des indices de rétention linéaire (LRI) ont été effectués selon l'équation de Van den Dool et Kratz [295], une série homologue d'n-alcane (C7-C30) a été injectée, dans les mêmes conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse des huiles essentielles, afin de déterminer les indices de rétention de tous les composés volatils détectés. Les principaux composants ont été confirmés par comparaison de leurs données de rétention avec des références pures co-injectées (commerciale).

2.2.2 Influence de la période de récolte sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles

Les parties aériennes de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ont été collectés entre la période de janvier à novembre (2018) dans la région de Blida. Ensuite, les échantillons ont été séchés à l'ombre, à l'air libre, dans un lieu sec jusqu'à la stabilisation de son poids (10 jours).

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger en suivant la méthodologie et les conditions déjà mentionnés dans le paragraphe (§2.2.1.1.1).

L'analyse chromatographique des huiles essentielles, effectuée en fonction des dates de récolte, a été réalisée à l'aide de deux méthodes : la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), en appliquant les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans la section (§2.2.1.3).

2.3 Étude chimique des huiles essentielles et des extraits des deux espèces étudiées

Dans cette partie, nous nous concentrons sur l'extraction et l'analyse des huiles essentielles ainsi que des métabolites secondaires des deux espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*. L'extraction des huiles essentielles est réalisée par hydrodistillation, tandis que celle des métabolites secondaires est effectuée par deux méthodes : la macération et l'extraction au Soxhlet.

Les huiles essentielles obtenues sont ensuite analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) afin d'identifier les composés volatils. En outre, les polyphénols et flavonoïdes totaux sont quantifiés par des méthodes colorimétriques, suivies d'une identification par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

2.3.1 Extraction et analyse des huiles essentielles

Un échantillon de chaque partie séchée à l'air (parties aériennes, feuilles, tiges) de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a été soumis à une hydrodistillation conventionnelle à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Le procédé est comme déjà décrit dans le paragraphe (§2.2.1.1.1).

Le rendement de l'huile essentielle est exprimé comme le rapport entre la quantité d'huile essentielle obtenue et la quantité de matière végétale traitée.

Enfin, l'analyse des huiles essentielles extraites des parties aériennes, des feuilles et des tiges a été réalisée par GC et GC-MS, en appliquant les mêmes conditions expérimentales que celles mentionnées dans le paragraphe précédent (§2.2.1.3).

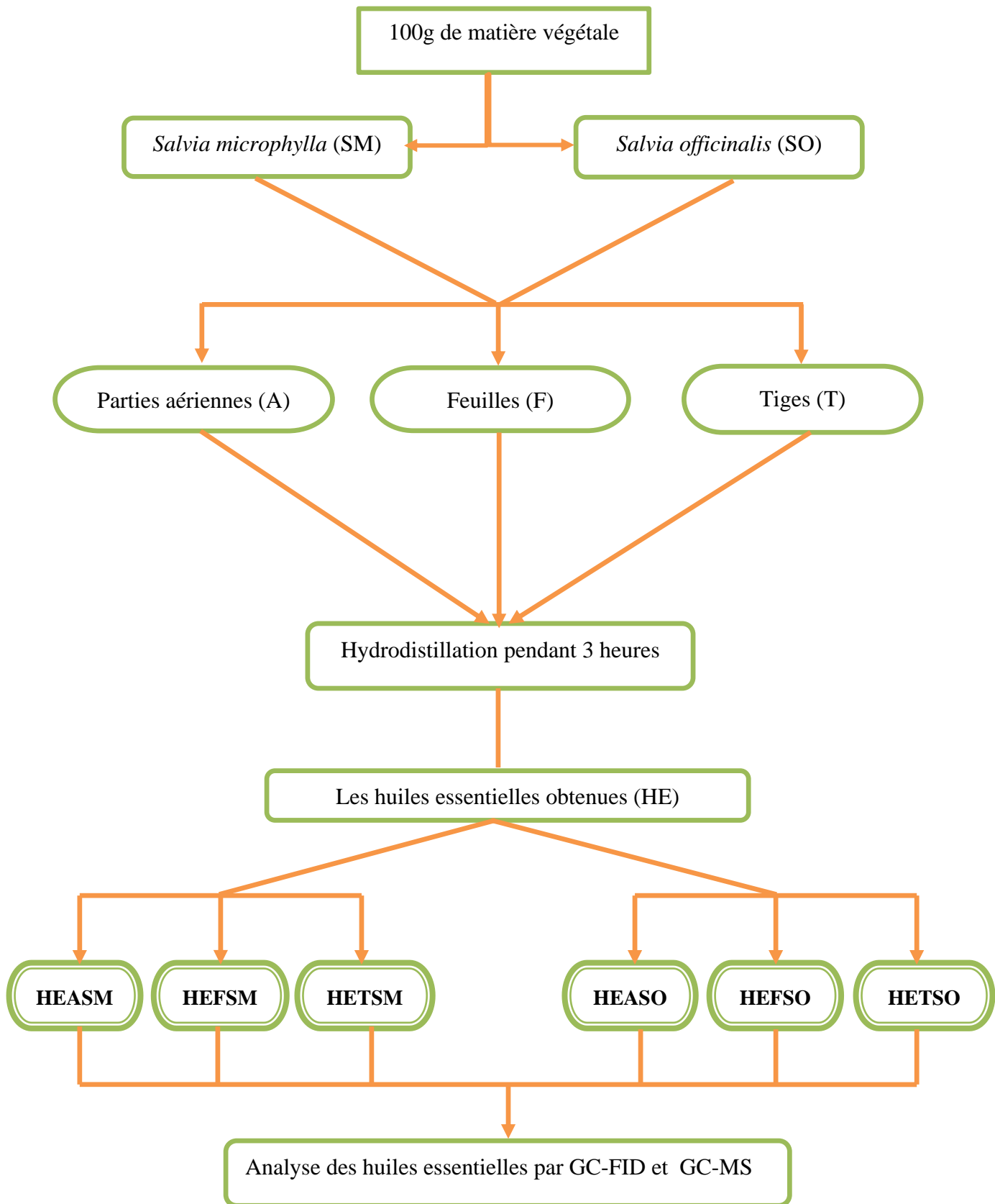


Figure 2.2 : Protocole d'extraction des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

2.3.2 Extraction, séparation et identification des métabolites secondaires de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

2.3.2.1 Extraction des métabolites secondaires

Dans cette étude, deux méthodes d'extraction ont été considérées : la macération à froid et l'extraction à chaud à l'aide d'un Soxhlet.

A. Extraction par macération

Le matériel végétal sèche et broyé (parties aériennes), de masse de 500 g, est soumis à une extraction par macération dans un mélange de solvants hydroalcooliques (MeOH/Eau : 80/20; V/V) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Les macéras sont filtrés puis concentré sous vide à l'aide d'un rotavapeur à une température n'excédant pas 35 °C. L'extrait obtenu est repris par l'eau distillée bouillante puis laissé au repos au réfrigérateur pendant une nuit pour décantation. Cette dernière opération permet le dépôt de la chlorophylle qu'on l'élimine par une simple filtration. Ensuite, le filtrat obtenu a subi des extractions liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants de polarité croissante : l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et enfin par le n-butanol successivement. Les différentes phases récupérées sont filtrées puis évaporés à sec à basse pression. Les extraits obtenus sont ensuite pesés, étiquetés et stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation [296]. Les parties aériennes des deux plantes *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ont subi les mêmes étapes de l'extraction précédente.

Les étapes extraction de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* sont résumées dans la figure 2.4.

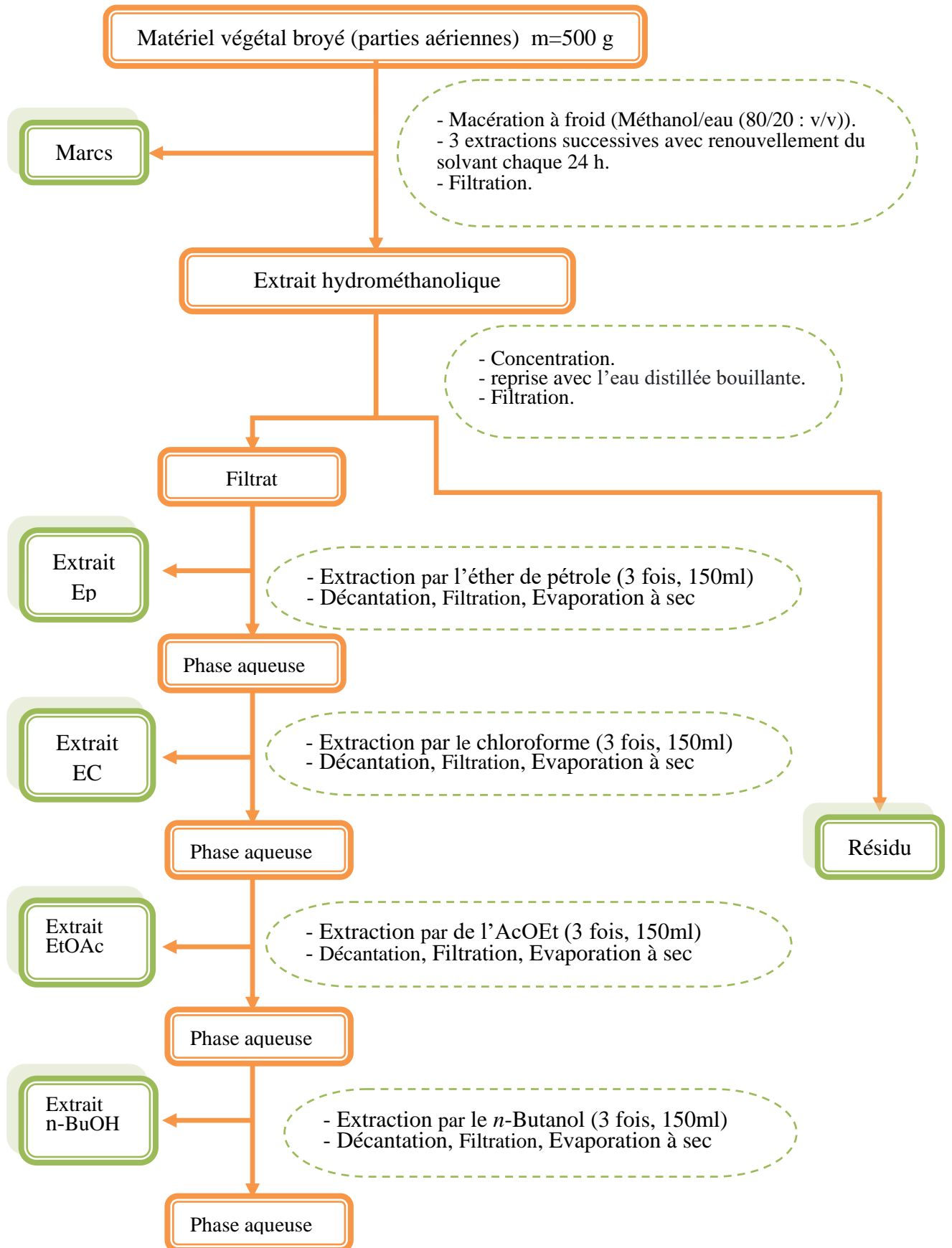


Figure 2.3 : Les étapes de l'extraction par macération de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* [296].

B. Extraction à chaud ou extraction au Soxhlet

La technique d'extraction au Soxhlet a été sélectionnée en raison de son efficacité pour extraire de manière relativement complète les métabolites des plantes. Cette méthode d'extraction permet de fractionner grossièrement les différents composés naturels présents dans la matière végétale. Un ensemble Soxhlet est constitué d'un ballon mono col contenant de solvant, d'un extracteur à siphon et d'un réfrigérant. L'extracteur est un réservoir avec un système de tube permettant la vidange du réservoir. L'ensemble est complété par une cartouche en cellulose remplie de matière végétale (sous forme de poudre), placée dans l'extracteur.

Chaque échantillon (les parties aériennes de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* sèches et broyées) a été extrait de manière séquentielle en utilisant des solvants de polarité croissante. Tout d'abord on commence par le n-hexane (C_6H_{14}) pour éliminer les lipides, les caroténoïdes et les chlorophylles, suivi par le dichlorométhane (CH_2Cl_2) et enfin l'éthanol (EtOH). 95 g de poudre fine de chaque échantillon sont placés dans une cartouche en cellulose avec 600 ml de solvant. Le solvant est ensuite porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon. Le solvant a ensuite été condensé par le réfrigérant avant de s'écouler dans le réservoir contenant la cartouche, où il a dissous la substance à extraire. Le réservoir s'est rempli progressivement. Dès que le niveau de solvant a atteint le sommet du tube-siphon, le réservoir s'est automatiquement vidé. À ce moment, le solvant et la substance à extraire ont été entraînés dans le ballon. Pour effectuer une extraction adéquate d'une substance, plusieurs cycles de ce processus ont généralement été réalisés. À chaque cycle d'extraction, la solution dans le ballon devient de plus en plus concentrée en soluté, car le matériau végétal reste en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est considérée comme terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus transparent, indiquant qu'il ne contient qu'une quantité négligeable de soluté. Le solvant organique est ensuite évaporé sous pression réduite à 40 °C. Le résidu sec restant dans le ballon est pesé, puis dissous dans de l'éthanol à une concentration déterminée.

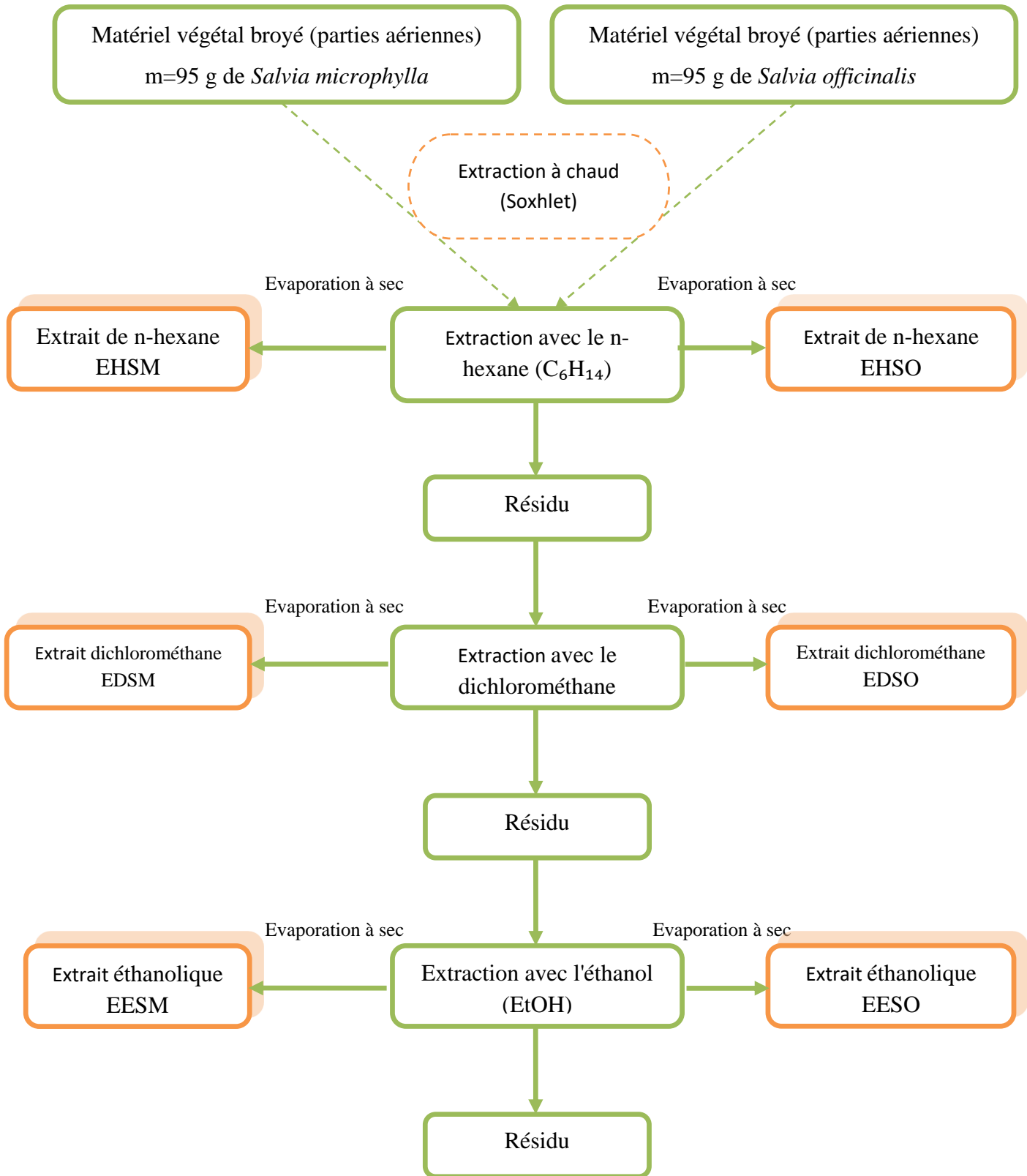


Figure 2.4 : Les étapes de l'extraction au Soxhlet de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

C. Rendement d'extraction

Le rendement de l'extrait est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait obtenue et la masse de matière végétale sèche. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

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

R (%) : Le rendement des extraits en pourcentage.

M_{EX} : La masse de l'extrait récupéré en gramme (g).

M_{MV} : La masse de matière végétale sèche utilisée pour l'extraction en gramme(g).

2.3.2.2 Séparation des métabolites secondaires de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

L'extrait dichlorométhane et éthanolique des deux plantes (*Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*) ont été choisis pour être étudié sur le plan chimique, Pour cela, nous avons commencé par utiliser une chromatographie analytique sur couche mince (CCM) de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, afin de déterminer le système d'élution qui permet la meilleure séparation sur colonne. Les tests chromatographiques effectués sur des plaques CCM ont montré que le système d'élution chloroforme/méthanol en gradient de polarité était le plus approprié pour les séparations.

A. Fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait dichlorométhane

La chromatographie d'adsorption sur colonne permet une séparation grossière des molécules en fonction de leur polarité. 4 g de l'extrait dichlorométhane pour *Salvia microphylla* et 2 g pour *Salvia officinalis* ont été dissous dans du méthanol, puis mélangés avec du gel de silice, avant d'être évaporés pour obtenir une poudre solide. Cette poudre a été déposée sur une colonne de gel de silice (type 60Å, 60-100 mesh, Sigma-Aldrich) préalablement préparée dans du chloroforme. L'élution a été réalisée par le chloroforme (CHCl₃), suivie d'un gradient de chloroforme/méthanol (CHCl₃/MeOH) jusqu'à 100% de méthanol (MeOH). Des fractions de 50 ml ont été collectées. Le suivi de ces fractions a été effectué par chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice sur support en aluminium. Les plaques ont été visualisées sous lumière UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$ et $\lambda = 365 \text{ nm}$) puis révélées avec 10 % d'acide sulfurique dans l'éthanol. Les fractions similaires ont été combinées et évaporées sous pression réduite pour obtenir 7 fractions. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait dichlorométhane (D) de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

Lot de fractions	Nom de la fraction	Système d'élution	
		% CHCl ₃	% MeOH
<i>Salvia microphylla</i>			
1-8	MFD1	100	0
9-17	MFD2	95	5
18-26	MFD3	80	20
27-35	MFD4	65	35
36-40	MFD5	50	50
41-45	MFD6	20	80
46-48	MFD7	0	100
<i>Salvia officinalis</i>			
1-2	OFD1	100	0
3-7	OFD2	95	5
8-9	OFD3	90	10
10-12	OFD4	80	20
13-14	OFD5	70	30
15	OFD6	50	50
16-20	OFD7	0	100

B. Fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait éthanolique

De la même manière que l'extrait chloroformique, 2g de l'extrait éthanolique ont été fractionnés sur une colonne de gel de silice, puis ont été élues via un gradient de solvants utilisant le système chloroforme/méthanol (CHCl₃/MeOH). Les 7 fractions ont été regroupées en fonction de leur profil en CCM. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait éthanolique (E) de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

Lot de fractions	Nom de la fraction	Système d'élution	
		% CHCl ₃	% MeOH
<i>Salvia microphylla</i>			
1-3	MFE1	100	0
4-5	MFE2	80	20
6-9	MFE3	60	40
10-12	MFE4	45	55
13-15	MFE5	30	70
16	MFE6	15	85
17	MFE7	0	100
<i>Salvia officinalis</i>			
1-3	OFE1	100	0
4-6	OFE 2	80	20
7-9	OFE 3	60	40
10-12	OFE 4	45	55
13-15	OFE 5	30	70
16	OFE 6	15	85
17	OFE 7	0	100

2.3.2.3 Quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux

A. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu phénolique total (TPC) des différents extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a été déterminé par la méthode colorimétrique sur microplaque décrite par Muller [297] en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) [298]. Le réactif de Folin Ciocalteu (FCR) est constitué d'un mélange de l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Lors de l'oxydation des phénols, ce réactif est réduit en un mélange d'oxydes de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (MO₈O₂₃). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm. Un volume de 20 µL d'extraits de la plante (1 mg/ml dans du méthanol) ont été mélangés avec 100 µL de FCR dilué dix fois

(1:10) et 75 μL de solution de carbonate de sodium (7,5%) dans une microplaque à 96 puits. Le mélange a été incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 2 h. par la suite l'absorbance a été mesurée à 765 nm par rapport à un blanc à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. Le blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol.

La concentration des polyphénols totaux (TPC) pour chaque extrait a été estimée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique à différentes concentrations (25 à 200 $\mu\text{g/ml}$) dans les mêmes conditions opératoires que les extraits. La teneur en phénols totaux est exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait).

B. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes dans les extraits a été réalisée par un procédé basé sur la formation d'un complexe très stable (jaune), entre les ions Al^{+3} et les flavonoïdes [112].

Le contenu en flavonoïdes totaux (TFC) des différents extraits de deux plantes a été déterminé selon la méthode colorimétrique décrite par Topçu [299] avec quelques modifications. 50 μl de chaque extrait (1mg/ml), a été mélangé avec 130 μL de MeOH, 10 μl d'acétate de potassium et 10 μl de chlorure d'aluminium. L'absorbance a été mesurée à 415 nm par un lecteur de microplaques après 40 min d'incubation dans l'obscurité à température ambiante. Le blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol.

Le TFC pour chaque échantillon est déterminé à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine dans les mêmes conditions opératoires. La courbe d'étalonnage des flavonoïdes a été effectuée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine à des concentrations allant de 25 à 200 $\mu\text{g/ml}$. La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en microgramme équivalent de la quercétine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

2.3.2.4 Analyse qualitative des composés phénoliques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

L'analyse chimique qualitative des extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol des deux plantes étudiées (EASM, EBSM, EASO, EBSO), ainsi que les fractions les plus actives, en terme d'activité antioxydante, obtenues de la chromatographie sur colonne des extraits dichlorométhane et éthanolique (MFD2, MFE3, OFD4, OFE4) a été effectuée par Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem (LC-

MS/MS) au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-Chimique (CRAPC), Ouargla Algérie.

➤ Préparation des échantillons

Les différents échantillons (extraits et fractions) ont été dissout dans le méthanol (qualité LC-MS), puis filtrés à travers un filtre seringue de 0,2 µm et placés dans un vial ambré selon le protocole de Akdeniz [300].

➤ Conditions d'analyse par LC-MS/MS

L'analyse LC-MS/MS a été réalisée en utilisant UPLC-ESI-MS-MS Shimadzu 8040 ultra-haute sensibilité avec la technologie UFMS équipé d'une pompe binaire Nexera XR LC-20AD. La colonne Restek Ultra en phases inverses C18 (3µm 4,6x150mm) a été utilisée pour la séparation chromatographique. Pour l'optimisation des standards des polyphénols, nous avons utilisé l'injection directe sans colonne. La phase mobile est constituée d'eau ultra-pure acidifiée avec de l'acide formique à 0,1% (éluant A) et de méthanol (éluant B). L'élution en gradient a été appliquée comme suit : 0 min à 2 min, 5% de B; 15min, 95% de B; 18min, 95% de B; 20min, 5% de B; 30min, 5% de B. Un volume de 5 µL a été injecté dans le système LC-MS/MS, passant à travers un filtre Millex-LCR (PTFE) avec des pores de 0,22 µm. Tandis que Le débit a été établi à 0,4 mL/min. L'analyse a été effectuée à température ambiante pendant 30 minutes.

Les conditions de l'ionisation par électrospray (ESI) utilisées dans la MS/MS sont les suivantes :

- gaz CID 230 KP; dynode de conversion, -6,00 Kv°C.
- Température d'interface de 350°C; Température DL: 250°C.
- débit de gaz de nébulisation: 3,00 L/min; Température du bloc chauffant, 400°C.
- débit de gaz de séchage: 15,00 L/min.

Le spectromètre de masse à piège à ions a été utilisé en mode ions positifs et négatifs avec le mode MRM (surveillance de réactions multiples). Les composés ont été identifiés en comparant les spectres de masse avec les données publiées dans la littérature.

2.4 Évaluation des activités biologiques des deux espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

2.4.1 Évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles isolées de *Salvia microphylla* (HEASM, HEFSM, HETSM), des huiles essentielles extraites de *Salvia officinalis* (HEASO, HEFSO, HETSO), des extraits de *Salvia microphylla* (ECSM, EASM, EBSM) et les extraits de *Salvia officinalis* (ECSO, EASO, EBSO) a été évaluée en utilisant six méthodes comparatives : le test de piégeage des radicaux libres DPPH, le piégeage des radicaux ABTS^{•+}, la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC, le pouvoir réducteur du fer (FRAP), la méthode de Phénanthroline et le test de blanchissement du β -carotène.

Le fractionnement des extraits dichlorométhane et éthanolique par chromatographique sur colonne de gel de silice, a donné lieu à un nombre important des fractions (EDSM, EESM, EDSO et EESO). L'évaluation de l'activité antioxydante de toutes ces fractions par plusieurs méthodes aurait été un défi. Pour cela, nous avons choisi d'évaluer l'activité antioxydante des extraits bruts, ainsi que de leurs fractions, en utilisant une seule méthode, le test de piégeage des radicaux libres de DPPH. Cette méthode est simple, fiable, peu coûteuse et plus rapide pour évaluer l'activité antioxydante.

2.4.1.1 Test de piégeage des radicaux libres DPPH

➤ Principe

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical stable qui présente une couleur violette en solution. Lorsqu'il entre en contact avec une substance réductrice, il subit une réduction par un mécanisme qui implique à la fois le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons. En conséquence, la couleur de la solution passe du violet au jaune. Plus une substance est antioxydante, plus le changement de couleur initial du violet vers le jaune est prononcé. Ce changement de couleur est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm (figure 2.5) [301].

La méthode de piégeage des radicaux DPPH est devenue la méthode la plus couramment utilisée pour évaluer la capacité antioxydante des composés chimiques ainsi que des produits naturels [302, 303]. Le radical DPPH, qui absorbe à 517 nm, est réduit en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) par l'ajout d'un atome d'hydrogène ou d'un électron sur le centre radicalaire suite à la réaction avec un antioxydant.

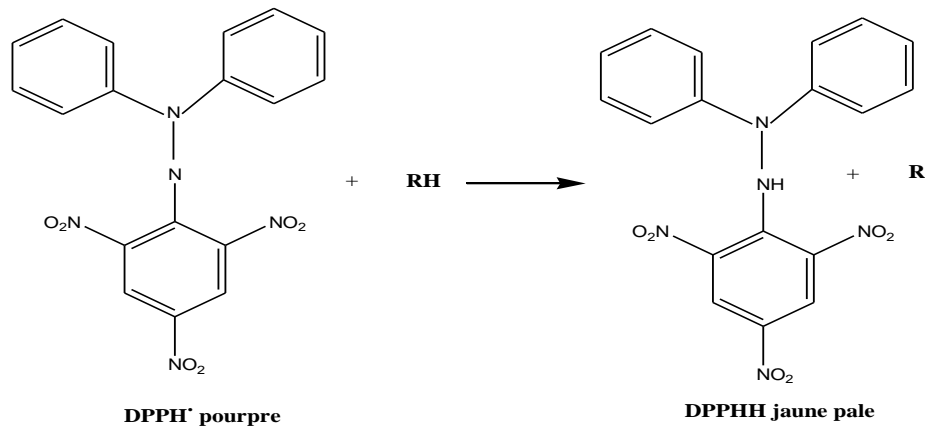


Figure 2.5 : Réduction du radical DPPH' en présence d'un antioxydant.

➤ Procédure expérimentale

Cette méthode peut être utilisée selon la littérature [304, 305], avec quelques modifications. Ainsi, 160 µl de la solution méthanolique de DPPH (0,1 mM) ont été ajoutés à 40 µl de la solution d'échantillon, dissoute dans du méthanol à diverses concentrations (huiles essentielles, extraits et standards). Un contrôle négatif (solution témoin) a été préparé en utilisant le méthanol en plus du réactif DPPH. Le mélange réactionnel a été incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits à 517 nm. La diminution de l'absorbance indique l'augmentation de l'activité de piégeage des radicaux libres. L'α-tocophérol, le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA) ont été utilisés comme étalons antioxydants pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés.

L'activité de piégeage des radicaux libres de chaque solution a été calculée en pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante. Les résultats ont été exprimés en valeur IC₅₀ (µg/mL) correspondant à la concentration de 50 % d'inhibition :

$$\text{Activité de piégeage du DPPH (\%)} = \left(\frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \right) \times 100$$

A Contrôle est l'absorbance du contrôle négatif (absence de l'échantillon).

A échantillon est l'absorbance du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester (HEs, extraits, ou des étalons).

2.4.1.2 Activité du piégeage de l'ABTS^{•+} (acide 2,2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic])

➤ Principe

L'ABTS^{•+} est un radical qui se forme lorsque la molécule stable d'ABTS est oxydée en utilisant des agents oxydants tels que le dioxyde de manganèse, le peroxyde d'oxygène ou le persulfate de potassium. Cette réaction entraîne l'apparition d'une coloration bleu-vert intense. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, l'azote de la molécule ABTS^{•+} capte un H•, ce qui conduit à la formation d'ABTS⁺ (figure 2.6) [306].

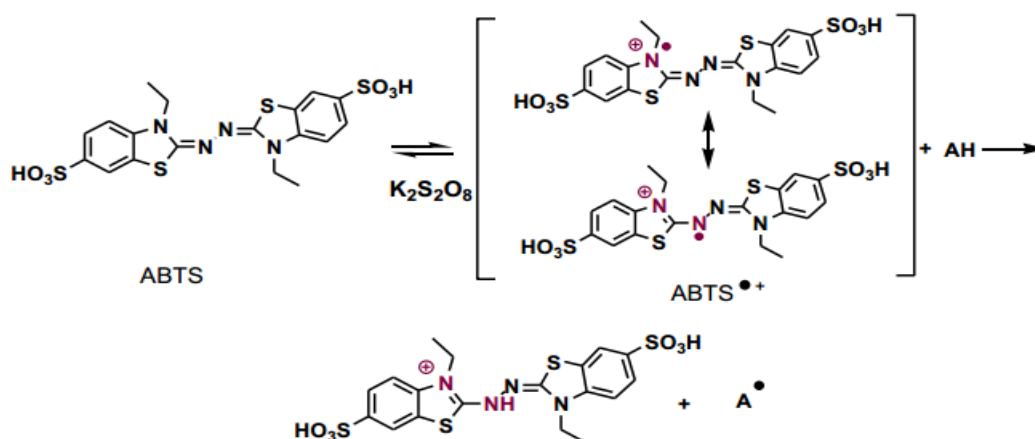


Figure 2.6: Génération du radical-cation ABTS^{•+} avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant AH.

➤ Procédure expérimentale

L'activité de piégeage des radicaux ABTS^{•+} a été réalisée selon la méthode décrite par Re [307], avec de légères modifications. L'ABTS^{•+} a été produit par la réaction entre 7 mM d'ABTS dans de l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium, stocké à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 12 à 16 heures. Le radical cation est stable sous cette forme pendant plus de 2 jours lorsqu'il est stocké dans l'obscurité à température ambiante. Tout d'abord, la solution d'ABTS^{•+} obtenue a été diluée dans du méthanol ou de l'eau distillée pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm. Ensuite, 160 µl de solution d'ABTS^{•+} ont été ajoutés à 40 µl de la solution d'échantillon, dissous dans du méthanol à différentes concentrations (HEs et standards). Après 10 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques 96 puits à 734 nm. Le BHT et le BHA ont été utilisés comme standards antioxydants à des fins de

comparaison. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc. La capacité de piégeage d'ABTS^{•+} a été calculée à l'aide de l'équation suivante. Les résultats ont été donnés sous forme de valeur IC₅₀ (µg/mL).

$$\text{Piégeage d'ABTS (\%)} = \left(\frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \right) \times 100$$

A **Contrôle** est l'absorbance du contrôle négatif (absence de l'échantillon)

A **échantillon** est l'absorbance du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester (HEs, extraits, ou des étalons)

2.4.1.3 Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

➤ Principe

La méthode CUPRAC (*cupric ion Reducing Antioxidant Capacity*) repose sur le suivi de la diminution de l'absorbance du complexe Néocuproïne (NC)-cuivre (Cu⁺²), (Nc₂-Cu⁺²). En effet, cette méthode consiste à réduire le complexe de cuivre (II) néocuproïne (Cu(II)-Nc) en présence d'un agent antioxydant, ce qui entraîne à la formation du complexe chromogène de cuivre (I) (néocuproïne) (Cu(I)-Nc) de couleur jaune orangée. Cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (figure 2.7) [308]. Dans ce test, les groupes hydroxyles phénoliques (Ar-OH) sont essentiellement oxydés en quinones correspondantes (Ar)-O [309].

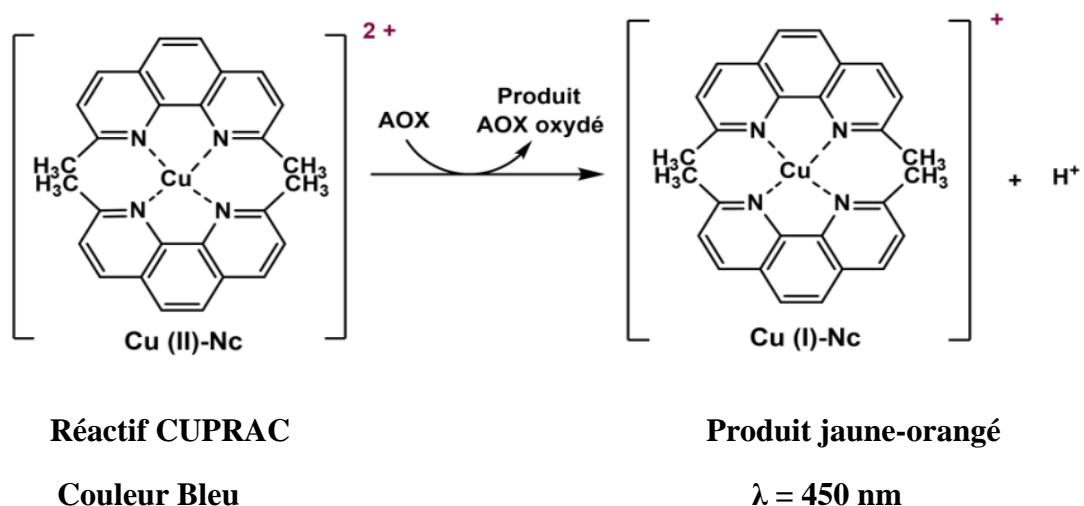


Figure 2.7 : Réduction du complexe chromogène de (néocuproïne) (Cu(II)-Nc).

➤ Procédure expérimentale

Le test de la capacité antioxydante réductrice cuprique (CUPRAC) a été réalisé selon la littérature [308] avec de légères modifications, en utilisant une microplaque de 96 puits. Un volume de 50 µl de solution de Cu (II) (10 mM) a été placé dans chaque puits, mélangé avec 50 µl de solution de néocuproïne (7,5 mM), 60 µl de tampon NH₄Ac (1 M, pH 7,0) et 40 µl de chaque échantillon à tester à différentes concentrations, afin d'atteindre un volume final de 200 µL. Le mélange obtenu a été incubé pendant 1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière. Ensuite, l'absorbance de la solution a été mesurée à 450 nm par rapport à un blanc de réactif. L'α-tocophérol, BHT et BHA ont été utilisées comme étalons. Les résultats ont été exprimés en A_{0.5} (µg/ml), correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

2.4.1.4 Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

➤ Principe

La méthode de FRAP repose sur la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique (Fe⁺³) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ (jaune) en fer ferreux (Fe⁺²) [310], le complexe perd sa couleur jaune pour diverses nuances de couleurs vertes et bleues en fonction de la capacité réductrice de chaque échantillon [311]. Cette coloration mesurée à 700 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants présents dans les échantillons [312].

➤ Procédure expérimentale

L'activité antioxydante par le test de FRAP a été déterminée comme décrit précédemment [313] avec quelques modifications. Ainsi, 10 µl de la solution d'échantillon à diverses concentrations, 40 µl de tampon phosphate (pH 6,6) et 50 µl de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) (1 %) ont été mélangés, puis incubés à 50 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, la solution a été mélangée avec 50 µl de solution d'acide trichloracétique (TCA) (10 %), 40 µl d'eau distillée et 10 µl de solution de chlorure ferrique (FeCl₃) (0,1 %). L'absorbance a été mesurée à 700 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. L'acide tannique, l'acide ascorbique et l'α-tocophérol ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été exprimés en A_{0.5} (µg/ml). L'activité de réduction du pouvoir a été calculée comme suit :

$$\text{Pouvoir réducteur du fer (\%)} = \left[\left(\frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{Contrôle}}} \right) - 1 \right] \times 100$$

$A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester (HEs, extraits, ou des étalons).

$A_{\text{Contrôle}}$ est l'absorbance du contrôle négatif (absence de l'échantillon).

2.4.1.5 Test de blanchissement du β -carotène

➤ Principe

Le test du β -carotène repose sur l'oxydation de l'acide linoléique, qui génère des radicaux peroxydes et des hydroperoxydes conjugués. Ces radicaux sont responsables de l'oxydation du β -carotène, qui est hautement insaturé. Cette réaction conduit à la perte des doubles liaisons du β -carotène, ce qui se traduit par la disparition de sa couleur jaune. Cette décoloration est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490 nm. Toutefois, la présence d'un antioxydant à la capacité de neutraliser les radicaux libres générés par l'acide linoléique, ce qui, par conséquent, prévient l'oxydation et le blanchissement du β -carotène [314]. Dans ce contexte, la capacité antioxydante est évaluée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par produits d'oxydation de l'acide linoléique.

➤ Procédure expérimentale

L'activité de blanchissement du β -carotène a été évaluée selon la méthode décrite par H. M. Miller [315]. 0,5 mg de β -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme, puis mélangé à 25 μ l d'acide linoléique ainsi qu'à 200 mg de Tween 40, pour former une émulsion. Le Tween 40 assure la dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène. Après évaporation complète du chloroforme sous vide, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec une agitation vigoureuse. L'absorbance de la solution du β -carotène doit être comprise entre 0,8 et 0,9. En utilisant une microplaque de 96 puits, un volume de 160 μ l de cette solution préparée, a été mélangé avec 40 μ l de chaque échantillon à tester à différentes concentrations (huiles essentielles et extraits). Un témoin négatif sans antioxydant, et des témoins positifs par des standards (BHA et BHT) ont été aussi préparés dans les mêmes conditions. Le mélange obtenu a été incubé à 50 °C pendant 120 minutes. L'absorbance a été mesurée à 470 nm à t=0 min et t=120 min en utilisant un lecteur de microplaque. Le pourcentage d'inhibition de chaque solution a été calculé selon l'équation suivante. Les

résultats ont été exprimés en valeur IC₅₀ (µg/mL) correspondant à la concentration de 50 % d'inhibition.

$$AA \% = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{échantillon (0)}} - A_{\text{échantillon (120)}}}{A_{\text{Contrôle (0)}} - A_{\text{Contrôle (120)}}} \right) \right] \times 100$$

$A_{\text{échantillon(0)}}$ est l'absorbance du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester (HEs, extraits, ou des étalons) à t=0 min.

$A_{\text{échantillon(120)}}$ est l'absorbance du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester (HEs, extraits, ou des étalons) à t=120 min.

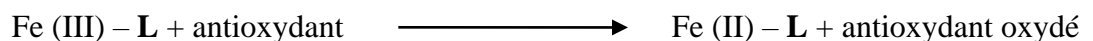
$A_{\text{Contrôle(0)}}$ est l'absorbance du contrôle négatif (absence de l'échantillon) à t=0 min.

$A_{\text{Contrôle(120)}}$ est l'absorbance du contrôle négatif (absence de l'échantillon) à t=120 min.

2.4.1.6 Méthode de phénanthroline

➤ Principe

Il s'agit d'une méthode colorimétrique visant à évaluer l'activité antioxydante par la réduction de fer. Cette méthode est largement utilisée dans la détermination du pouvoir antioxydant. Elle est basée sur la formation du complexe ferreux-phénanthroline en présence des polyphénols, qui a une coloration rouge (figure 2.8). La mesure de l'absorbance s'effectue à une longueur d'onde de 510 nm [316].



\mathbf{L} : 1,10-phénanthroline ou ortho-phénanthroline (C₁₂H₈N₂).

Figure 2.8 : Formation du complexe ferreux-phénanthroline en présence d'un antioxydant.

➤ Procédure expérimentale

La teneur en phénanthroline dans les huiles essentielles et des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ainsi que dans les étalons (BHA et BHT) a été évaluée selon le protocole décrit par Szydłowska-Czerniaka et al. Avec quelques modifications [316]. 50 µl de FeCl₃ (0,2%), 30 µl de 1,10-phénanthroline (0,5%) et 110 µl de méthanol sont ajoutés à 10 µl de différentes dilutions des solutions échantillons. Le mélange réactionnel a été incubé à l'obscurité pendant 20 min à 30°C. Un lecteur microplaque a été utilisé pour mesurer l'absorbance à 510 nm.

2.4.2 Évaluation *in vitro* de l'activité anti cholinestérase

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) des huiles essentielles et des extraits a été évaluée en modifiant légèrement la méthode décrite par Ellman et al. [252], qui repose sur la réaction de la thiocholine libérée pour donner un produit coloré avec un réactif chromogène. On a utilisé L'AChE de l'anguille électrique et la BChE du sérum de cheval, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine, respectivement, ont été utilisés comme substrats de la réaction. L'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB) et la galantamine, ont été employés, respectivement, pour la mesurer de l'activité cholinestérase et comme contrôle positif (standards). En bref, 10 µl de la solution d'échantillon (huiles essentielles, extraits et galantamine) dissoute dans le méthanol à différentes concentrations ont été mélangés avec 150 µl de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0), 20 µl de solution d'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou de BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) et incubé à 25 °C pendant 15 min. Ensuite, 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés avec 10 µl d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). Un lecteur de microplaques à 96 puits a été utilisé pour le suivi spectro-photométrique de l'hydrolyse de ces substrats par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate résultant de la réaction du DTNB avec la thiocholine, libéré par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou de chlorure de butyrylthiocholine, à une longueur d'onde de 412 nm. Les résultats ont été exprimés en valeur IC₅₀ (µg/mL) correspondant à la concentration d'inhibition de 50 %. Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme AChE ou de la BChE a été déterminé en comparant les vitesses de réaction des échantillons par rapport à un échantillon témoin (éthanol dans un tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{E - S}{E} \right) \times 100$$

Où E représente l'activité de l'enzyme sans l'échantillon à tester et S représente l'activité de l'enzyme avec l'échantillon à tester.

2.4.3 Évaluation *in vitro* de l'activité α -glucosidase

L'essai enzymatique de l' α -glucosidase a été réalisé sur des microplaques à 96 puits selon la méthode décrite par Lordan et Amrani [317, 318], en utilisant le p-Nitrophényl- α -d-glucopyranoside (p-NPG) comme substrat. Un volume de 50 μ l de solution des huiles essentielles ou des extraits à différentes concentrations (1 000 μ g/ml – 15 625 μ g/ml) dans un tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 6,9) a été mélangé à 50 μ l de solutions de p-NPG 5 mM (dans un tampon phosphate) dans une plaque de 96 puits. Après incubation à 37 °C pendant 5 min, 100 μ l d' α -glucosidase à 0,1 U/ml de levure de boulanger (dans un tampon phosphate) ont ensuite été ajoutés à chaque puits. Le contrôle négatif a été préparé sans échantillon et l'Acarbose a été utilisé comme contrôle positif. L'activité glucosidase a été déterminée en mesurant la libération de p-nitrophénol à partir du p-NPG à 405 nm pendant 30 minutes à l'aide d'un lecteur de microplaques réglé à 37 °C. Les résultats ont été exprimés en termes de concentration d'échantillons qui présenterait une inhibition de 50 % de l'activité enzymatique (IC₅₀). Le pourcentage d'inhibition a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition de l'activité } \alpha - \text{Glucosidase} = \left(\frac{A_{\text{échantillon}} - A_{\text{Blanc}}}{A_{\text{Contrôle}}} \right) \times 100$$

A échantillon est l'absorbance du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester (HE_s, extraits, ou l'acarbose).

A Blanc est l'absorbance du substrat + extrait + tampon de l'enzyme.

A Contrôle est l'absorbance du tampon de l'enzyme + substrat + solvant de l'extrait.

2.4.4 Évaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites de trois parties distinctes (Partie aérienne (A), Feuilles (F) et Tiges (T)) de *Salvia microphylla* et de *Salvia officinalis* (HEASM, HEFSM, HETSM et HEASO, HEFSO, HETSO) a été initialement évaluée par la méthode de diffusion sur milieu solide pour tester la sensibilité des treize souches microbiennes. Par la suite, la méthode de microdilution a été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de ces huiles essentielles.

2.4.4.1 Méthode de diffusion sur milieu solide

La méthode de diffusion sur milieu solide est une technique basée sur le contact direct entre les souches microbiennes et les échantillons à tester.

A partir d'une culture jeune et pur de 18h à 24h, nous avons raclées avec un anse 3 à 4 colonies bien isolées et parfaitement identiques de chaque souches microbienne, et puis ces colonies sont déchargées dans un bouillon nutritif stérile (le bouillon Mueller-Hinton (MHB) pour les bactéries et le bouillon Sabouraud dextrose (SDB) pour les levures), après agitation la suspension bactérienne a été incubé pendant 24h à 37°C pour les bactéries et à 30°C pendant 48h pour les levures. Après l'incubation, la suspension microbienne a été ajustée à une densité optique finale (DO) de 0,5 Mc Farland (DO à 600 nm entre 0,08 et 0,12), correspondant à $1-5 \times 10^6$ cellules/mL pour les souches de levures et environ $1-2 \times 10^8$ UFC/mL pour les bactéries.

Dans des boites Pétri stériles de 90 mm de diamètre, 20 ml de géloses (Mueller-Hinton (MH) pour les bactéries et Sabouraud dextrose (SD) pour les levures) en suffusion ont été coulées. Ensuite, les boites sont laissées refroidir, solidifier et séchées dans l'étuve à 37°C avant de l'utiliser pour éliminer l'humidité. Les boites de Pétri ont étéensemencées par frottement à l'aide d'un écouvillon stérile chargée de la suspension microbienne et bien essorer sur les paroi de tube afin d'éliminer tout excès de bouillon. Ensuite, des disques stériles de 6 mm de diamètre ont été imbibés par l'huile essentielle pure. Ces disques ont été déposés dans le centre des boites de Pétri incolées avec inoculum au préalable. Par la suite, les boites ont été incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 30°C pendant 48h pour les levures. L'activité antimicrobienne a été déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (mm) autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse (figure 2.9).

La sensibilité des différents micro-organismes vis-à-vis des échantillons à tester (HEs, extraits) a été classée selon les diamètres de la zone d'inhibition en mm et selon les critères suivants [319] :

- Extrêmement sensible +++ : diamètre de la zone d'inhibition >20mm.
- Très sensible ++ : diamètre de la zone d'inhibition compris entre 15 à 19 mm.
- Sensible + : diamètre de la zone d'inhibition compris entre 9à 14mm.
- Non sensible : diamètre de la zone d'inhibition <8mm.

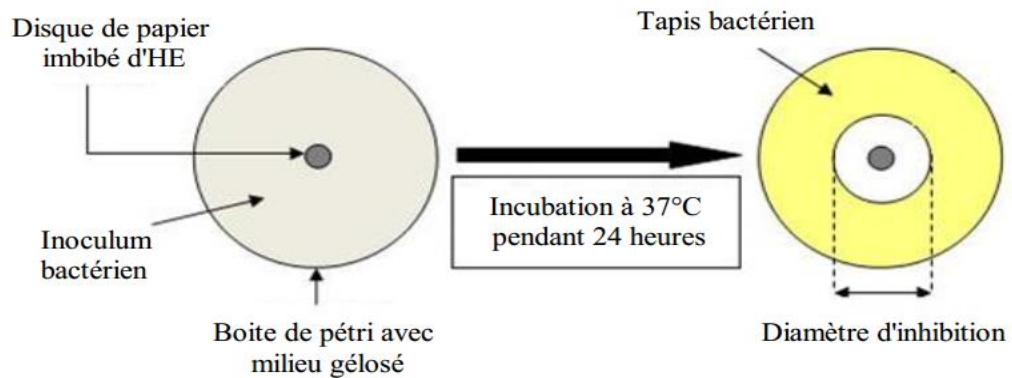


Figure 2.9 : Principe de la méthode de diffusion sur disque.

2.4.4.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de la substance qui peut inhiber la croissance des souches microbiennes testées. La détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a été testée contre cinq bactéries à Gram-négatives, six bactéries à Gram-positives et deux levures. La méthode de microdilution en milieu liquide a été utilisée pour la détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) dans des microplaques à 96 puits [320-322]. Les tests ont été réalisés dans le bouillon Mueller-Hinton (MHB) pour les bactéries et le bouillon Sabouraud Dextrose (SDB) pour les levures. Les souches bactériennes ont été cultivées pendant une nuit à 37 °C dans le bouillon Mueller-Hinton (MHB) et les levures ont été cultivées pendant 48h à 30 °C dans le bouillon Sabouraud dextrose (SDB).

Une série de dilutions doubles des huiles essentielles dans le milieu de bouillon a été préparée de manière aseptique, dans une microplaque à 96 puits. En bref, 50 µL de MHB pour les bactéries et SDB pour les levures ont été ajoutés à chaque puits, des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir, du premier au neuvième puits, des concentrations finales allant de 0,10 à 26,66 µL/ml. Ensuite, chaque puits a été inoculé avec 50 µL d'une suspension microbienne ajustée à une densité optique (DO) finale de 0,5 unités Mc Farland (DO à 600 nm entre 0,08 et 0,12), correspondant à $1-5 \times 10^6$ cellules/mL pour les souches de levures et environ $1-2 \times 10^8$ UFC/mL pour les bactéries. Des contrôles négatifs ont été préparés avec le milieu de culture et les micro-organismes. Il faut noter que les 11^{ème} et 12^{ème} puits ont été réservés respectivement pour vérifier que le milieu de culture était stérile et que le DMSO, utilisé pour émulsionner l'huile essentielle, ne présentait aucune activité

antimicrobienne. La microplaque a été incubée à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 26 °C pendant 48 heures pour les levures.

La croissance de l'organisme dans les puits de microdilution a été détectée à l'œil nu et en mesurant la densité optique à 600 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. Le puits contenant la plus faible concentration d'huile essentielle dans lequel le micro-organisme ne présentait pas de croissance visible a été classé comme CMI. L'amoxicilline et le kétoconazole ont été utilisés comme contrôle positif antibactérien et antifongique.

2.4.4.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale fongicide (CMF)

La concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale fongicide (CMF) des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ont été déterminées après microdilution en milieu liquide par sous-culture de 100 µL provenant de puits, donnant une croissance microbienne négative (ne contiennent aucune croissance bactérienne visible après incubation) sur un milieu solide dans des boîtes de Pétri contenant du Mueller-Hinton (MHA) pour les bactéries et du Sabouraud Dextrose (SDA) pour les levures, et incubé à 37 °C pendant 24 h. La plus faible concentration d'huile essentielle nécessaire pour tuer 99,9 % de l'inoculum final a été définie comme étant la concentration minimale bactéricide ou la concentration minimale fongicide. En particulier, la CMB a été établie pour les bactéries et la CMF pour les levures [323].

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Étude de l'influence de quelques paramètres lié à la matière végétale sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

3.1.1 Influence de la technique d'extraction sur le rendement des huiles essentielles de *Salvia microphylla*

Il existe diverses techniques d'extraction des huiles essentielles à partir des plantes. Dans cette étude, nous avons utilisé trois méthodes d'extraction : l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur et l'induction électromagnétique. Cette analyse comparative met en lumière des différences notables tant au niveau des rendements obtenus qu'au niveau de la composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Salvia microphylla*.

3.1.1.1 Rendement en huile essentielle

La figure ci-dessous présente les rendements en pourcentages (%) obtenus par trois méthodes d'extraction différentes des huiles essentielles de *Salvia microphylla*, à savoir : l'hydrodistillation (HD), l'entraînement à la vapeur d'eau (EV) et l'induction électromagnétique (IE).

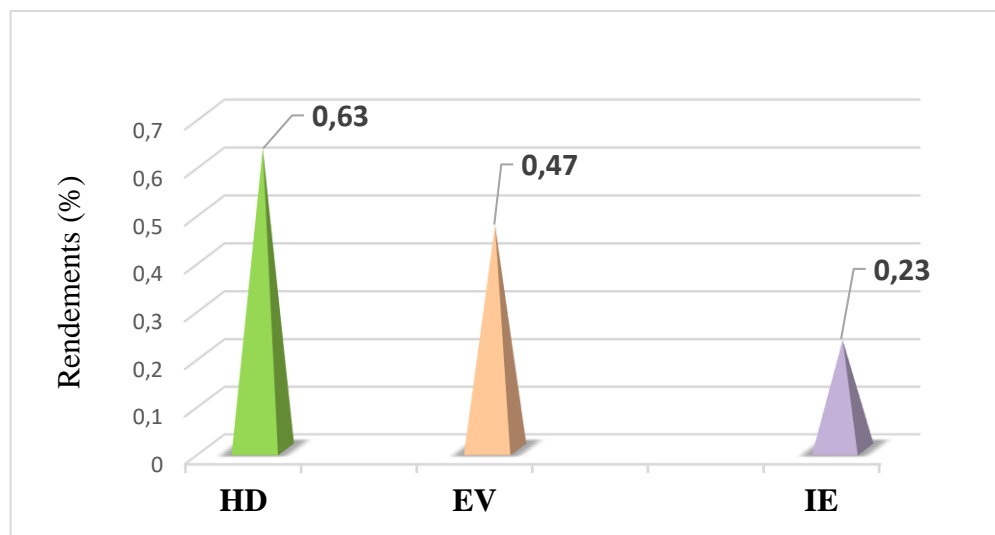


Figure 3.1 : Rendements (%) des huiles essentielles de *Salvia microphylla* selon trois méthodes d'extraction.

En comparant les trois méthodes d'extraction d'huile essentielle, il apparaît que la hydrodistillation (HD) offre le meilleur rendement avec 0,63 %, suivie par l'entraînement à la vapeur d'eau (EV), qui donne un rendement de 0,47 %. La méthode d'induction électromagnétique (IE) présente le rendement le plus faible, atteignant seulement 0,23 %. Ces résultats indiquent que l'hydrodistillation est la méthode la plus efficace pour extraire une plus grande quantité d'huile essentielle *Salvia microphylla*, tandis que l'induction électromagnétique semble être la moins performante.

3.1.1.2 Composition chimique

Le tableau 3.1 présente les teneurs (%) des principaux composés des huiles essentielles extraites des parties aériennes de *Salvia microphylla* à l'aide de trois méthodes : l'hydrodistillation (HD), l'entraînement à la vapeur d'eau (EV) et l'induction électromagnétique (IE). Chaque technique montre des variations significatives dans les concentrations des composés volatils.

Tableau 3.1 : Les composés majoritaires des huiles essentielles de *Salvia microphylla* obtenues par trois méthodes d'extraction.

N°	Composés majoritaires	compositions (%)		
		HD	EV	IE
1	1,8-Cinéole	5,87	3,24	1,72
2	Acétate de bornyle	8,14	8,67	2,16
3	Carvacrol	-	-	17,1
4	β -Caryophyllène	16,75	15,91	1,44
5	Aromadendrène	5,39	4,46	0,27
6	Bicyclogermacrène	3,65	8,08	-
7	Spathulénol	5,04	2,65	4,89
8	γ -Eudesmol	6,27	4,11	4,39
9	β -Eudesmol	6,04	3,97	5,19
10	α -Eudesmol	11,41	6,45	8,06

L'hydrodistillation (HD) se distingue par des niveaux élevés de certains composés clés, tels que le β -caryophyllène (16,75 %), l' α -eudesmol (11,41 %), l'acétate de bornyle (8,14 %) et γ -Eudesmol (6,27 %) qui sont particulièrement abondants avec cette méthode.

De son côté, l'entraînement à la vapeur d'eau (EV) affiche des résultats similaires à ceux de la HD pour plusieurs composés. Par exemple, on observe des concentrations notables en β -caryophyllène (15,91 %) et en acétate de bornyle (8,67 %). Le bicyclogermacrène est aussi présent de façon significative, mais avec une teneur plus élevée

dans l'huile obtenue par EV (8,08 %). Cependant, la concentration en 1,8-cinéole (3,24 %) est légèrement inférieure à celle obtenue par HD (5,87 %).

Quant à l'induction électromagnétique (IE), elle révèle un profil de composition nettement différent. Le carvacrol, absent dans les huiles obtenues par les autres méthodes, est très présent ici, avec une teneur de 17,1 %. À l'inverse, des sesquiterpènes tels que le β -caryophyllène et l'aromadendrène sont beaucoup moins abondants, et le bicyclogermacrène est totalement absent. De plus, certains monoterpènes comme le 1,8-cinéole et l'acétate de bornyle sont extraits en plus faibles quantités. Toutefois, des composés comme le γ -eudesmol, le β -eudesmol et le spathuléol se retrouvent dans des proportions similaires dans les huiles obtenues par HD et IE.

La figure ci-dessous montre les principaux monoterpènes et sesquiterpènes (acétate de bornyle, le carvacrol, le β -caryophyllène, le bicyclogermacrène et l' α -eudesmol) présents dans la composition chimique des huiles essentielles de *Salvia microphylla*, obtenues par trois méthodes d'extraction : l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'induction électromagnétique.

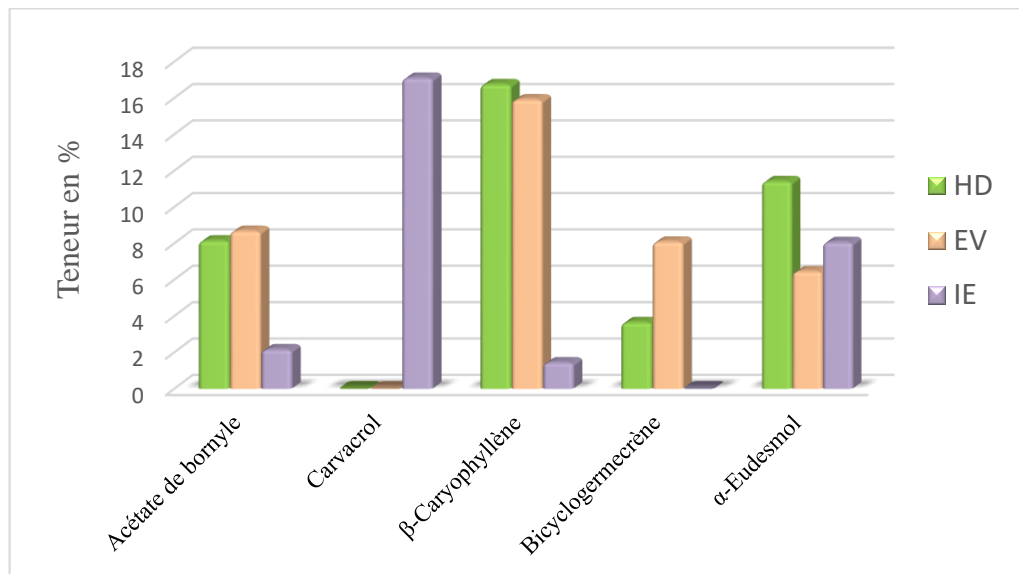


Figure 3.2 : Variation de la teneur en monoterpènes et sesquiterpènes majeurs de *Salvia microphylla* selon différentes méthodes d'extraction.

En effet, l'hydrodistillation se révèle être la méthode la plus appropriée pour l'extraction des huiles essentielles de *Salvia microphylla*, car elle permet d'obtenir les concentrations les plus élevées en composés majoritaires, offrant ainsi un meilleur rendement global en termes de diversité et de quantité de composants actifs.

3.1.2 Étude de la variation mensuelle du rendement et de la composition chimique des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

3.1.2.1 Rendement en huile essentielle

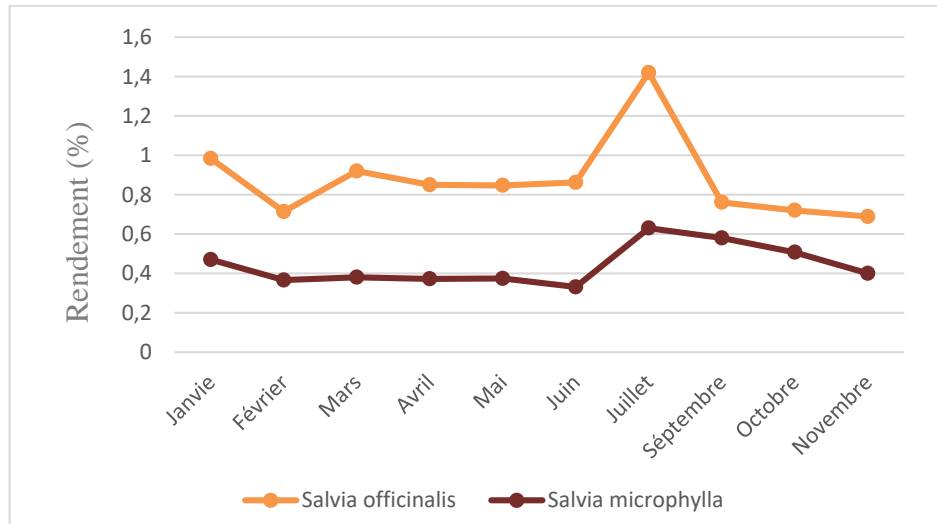


Figure 3.3 : Influence de la période de récolte sur le rendement en huile essentielle de *Salvia officinalis* et *Salvia microphylla*.

Les rendements moyens des huiles essentielles de la partie aérienne de *Salvia microphylla* et de *Salvia officinalis* extraites par Hydrodistillation durant la période de janvier, février, mars, avril, mai, juin, juillet, septembre, octobre et novembre, sont variables de 0,331% à 0,630% pour *Salvia microphylla* et de 0,689% à 1,420% pour *Salvia officinalis*. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 3.3.

D'après la figure 3.3, les deux courbes ont la même allure, sauf pour les mois janvier, février et mars où on observe une diminution puis une augmentation en rendement de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*, face à une augmentation puis une diminution dans le rendement de l'huile essentielle de *Salvia microphylla*.

Les résultats obtenus entre la période de «janvier, février, mars» et «septembre, octobre, novembre» montrent des changements significatifs liés probablement au climat, ainsi le rendement d'extraction de l'huile essentielle des deux espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* change radicalement d'une période à une autre, contrairement à celui de «avril, mai, juin» qui est très constant et augmente régulièrement avec le stade végétatif de la plante pour donner son meilleur rendement à partir du mois de juillet.

Des études menées sur les feuilles de *Salvia microphylla* cultivées en Californie [203], récoltées aux stades végétatif (avril), de floraison (juillet) et de sénescence

(novembre), ont permis d'extraire des huiles essentielles par hydrodistillation. En avril, le rendement s'est avéré très faible, atteignant seulement 0,3 %, probablement en raison des conditions climatiques ou du stade de développement de la plante. En juillet, le rendement a culminé à 6,7 %, vraisemblablement parce que cette période correspond à l'apogée de la production de composés volatils par la plante. En novembre, le rendement est retombé à 1,1 %, ce qui pourrait s'expliquer par l'entrée de la plante en phase de dormance ou par des conditions météorologiques défavorables. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans notre propre étude.

Lakhal et ses collaborateurs [221] ont trouvé que *Salvia officinalis* de la région de Batna collecté au mois de Mai a présenté un rendement de 2,1%. Il est cependant supérieur au rendement obtenu à partir de notre plante 0,847% dans le même mois. De même, les résultats obtenus par Dob [217] indiquent que *Salvia officinalis* récolté de la région d'Alger pendant le mois de juin a donné un rendement en huile essentielle 0,9% presque équivalent à celui que nous avons obtenu (0,862%) à partir de la même plante récoltée le même mois. En ce qui concerne, l'espèce *Salvia microphylla* locale aucune étude n'a été réalisée.

Ces variations peuvent être aussi attribuées aux différents facteurs environnementaux prenant en compte que l'huile essentielle est un produit métabolique de cellules végétales, donc elle est influencée par les conditions climatiques (notamment le type de climat, taux d'humidité, le taux d'exposition au soleil).

3.1.2.2 Composition chimique

Les analyses chromatographiques ont permis d'identifier un total de 46 composés représentant de (80,38-98,40%) de la composition chimique globale de l'huile essentielle de *Salvia microphylla* (Appendice B1). Et permis de plus d'identifier un total de 38 composés représentant de (96,45-99,12%) de la composition chimique globale de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* (Appendice B2), pendant 10 mois.

Selon les résultats obtenus, nous retrouvons globalement presque Les mêmes composés majoritaires pendant tout le cycle végétatif de *Salvia microphylla*. Il est observé que l'acétate de bornyl atteint sa concentration maximale en février et en novembre, avec des valeurs respectives de 9,9 % et 10,8 %. En avril, cette concentration diminue légèrement à 8,06 %, puis chute encore pour tomber à 5,46 % en juin. Par la suite, elle remonte à 8,14 % en juillet. En ce qui concerne le β -trans-caryophyllène, sa teneur montre une tendance générale à augmenter jusqu'en juillet, où elle atteint un maximum de 16,75 %. Cependant, une diminution notable est observée en novembre, avec une concentration de 9,45 %.

L' α -eudesmol, quant à lui, présente une grande variabilité, atteignant un pic en juin avec 18,38 %. Les concentrations diminuent ensuite de manière significative jusqu'en septembre, avant de remonter en octobre pour atteindre 16,4 %.

La figure 3.4 présente les monoterpènes et les sesquiterpènes majoritaires (acétate de bornyle, β -caryophyllène et α -eudesmol) présents dans la composition chimique de toutes les huiles essentielles de *Salvia microphylla*.

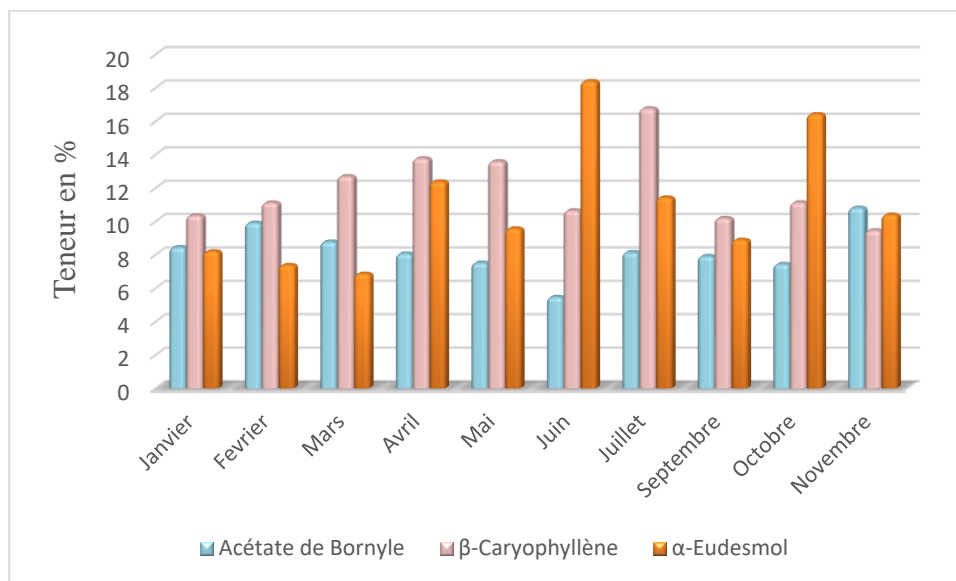


Figure 3.4 : Variation de la teneur des monoterpènes et des sesquiterpènes majoritaires des huiles essentielles de *Salvia microphylla* selon la période de récolte.

Satyral et ses collaborateurs [203] ont démontré que le rendement global en huile essentielle de *Salvia microphylla*, ainsi que les concentrations d'hydrocarbures monoterpéniques et de monoterpénoïdes oxygénés, étaient plus élevées en été. En particulier, les concentrations de camphre (10,5 %) et de 1,8-cinéole (6,2 %) atteignaient leur maximum durant cette saison. Les hydrocarbures monoterpéniques présentaient également des niveaux élevés en automne. Les concentrations d'hydrocarbures sesquiterpéniques étaient plus importantes au printemps, notamment avec le (E)-caryophyllène (11,5 %), mais diminuaient en été. Quant aux sesquiterpénoïdes oxygénés, leurs concentrations augmentaient légèrement en automne, avec des exemples marquants tels que le guaïol (26,3 %) et l' α -eudesmol (19,9 %).

Pour *Salvia officinalis*, les principaux constituants restent globalement constants tout au long du cycle végétatif, avec de légères variations dans leur teneur. Le camphre se

révèle être le composé dominant de mai à octobre, affichant des concentrations élevées comprises entre 16,35 % et 26,34 %, avec une augmentation progressive vers la fin de cette période. Il est suivi par l' α -Thujone, dont la teneur varie de 12,94 % à 20,07 % durant la même période. Par ailleurs, la concentration en 1,8-Cinéole connaît une hausse progressive, passant de 8,99 % en mai à 14,75 % en octobre.

La variation des monoterpènes majoritaires (camphre, l' α -Thujone et 1,8-Cinéole) présents dans la composition chimique de toutes les huiles essentielles de *Salvia officinalis* sont présente dans la figure 3.5.

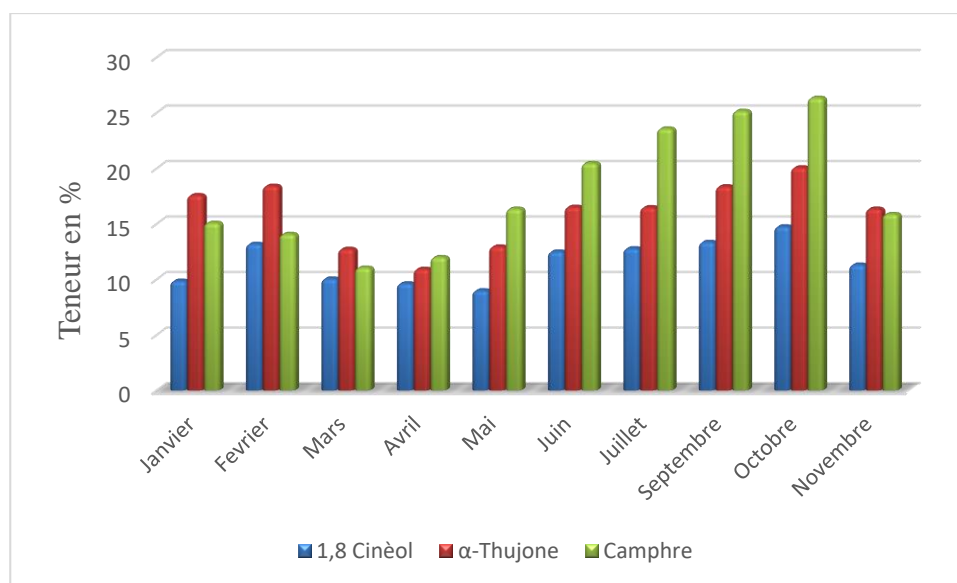


Figure 3.5 : Variation de la teneur des principaux monoterpènes des huiles essentielles de *Salvia officinalis* en fonction de la période de récolte.

Il a également été observé que le camphène est un composé prédominant dans les huiles essentielles de *Salvia officinalis*, apparaissant à la fin de la floraison (septembre et octobre) avec des concentrations de 5,31 % à 5,42 %. En revanche, sa présence est limitée pendant les autres mois. De plus, les échantillons de *Salvia officinalis* récoltés en mars et avril, avant la floraison, se caractérisent par la présence de β -caryophyllène et d' α -humulène, avec des taux respectifs variant entre 6,49 % et 8,72 % pour le β -caryophyllène, et entre 7,41 % et 8,84 % pour l' α -humulène.

Le Viridiflorol et le Manool sont deux sesquiterpènes majoritaires présents dans les huiles essentielles de *Salvia officinalis* tout au long des différentes périodes de récolte (figure 3.6). Leurs concentrations sont généralement plus élevées en dehors de la période de

floraison, ce qui indique une augmentation de la disponibilité de ces composés pendant les mois de janvier, février, mars, ainsi qu'en novembre.

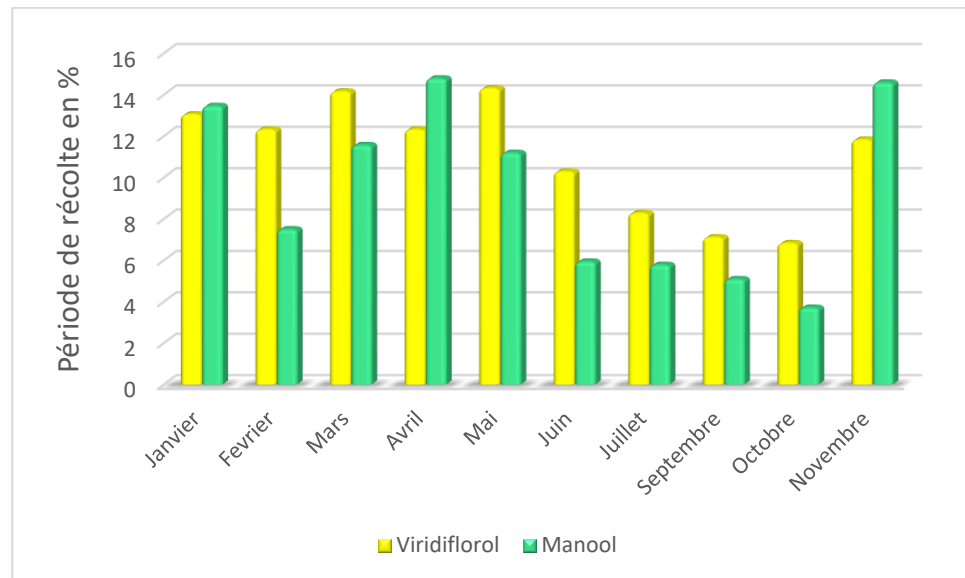


Figure 3.6 : Variation de la teneur des principaux sesquiterpènes des huiles essentielles de *Salvia officinalis* en fonction de la période de récolte.

On peut aussi expliquer la différence observée entre ces 10 mois de collecte par le processus de biosynthèse de ces principaux constituants. On conclut donc que la différence des teneurs de ces composés qui varient en fonction des paramètres environnementaux (stade phénologique de la plante, stress biotique et abiotique, etc.) oriente la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis.

Au cours de ce travail, les rendements en HE des deux espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* atteignent son maximum au mois de juillet avec des teneurs respectivement de 0,63% et 1,42%. Les analyses chromatographiques montrent que les huiles essentielles des deux espèces récoltées entre le mois de juin et octobre contiennent presque le plus grand nombre de composés volatils par rapport à celles recueillies durant les autres mois.

À partir des résultats obtenus dans cette partie, nous avons opté pour étudier la composition chimique et les activités biologiques de ces deux espèces récoltées au mois de juillet (floraison), en adoptant le procédé de l'extraction par hydrodistillation.

3.2 Étude de la composition chimique et évaluation de l'activité biologique des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

3.2.1 Extraction et analyse des huiles essentielles des deux espèces étudiées

3.2.1.1 Rendement

Les huiles essentielles extraites à partir des parties aériennes, des feuilles et des tiges de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ont été obtenues par hydrodistillation conventionnelle. Les rendements en huiles essentielles ont été exprimés par rapport au poids de la matière sèche végétale (Figure 3.7 et 3.8).

Les parties aériennes, les feuilles et les tiges de *Salvia microphylla* ont présenté respectivement des rendements de 0,63 %, 0,75 % et 0,23 % du poids sec. Les huiles obtenues étaient des liquides jaunes caractérisés par une forte odeur. Les résultats indiquent que les parties aériennes et les feuilles présentent un rendement plus élevé que les tiges. En comparaison avec d'autres études, le rendement en huile essentielle des parties aériennes obtenu dans la présente étude était inférieur à ceux précédemment rapportés pour la même espèce en Italie (3,9 %) [204] et en Espagne (0,8 %) [324]. Les feuilles de *Salvia microphylla* récoltées en Californie ont montré une capacité de production d'huile essentielle très variable selon la saison, passant de 0,3 % en avril (stade végétatif) à un pic de 6,7 % en juillet (stade de floraison), puis diminuant à 1,1 % en novembre (stade sénescence). En comparaison, le rendement observé en Californie pour le mois de juillet est nettement supérieur à celui obtenu dans notre étude pour le même mois. À l'inverse, en avril, le rendement en huile essentielle pour l'espèce récoltée en Californie est inférieur à celui obtenu dans la présente étude. Les résultats de novembre montrent une légère supériorité du rendement en huile essentielle californienne (1,1 %) [203].

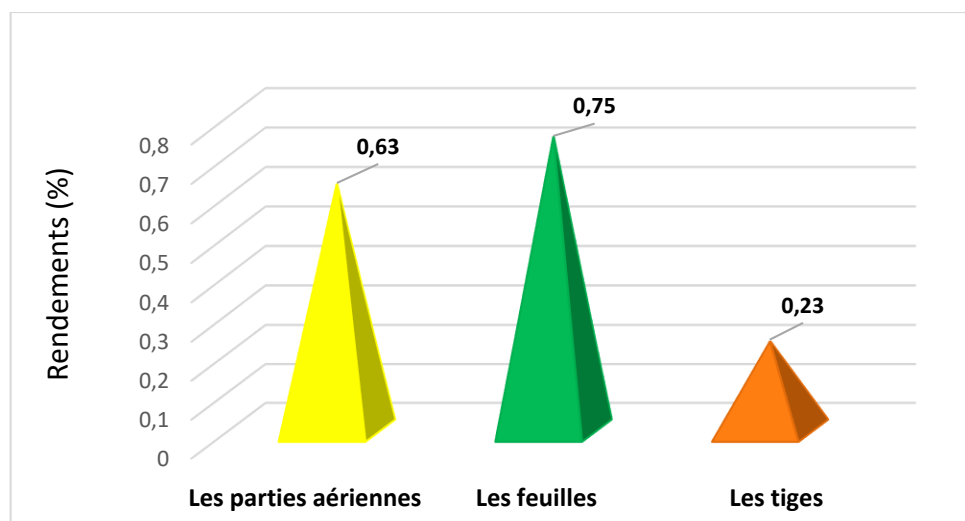


Figure 3.7: Rendement d'extraction (%) des huiles essentielles de *Salvia microphylla*.

Les huiles essentielles extraites de *Salvia officinalis* sont de couleurs jaunes clair, de forte odeur (camphrée) et ont un aspect liquide. Le rendement en huiles essentielles varie selon les parties de la plante utilisées : 1,42% pour les parties aériennes, 1,89% pour les feuilles et enfin 0,54% pour les tiges. Les feuilles sont la source la plus riche en huiles essentielles parmi les parties étudiées, tandis que les tiges en contiennent le moins. En comparaison avec d'autres études, les rendements en huiles essentielles obtenus à partir des feuilles de *Salvia officinalis* récoltées au Liban (1,75%) [211] et à El Hamma (Alger) (1,91%) [216] pendant la phase de floraison, sont conformes à nos résultats. En revanche, les feuilles collectées en Tunisie (1,03 %) [16] et à Batna (1,41 %) [220] présentent des rendements en huiles essentielles inférieurs à ceux que nous avons obtenus. Cependant, les feuilles collectées à Kherrata (Algérie) [215] présentent un rendement supérieur (3,18%). Concernant les parties aériennes, nos résultats révèlent un rendement en huiles essentielles supérieur à ceux rapportés pour l'Iran (0,55 %) [212], l'Italie (0,35 % à 0,45 %) [208], Constantine (0,65 %) [222], Alger (0,9 %) [217] et Laghouat (0,84 %) [218]. Seules les espèces récoltées à Batna (2,1%) [221] et au Maroc (4,09%) [209] affichent des rendements plus élevés.

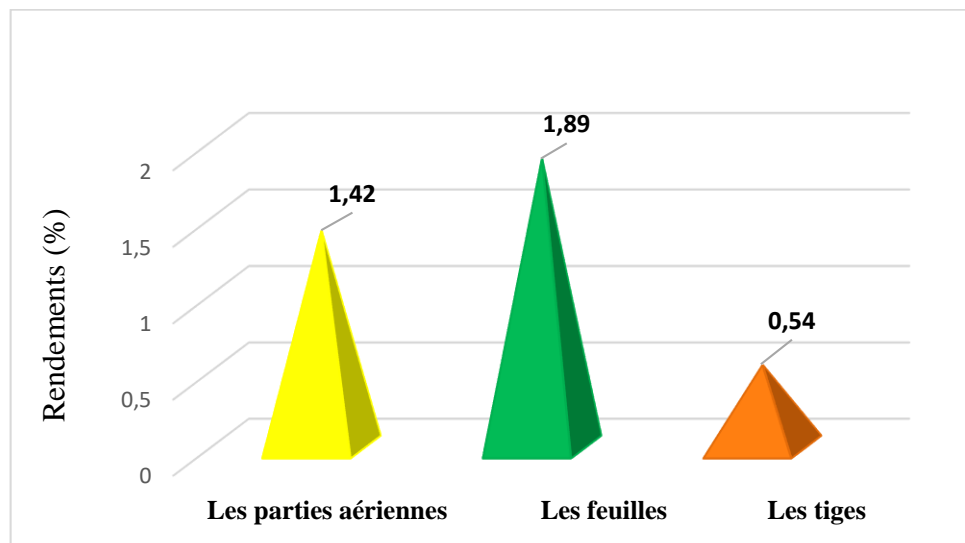


Figure 3.8 : Rendement d'extraction (%) des huiles essentielles de *Salvia officinalis*.

Cette variation du rendement entre les deux espèces est due à différents facteurs. Parmi ceux-ci, on retrouve les conditions environnementales (climat, altitude), la composition du sol, les caractéristiques génétiques de la plante, le mode d'extraction utilisé, la période de récolte, l'origine géographique spécifique de l'espèce, ainsi que la partie spécifique de la plante soumise à l'extraction [325].

3.2.1.2 Composition chimique des huiles essentielles des deux plantes étudiées

➤ *Salvia microphylla*

L'analyse chimique des trois huiles essentielles par GC et GC-MS a conduit à l'identification de 36, 32 et 47 composés représentant respectivement 98,40 %, 98,55 % et 91,38 % de la composition totale des parties aériennes, des feuilles et des tiges de *Salvia microphylla*. La composition chimique des huiles essentielles (HEs), les indices de rétention linéaire calculés et ceux rapportés dans la littérature, ainsi que les pourcentages des différents composés déterminés par GC/FID, sont répertoriés dans le tableau 3.2.

Les profils chromatographiques des trois huiles essentielles de *Salvia microphylla* sont donnés en appendice (Appendice C1).

Tableau 3.2 : Composition chimique des huiles essentielles isolées des parties aériennes, des feuilles et des tiges de *Salvia microphylla*.

N°	composés ^a	Class e	LRI _{cal} ^b	LRI _{Lit} ^c	compositions (%) ^d		
					Parties aériennes	Feuilles	Tiges
1	α -Thujène	mh	927	925	Tr	Tr	-
2	α -Pinène	mh	933	939	4,09 ± 0,01	4,63 ± 0,02	0,91 ± 0,04
3	Camphène	mh	947	951	4,04 ± 0,02	4,48 ± 0,03	0,94 ± 0,14
4	β -Pinène	mh	976	978	2,29 ± 0,01	2,63 ± 0,03	0,76 ± 0,04
5	α -Terpinène	mh	1017	1017	-	-	Tr
6	p-Cymène	mh	1026	1026	Tr	Tr	Tr
7	β -Phellandrène	mh	1028	1045	1,65 ± 0,01	1,99 ± 0,09	0,92 ± 0,07
8	1,8-cinéole	om	1030	1046	5,87 ± 0,02	7,50 ± 0,01	1,98 ± 0,10
9	γ -Terpinène	mh	1058	1060	Tr	Tr	0,39 ± 0,09
10	α -Thujone	om	1105	1105	-	-	Tr
11	Camphre	om	1144	1145	2,61 ± 0,01	2,58 ± 0,18	1,10 ± 0,05
12	Bornéol	om	1166	1166	Tr	Tr	0,37 ± 0,02
13	Terpinèn-4-ol	om	1178	1177	Tr	-	Tr
14	Pregeijerene B	om	1275	1276	-	-	Tr
15	Acétate de Bornyle	om	1288	1287	8,14 ± 0,02	8,35 ± 0,05	5,18 ± 0,12
16	α -Cubébène	sh	1351	1351	-	-	Tr
17	Isoledène	sh	1374	1374	-	-	Tr
18	α -Copaène	sh	1378	1376	Tr	Tr	0,37 ± 0,03
19	β -Bourbonène	sh	1387	1384	-	-	Tr
20	β -Cubébène	sh	1392	1388	-	-	Tr
21	α -Gurjunène	sh	1412	1408	1,01 ± 0,01	1,19 ± 0,03	1,08 ± 0,08
22	β-Caryophyllène	sh	1426	1417	16,75 ± 0,02	17,86 ± 0,07	15,65 ± 0,16
23	γ -Maaliène	sh	1432	1430	0,67 ± 0,01	Tr	0,65 ± 0,05
24	Calarène	sh	1436	1433	Tr	Tr	0,41 ± 0,07

25	α -Maaliène	sh	1438	1438	0,69±0,01	Tr	0,65±0,10
26	Aromadendrène	sh	1444	1441	5,39±0,01	5,30±0,05	4,90±0,08
27	Selina-5,11-diène	sh	1447	1445	Tr	-	0,54±0,10
28	α -Humulène	sh	1457	1452	0,92±0,01	0,95±0,05	0,94±0,07
29	9-épi-(E)-Caryophyllène	sh	1462	1464	-	-	0,35±0,04
30	allo-Aromadendrène	sh	1465	1467	2,02±0,01	1,98±0,18	1,63±0,02
31	γ -Muuroolène	sh	1479	1474	Tr	Tr	0,63±0,03
32	β -Sélinène	sh	1490	1489	Tr	-	0,33±0,05
33	Bicyclogermacrène	sh	1502	1499	3,65±0,01	4,15±0,08	5,02±0,12
34	γ -Cadinène	sh	1518	1511	1,28±0,01	1,22±0,04	1,45±0,04
35	δ -Cadinène	sh	1527	1519	1,98±0,01	2,11±0,02	1,84±0,14
36	Trans Cadi-1,4-diène	sh	1536	1527	-	-	Tr
37	α -Cadinène	sh	1541	1538	-	-	Tr
38	α -Calacorène	sh	1547	1542	-	-	Tr
39	Epiglobulol	os	1565	1554	Tr	-	0,36±0,05
40	Spathuléol	os	1586	1571	5,04±0,02	4,30±0,23	5,12±0,13
41	Oxide de Caryophyllène	os	1591	1582	3,26±0,01	3,02±0,02	2,94±0,09
42	Viridiflorol	os	1598	1592	Tr	Tr	0,57±0,04
43	Rosifoliol	os	1609	1603	0,65±0,01	Tr	0,82±0,05
44	γ-Eudesmol	os	1640	1630	6,27±0,02	5,93±0,15	7,43±0,04
45	T-Cadinol	os	1647	1645	2,68±0,02	2,47±0,18	3,23±0,15
46	β-Eudesmol	os	1663	1650	6,04±0,24	6,05±0,05	-
47	α-Eudesmol	os	1667	1652	11,41±0,27	9,86±0,24	21,47±0,20
48	Abiétatriène	dh	2064	2054	-	-	0,25±0,02
49	Ferruginol	od	2338	2332	-	-	0,19±0,03

Classe de composés	Parties aériennes	Feuilles	Tiges
Monoterpènes hydrocarbonés (mh)	12,08	13,73	3,93
Monoterpènes oxygénés (mo)	16,63	18,43	8,63
Sesquiterpènes hydrocarbonés (sh)	34,34	34,76	36,44
Sesquiterpènes oxygénés (so)	35,36	31,63	41,94
diterpènes hydrocarbonés (dh)	-	-	0,25
Diterpènes oxygénés (do)	-	-	0,19
Total identifié (%)	98,40	98,55	91,38

Tr : traces (< 0,1 %).

^a Composés répertoriés par ordre d'élution à partir de la colonne capillaire HP-5MS.

^b Indices de rétention relatifs aux n-alcane C8–C28 sur colonne capillaire HP-5MS.

^c Indices de rétention selon la littérature.

^d Les valeurs moyennes \pm écart-type de trois injections.

L'analyse des huiles essentielles révèle, d'une part, que la composition chimique est principalement constituée de monoterpènes (environ 12-32 %) et de sesquiterpènes (environ 66-78 %). D'autre part, les mêmes composés majeurs sont, globalement, présents dans les huiles essentielles des trois parties de *Salvia microphylla*. Ainsi, comme indiqué dans le tableau 3.1, la teneur en principaux composés présents dans les huiles essentielles des parties aériennes (A), des feuilles (B) et des tiges (C) (Appendice C1) est, respectivement, les monoterpènes 1,8-cinéole (5,87 %, 7,50 %, 1,98 %), acétate de bornyle (8,14 %, 8,35 %, 5,18 %) et les sesquiterpènes β -caryophyllène (16,75 %, 17,86 %, 15,65 %), aromadendrène (5,39 %, 5,30 %, 4,90 %), spathuléol (5,04 %, 4,30 %, 5,12 %), γ -eudesmol (6,27 %, 5,93 %, 7,43 %), β -eudesmol (6,04 %, 6,05 %, 0 %) et α -eudesmol (11,41 %, 9,86 %, 21,47 %). Il convient de souligner que les diterpènes (abiétatriène, ferruginol) ont été détectés uniquement dans l'huile essentielle des tiges avec un pourcentage faible (0,44 %). Par ailleurs, les sesquiterpènes présentent une teneur similaire dans les huiles essentielles des parties aériennes et des feuilles (environ 65 %), mais leur teneur atteint environ 80 % dans les tiges (figure 3.9). Il semble que les tiges favorisent la biosynthèse des sesquiterpènes, probablement en raison de leur exposition accrue au soleil.

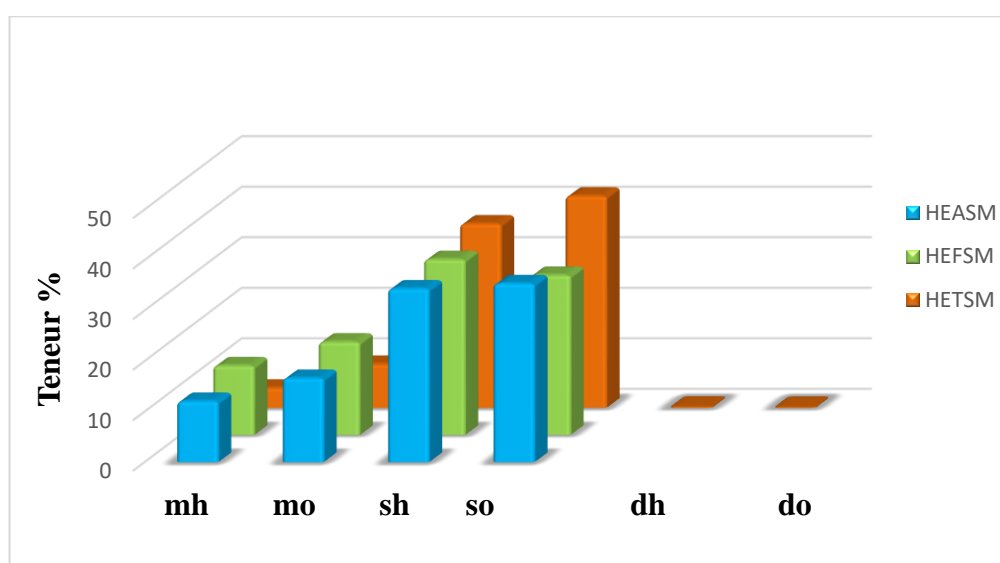


Figure 3.9 : Teneur des différentes classes chimiques des huiles essentielles de *Salvia microphylla*.

Les principaux composés sont présents dans presque toutes les parties de la plante, à l'exception du β -eudesmol qui est présent en proportion élevée dans les parties aériennes et les feuilles, mais complètement absent dans les tiges. Le β -caryophyllène et l' α -eudesmol sont les sesquiterpènes majeurs dans les trois huiles essentielles. Toutefois, la teneur en

β -caryophyllène est élevée dans les trois parties de la plante, tandis que l' α -eudesmol est présent à un pourcentage de 21,4 % dans les tiges, mais relativement faible dans les parties aériennes et les feuilles. Cette prédominance de l' α -eudesmol dans l'huile essentielle des tiges est qualitativement similaire aux données déjà publiées [326] pour les parties aériennes de *Salvia microphylla* provenant de Grèce, avec une teneur élevée en α -eudesmol (20,5 %), β -caryophyllène (13,7 %), γ -eudesmol (8,2 %), et spathuléol (7,0 %).

Les parties aériennes de *Salvia microphylla* récoltées en Italie [204] et en Tunisie [205] présentent des profils chimiques similaires avec notre huile essentielle, tout en montrant certaines variations intéressantes. Dans les trois Huiles, le β -caryophyllène se distingue comme l'un des principaux composants, représentant 16,75% dans notre échantillon et étant également dominant dans les huiles italiennes et tunisiennes avec 10,80% et 13,80%, respectivement. De même, le 1,8-cinéole est présent dans les espèces récolté en Italie et en Tunisie (8,43% et 11,25%, respectivement), bien qu'en proportions plus faibles dans notre échantillon (5,87%). L'acétate de bornyle, quant à lui, est présent dans l'huile essentielle de l'Italie (9.13%) et dans notre huile (8,14 %), mais il n'est pas signalé dans l'espèce tunisienne.

En ce qui concerne les eudesmols, notre échantillon montre des concentrations notables d' α -eudesmol (11,41 %), de β -eudesmol (6,04 %) et de γ -eudesmol (6,27 %), des composés également présents dans les échantillons tunisiens. Cependant, l'aromadendrène (5,39 %) et le spathuléol (5,04 %), identifiés dans notre huile, ne sont pas rapportés dans les huiles italiennes et tunisiennes. À l'inverse, le *cis-p*-menthan-3-one, présent dans l'échantillon tunisien, n'a pas été détecté dans notre analyse.

Notre étude de l'huile essentielle des feuilles de *Salvia microphylla* montre à la fois des similitudes et des divergences par rapport aux recherches précédentes menées au Brésil [202] et en Californie [203]. Par exemple, le β -caryophyllène est un composant majeur, représentant 17,86 % de notre échantillon, ce qui est comparable à la concentration de 15,35 % observée dans l'étude brésilienne. En revanche, l'acétate de bornyle, l'aromadendrène et le spathuléol, identifiés dans notre étude, ne sont pas mentionnés dans les travaux antérieurs, tandis que le guaiol, absent dans notre huile, est un composé majeur dans celle cultivée en Californie, où il atteint 24,6 %. De plus, bien que l' α -eudesmol soit présent dans toutes les études, sa concentration dans notre huile (9,86 %) est inférieure à celle rapportée en Californie (18 %) et au Brésil (14,06 %). Quant au 1,8-cinéole, il est détecté dans notre échantillon (7,50 %) ainsi qu'en Californie (6,2 %), mais est absent de l'huile brésilienne.

Enfin, l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle extraite des fleurs de *Salvia microphylla* en Italie [206] révèle un profil complètement différent, avec des composés majoritaires tels que le davana éther, l'hexahydrofarnésyl acétone, le carvacrol, le thymol et le 2, 6, 10, 14-tetraméthyl-7-(3-méthylpent-4-ényle) pentadécane. Ces différences rapportées dans les compositions des huiles essentielles sont probablement dues à plusieurs paramètres tels que l'origine de la matière, la période de récolte, la partie de la plante et la méthode d'isolement de l'huile essentielle.

Il est également important de noter que notre étude est la première à rapporter la composition chimique de l'huile essentielle extraite des tiges de *Salvia microphylla*. La comparaison de la composition des huiles essentielles de *Salvia microphylla*, étudiée pour la première fois en Algérie, avec les données de la littérature révèle une prédominance marquée du β -caryophyllène dans les échantillons analysés. Cette observation suggère que la biosynthèse de cette espèce favorise la production de β -caryophyllène, qui pourrait ainsi constituer un biomarqueur potentiel en chimiosystématique, ou être utilisé pour identifier le chémotype spécifique de cette espèce.

➤ *Salvia officinalis*

L'analyse par GC et GC-MS des huiles essentielles extraite à partir des parties aériennes (A), des feuilles (B) et des tiges (C) de *Salvia officinalis* a permis d'obtenir le chromatogramme représenté dans l'appendice (Appendice C2). Le tableau 3.3 présente la composition chimique détaillée des huiles essentielles de *Salvia officinalis*, incluant les indices de rétention et les pourcentages de chaque composé identifiés par (GC/FID).

Tableau 3.3 : Composition chimique des huiles essentielles isolées des parties aériennes, des feuilles et des tiges de *Salvia officinalis*.

N°	composés ^a	Classe	LRI _{cal} ^b	LRI _{Lit} ^c	compositions (%) ^d		
					Parties aériennes	Feuilles	Tiges
1	Cis-Salvène	mh	850	847	0,13±0,08	0,12±0,02	Tr
2	Tricyclène	mh	924	923	Tr	0,11±0,01	-
3	α -Thujène	mh	927	925	0,28±0,11	0,27±0,04	0,53±0,16
4	α -Pinène	mh	933	939	1,68 ±0,01	1,86±0,02	1,09±0,04
5	Camphène	mh	947	951	4,06 ±0,02	4,64±0,03	1,69±0,14
6	Sabinène	mh	973	973	0,17±0,23	0,11±0,01	0,68±0,34
7	β -Pinène	mh	976	978	2,14 ±0,01	1,98±0,03	2,52±0,54
8	β -myrcène	mh	992	992	1,70±0,02	1,83±0,13	1,10±0,37

9	α -Phellandrène	mh	1017	1017	0,12±0,01	0,15±0,01	-
10	α -Terpinène	mh	1026	1026	0,31±0,02	0,33±0,23	0,45±0,65
11	p-Cymène	mh	1028	1045	0,21±0,01	0,18±0,09	0,23±0,07
12	1,8-cinéole	om	1030	1046	12,78±0,02	13,76±0,01	11,71±0,10
13	γ -Terpinène	mh	1058	1060	0,71±0,07	0,68±0,01	1,03±0,09
14	Hydrate de cis-sabinène	om	1069	1070	0,21±0,01	0,13±0,06	0,48±0,06
15	α-Thujone	om	1105	1105	16,48±0,56	16,62±0,33	22,99±0,65
16	β-Thujone	om	1121	1117	5,18±0,14	4,62±0,01	10,38±0,05
17	Thujanol	om	1139	1134	1,11±0,08	1,26±0,04	0,65±0,01
18	Camphre	om	1144	1145	23,57 ±0,01	26,77±0,18	12,43±0,13
19	Trans 3-pinanone	om	1162	1158	0,17±0,23	0,12±0,01	0,43±0,23
20	Bornéol	om	1166	1166	2,53±0,23	2,78±0,28	0,80±0,02
21	Cis 3-pinanone	om	1175	1172	0,10±0,01	-	0,24±0,01
22	Terpinèn-4-ol	om	1178	1177	0,71±0,03	0,77±0,07	0,96±0,05
23	α -Terpinéol	om	1193	1190	0,52±0,06	0,55±0,08	0,34±0,01
24	Acétate de Bornyle	om	1288	1287	1,83±0,02	2,17±0,05	0,65±0,12
25	Acétate de sabinyle	sh	1295	1289	0,21±0,17	0,23±0,01	0,23±0,08
26	β -Caryophyllène	sh	1426	1417	3,79±0,02	3,56±0,07	2,71±0,16
27	α -Humulène	sh	1457	1452	3,12±0,01	2,58±0,05	3,47±0,07
28	allo-Aromadendrène	sh	1465	1467	0,15±0,01	0,14±0,18	0,16±0,02
39	Leden	sh	1500	1496	0,19±0,23	0,27±0,11	0,31±0,03
30	δ -Cadinène	sh	1527	1519	0,10±0,01	-	0,19±0,04
31	Oxide de Caryophyllène	os	1591	1582	0,48±0,01	0,39±0,02	0,29±0,09
32	Viridiflorol	os	1598	1592	8,28±0,27	6,83±0,09	8,28±0,04
33	β -Eudesmol	os	1663	1650	-	-	0,10±0,01
34	Manool	do	2070	2057	5,78±0,31	3,07±0,05	9,88±0,21
Classe de composés					Parties aériennes	Feuilles	Tiges
Monoterpènes hydrocarbonés (mh)					10,80	11,58	8,29
Monoterpènes oxygénés (mo)					65,90	70,23	63,09
sesquiterpènes hydrocarbonés (sh)					7,56	6,78	7,07
Sesquiterpènes oxygénés (so)					8,76	7,22	8,67
diterpènes hydrocarbonés (dh)					-	-	-
Diterpènes oxygénés (do)					5,78	3,07	9,88
Total identifié (%)					98,8	98,88	97,00

Tr : traces (< 0,1 %).

^a Composés répertoriés par ordre d'éluion à partir de la colonne capillaire HP-5MS.

^b Indices de rétention relatifs aux n-alcanes C8–C28 sur colonne capillaire HP-5MS.

^c Indices de rétention selon la littérature.

^d Les valeurs moyennes \pm écart-type de trois injections.

L'examen de la composition chimique des trois huiles essentielles de *Salvia officinalis* révèle l'identification de 33, 31 et 32 composés représentant 98,80 %, 98,88 % et 97,00 % de la composition totale des parties aériennes, feuilles et tiges, respectivement.

Les composés présents dans la plante se répartissent en plusieurs classes chimiques (figure 3.10), avec des pourcentages qui varient selon les parties analysées (parties aériennes, feuilles, tiges). Les monoterpènes hydrocarbonés constituent entre 8,29 % dans les tiges, 10,80 % dans les parties aériennes et 11,58 % dans les feuilles. En revanche, les monoterpènes oxygénés prédominent, avec des proportions allant de 63,09 % dans les tiges, 65,90 % dans les parties aériennes et 70,23 % dans les feuilles. Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont moins abondants, représentant respectivement 6,78 %, 7,07 % et 7,56 % dans les feuilles, les tiges et les parties aériennes. De même, les sesquiterpènes oxygénés varient entre 7,22 % dans les feuilles, 8,67 % dans les tiges et 8,76 % dans les parties aériennes. Enfin, les diterpènes oxygénés, tels que le manool, sont particulièrement concentrés dans les tiges (9,88%), tandis qu'ils sont moins présents dans les parties aériennes (5,78%) et les feuilles (3,07%). Dans l'ensemble, les monoterpènes constituent la majorité des composés dans les trois parties de la plante.

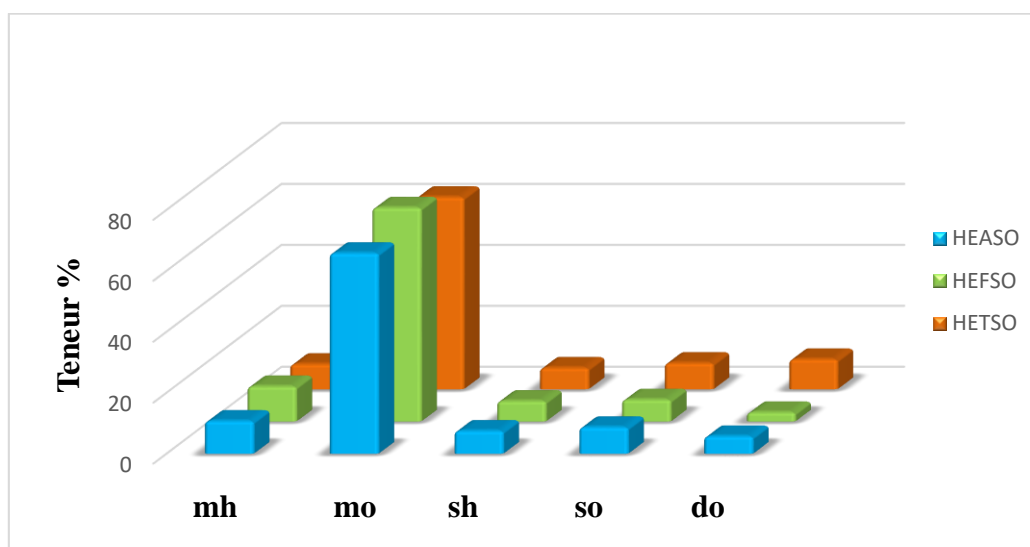


Figure 3.10 : Teneur des différentes classes chimiques des huiles essentielles de *Salvia officinalis*.

Le tableau révèle que les composés prédominants dans les parties aériennes, les feuilles et les tiges de la plante sont le camphre, l' α -thujone, le 1,8-cinéole, la β -thujone, le viridiflorol et le manool. Le camphre est particulièrement abondant dans les feuilles (26,77 %), suivi des parties aériennes (23,57 %) et des tiges (12,43 %). L' α -thujone figure également parmi les constituants majeurs, surtout dans les tiges (22,99 %), avec des

concentrations légèrement inférieures dans les parties aériennes (16,48 %) et les feuilles (16,62 %). Le 1,8-cinéole est présent en grande quantité dans les feuilles (13,76 %), les parties aériennes (12,78 %) et les tiges (11,71 %). Les tiges et les parties aériennes se démarquent par une teneur élevée en β -thujone (10,38 % et 5,18 %, respectivement) ainsi qu'en manool (9,88 % et 5,78 %, respectivement). Le viridiflorol affiche des concentrations élevées dans les parties aériennes et les tiges (8,28 %), bien que sa présence soit légèrement inférieure dans les feuilles (6,83 %).

En ce qui concerne les composés mineurs, certains comme le cis-salvène, le tricyclène, le sabinène, l' α -terpinène, l'oxyde de caryophyllène et le δ -cadinène sont présents en très faibles quantités, inférieures à 1 %, dans toutes les parties de la plante. En outre, on observe une certaine variabilité dans les monoterpènes et les sesquiterpènes, avec des composés tels que l' α -pinène, le β -pinène, le camphène, le γ -terpinène, le β -caryophyllène et l' α -humulène montrant de légères variations selon les différentes parties de la plante.

Il est largement établi dans la littérature que, quelle que soit la méthode d'extraction, la partie de la plante utilisée ou la source de récolte, l'huile essentielle de *Salvia officinalis* est dominée par des composés monoterpéniques oxygénés [223, 327-331].

Comparée aux huiles essentielles de *Salvia officinalis* décrites dans la littérature, la composition de notre huile, obtenue à partir des parties aériennes et des tiges, se révèle similaire à celle des espèces collectées à El Hamma [216], Alger [217] et en Tunisie [207], notamment en termes de pourcentages des composés majeurs tels que le camphre, l' α -thujone et le 1,8-cinéole. Cependant, l'espèce récoltée à El Hamma se distingue par la présence de β -caryophyllène (6,01%) et l'oxyde de caryophyllène (6,07%). De plus, la composition chimique de l'huile obtenue à partir des tiges se rapproche fortement de celle des espèces récoltées en Algérie [215, 220, 221], au Liban [211], en Iran [212] et en Serbie [213], caractérisées principalement par la prédominance de l' α -thujone, du 1,8-cinéole et du camphre. Cependant, une exception remarquable est observée dans les huiles essentielles de *Salvia officinalis* originaires des régions de Tizi-Ouzou (Kabylie) et de Bouira. L'huile essentielle extraite à Tizi-Ouzou se distingue par la présence de 21 composés, où l'Azulène prédomine avec une concentration de 30,6 %, suivi du Sabinène (7,88 %) et du Camphène (4,14 %) [332]. En revanche, l'huile essentielle provenant de Bouira renferme 23 composés, majoritairement constituée d'acétate de cis-chrysanthényle (64,82 %) et d' α -thujone (14,7 %) [223].

Certaines études ont révélé la présence de composants majoritaires différents dans les huiles essentielles. Les espèces récoltées à Mascara [219] et à Constantine [222] se

distinguent par la présence de composés spécifiques tels que le β -caryophyllène et le β -selinène, qui ne sont pas détectés dans les huiles analysées dans notre étude.

Des différences notables se manifestent avec des composés tels que le β -pinène et le camphène, qui ne sont présents que dans les huiles essentielles extraites de l'espèce récoltée en Italie [208], respectivement à des concentrations de 6,27 % à 7,53 % pour le β -pinène et 9,14 % pour le camphène, ainsi que dans celles d'Allemagne [214], à des taux de 5,26 % et 6,54 %. Par ailleurs, le bornéol (8,47 %) et l' α -humulène (8,21 %) sont également présents dans l'espèce d'origine allemande [214]. En outre, l'espèce récoltée au Maroc [333] se distingue par la présence notable de la naphthalénone (20,81 %), ainsi que par une composition marquée en sesquiterpènes, notamment le β -caryophyllène (9,61 %), l' α -humulène (8,34 %) et l'éremophilène (8,37 %).

Les différences observées dans la composition des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* dans notre étude par rapport à d'autres recherches peuvent probablement être expliquées par plusieurs facteurs, tels que l'origine des espèces, la période de récolte, la partie de la plante utilisée [334], ainsi que la méthode d'extraction de l'huile essentielle [335].

3.2.2 Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles des deux espèces étudiées

3.2.2.1 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles extraites par hydrodistillation des parties aériennes, des feuilles et des tiges de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a été déterminée par six méthodes complémentaires, à savoir le test de piégeage des radicaux libres DPPH, le test de piégeage de l'ABTS⁺, le test de capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC), le pouvoir réducteur du fer (FRAP), le test de blanchissement du β -carotène et la méthode de Phénanthroline.

Les résultats de l'activité antioxydante sont exprimés en termes d'IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$), A_{0.5} ($\mu\text{g/mL}$) et sont présentés dans le tableau 3.4.

Pour le test CUPRAC (tableau 3.5, figure 3.11 et figure 3.12), la meilleure A_{0.5} a été observée pour l'huile essentielle des tiges de *Salvia microphylla* (A_{0.5} : 7,72 \pm 0,43 $\mu\text{g/mL}$), cette activité enregistrée étant très proche de celle du BHA (A_{0.5} : 5,35 \pm 0,71 $\mu\text{g/mL}$) et supérieure à celle de l' α -tocophérol et du BHT (A_{0.5} : 19,92 \pm 1,46 $\mu\text{g/mL}$ et 8,97 \pm 3,94 $\mu\text{g/mL}$, respectivement). Elle est suivie par l'huile obtenue des parties aériennes (A_{0.5} : 472,02 \pm 5,18 $\mu\text{g/mL}$) et l'huile essentielle des feuilles (A_{0.5} : 504,80 \pm 6,06 $\mu\text{g/mL}$).

Les valeurs d'activité obtenues par le test CUPRAC différaient de celles mesurées par le test de piégeage des radicaux libres DPPH, le test de piégeage de l'ABTS^{•+}, le pouvoir réducteur du fer (FRAP), le test de blanchissement du β -carotène ainsi que la méthode de Phénanthroline. Selon les résultats issus de ces méthodes, les huiles essentielles extraites des trois parties de *Salvia microphylla* ont révélé une faible activité antioxydante.

Les huiles essentielles extraites des différentes parties de *Salvia officinalis* (parties aériennes, feuilles et tiges) n'ont révélé aucune activité antioxydante aux concentrations testées dans les divers tests effectués.

Les résultats obtenus pour l'huile essentielle des feuilles sont cohérents avec les études antérieures, qui ont montré que l'huile essentielle extraite des feuilles de *Salvia microphylla* récoltées au Brésil ne présentait pas d'activité dans le test DPPH [202]. Cependant, une activité antioxydante a été observée dans le test de blanchiment du β -carotène, avec une IC₅₀ de 770 μ g/ml [202]. Les deux méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle des feuilles de *Salvia microphylla* ont révélé des niveaux d'efficacité variables.

Le test CUPRAC a mis en évidence une activité antioxydante notable (A_{0.5} : 504,80 \pm 6,06 μ g/mL) pour notre huile, tandis que le test de blanchiment du β -carotène a montré une activité modérée pour l'huile brésilienne. Cette divergence de résultats pourrait refléter les différences de mécanismes d'action entre les deux tests.

Des études menées sur les parties aériennes de *Salvia microphylla* récoltée en Tunisie ont révélé que l'huile essentielle possède une activité antioxydante faible, comme l'ont démontré les trois tests utilisés : le test au DPPH (IC₅₀ : 1120 μ g/ml), le test du pouvoir réducteur (IC₅₀ : 1420 μ g/ml) et le test de chélation des ions ferreux (IC₅₀ : 1620 μ g/ml) [205]. Nos résultats indiquent que le test CUPRAC révèle une activité antioxydante plus élevée que les tests précédents tels que DPPH, pouvoir réducteur et chélation des ions ferreux, qui avaient montré une activité plus faible. Cela suggère que le test CUPRAC est plus sensible pour évaluer l'activité antioxydante de l'huile des parties aériennes.

Tableau 3.4 : Activités antioxydantes des huiles essentielles des parties aériennes, des feuilles et des tiges de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

Échantillons	DPPH		ABTS		CUPRAC		FRAP		β-carotène		Phén	
	IP (%)	IC ₅₀ µg/mL	IP (%)	IC ₅₀ µg/mL	IP (%)	A _{0.50} µg/mL	IP (%)	A _{0.50} µg/mL	IP (%)	IC ₅₀ µg/mL	IP (%)	A _{0.50} µg/mL
HEASM	16,11±5,34	>800	12,83±1,32	>800	0,72±0,07	472,02±5,18	0,14±0,03	>200	4,03±7,46	>800	0,30±0,02	>200
HEFSM	16,51±0,26	>800	10,01±0,11	>800	0,69±0,03	504,80±6,06	NA	>200	4,01±2,89	>800	NA	>200
HETSM	26,82±1,15	>800	21,21±1,31	>800	3,25±0,07	7,72 ± 0,43	NA	>200	19,27±1,54	>800	NA	>200
HEASO	6,40±8,55	>800	15,51±0,80	>800	0,32±0,00	>800	0,12±0,02	>200	5,04±3,43	>800	0,25±0,00	>200
HEFSO	3,44±1,52	>800	4,98±0,91	>800	0,30±0,00	>800	NA	>200	1,29±3,32	>800	NA	>200
HETSO	2,10±2,82	>800	3,30±2,04	>800	0,39±0,04	>800	NA	>200	17,72±3,01	>800	NA	>200
BHA	90,14±0,00	6,14±0,41	95,86±0,10	1,81±0,10	3,92±0,13	5,35±0,71	NT	NT	99,66±0,52	1,05±0,03	2,10±0,05	0,93±0,07
BHT	95,02±0,23	12,99±0,41	96,68±0,39	1,29±0,30	3,38±0,13	8,97±3,94	NT	NT	95,58±0,19	0,91±0,01	3,48±0,03	2,24±0,17
α-Tocophérol	89,52±0,33	13,02±5,17	NT	NT	1,85 ± 0,19	19,92±1,46	1,81±0,09	34,93±2,38	NT	NT	NT	NT
Acide ascorbique	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1,44±0,21	6,77±1,15	NT	NT	NT	NT
Acide tannique	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1,02±0,13	5,39±0,91	NT	NT	NT	NT

IP : Pourcentage d'inhibition à une concentration finale de 800 µg/mL pour DPPH^{*}, ABTS⁺, CUPRAC, β-carotène et 200 µg/mL pour FRAP, Phénanthroline dans le puits ;

Les valeurs **IC₅₀** et **A_{0.50}** sont définies comme la concentration d'inhibition de 50 % et la concentration à l'absorbance 0,50, respectivement ;

IC₅₀ et **A_{0.50}** ont été calculés par analyse de régression linéaire et exprimés en moyenne ± écart type de trois mesures parallèles ;

BHA : butylatedhydroxyanisole, **BHT** : butylatedhydroxytoluene ;

NA : pas d'absorbance ;

NT : non testé.

Tableau 3.5 : Inhibition du CUPRAC par les huiles essentielles de *Salvia microphylla*.

Absorbances dans la méthodes CUPRAC								
	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL	800 µg/mL	A_{0,50} µg/mL
HEASM	0,18±0,01	0,19±0,01	0,21±0,00	0,23±0,00	0,30±0,01	0,46±0,02	0,72±0,07	472,02±5,18
HEFSM	0,19±0,02	0,19±0,00	0,21±0,01	0,23±0,01	0,29±0,01	0,44±0,00	0,69±0,03	504,80±6,06
HETSM	0,69±0,04	0,69±0,02	0,70±0,03	0,73±0,03	0,91±0,01	1,08±0,04	3,25±0,07	7,72 ± 0,43
BHA	1,12±0,05	1,95±0,31	3,14±0,46	3,58±0,42	3,35±0,20	3,77±0,19	3,92±0,13	5,35±0,71
BHT	1,41±0,03	2,22±0,05	2,42±0,02	2,50±0,01	2,56±0,05	2,86±0,07	3,38±0,13	8,97±3,94

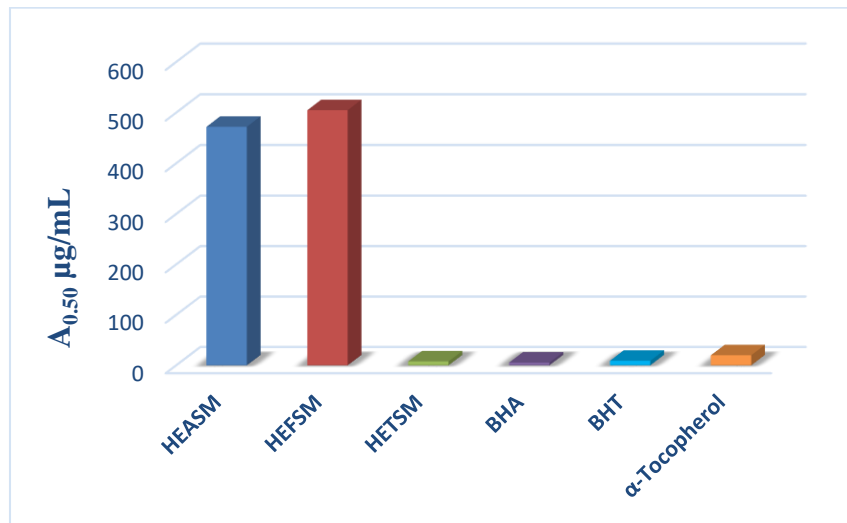


Figure 3.11 : Capacité antioxydant (A_{0.5}) par réduction du cuivre (CUPRAC) pour les huiles essentielles de *Salvia microphylla*.

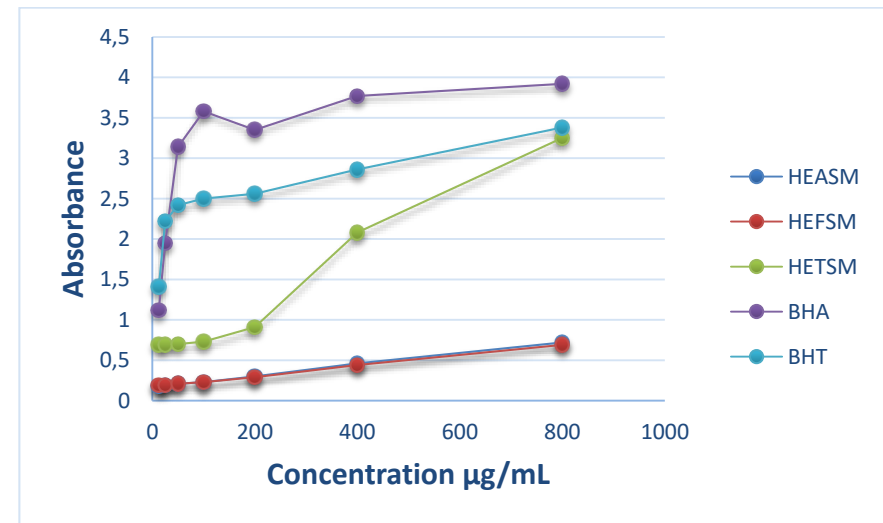


Figure 3.12 : Variation de l'absorbance en fonction de concentration des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et des standards dans le test de CUPRAC.

L'activité antioxydante des huiles essentielles extraites des tiges de *Salvia microphylla* n'a pas encore été documentée dans la littérature. Nos résultats révèlent que les tiges présentent une activité antioxydante supérieure selon le test CUPRAC ($A_{0.5}$: $7,72 \pm 0,43\mu\text{g/mL}$). Ces données constituent donc une nouvelle contribution précieuse, mettant en évidence que cette partie de la plante possède une activité antioxydante particulièrement élevée.

Le test de piégeage du DPPH n'est pas applicable pour l'évaluation des activités antioxydantes des huiles essentielles, en raison de la faible solubilité de ces huiles dans le milieu DPPH [202, 336]. Les activités antioxydantes des sesquiterpènes (composés majoritaires dans *Salvia microphylla*), tels que les hydrocarbures sesquiterpéniques β -caryophyllène, aromadendrène et α -Humulène, ainsi que des sesquiterpènes oxygénés α -eudesmol, γ -eudesmol et l'oxyde de caryophyllène, étaient significativement plus faibles que celles de certains monoterpènes monocycliques (composés mineurs dans *Salvia microphylla*). Globalement, les alcools cycliques, y compris le globulol, l' α -terpinéol et le terpin-4-ol, ont une activité antioxydante plus faible que celle des alcools acycliques, tels que, le nérol et le géraniol [337]. Par conséquent, l'activité significative observée pour l'échantillon des tiges de *Salvia microphylla* lors du test CUPRAC, en comparaison avec les autres échantillons, semble résulter principalement de la présence de Calarène ($0,41\pm 0,07$), un composé détecté uniquement dans les tiges, reconnu pour ses propriétés antioxydantes intéressantes [337]. De plus, cette activité pourrait être amplifiée par des interactions synergiques entre les constituants majeurs et mineurs [102].

En conclusion, le test CUPRAC se révèle être un outil plus efficace pour évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Salvia microphylla*, en raison de sa capacité à réduire le complexe cuivre (II) néocuproïne. Ces résultats indiquent que l'activité antioxydante des parties aériennes, des feuilles et des tiges de *Salvia microphylla* est principalement liée à un mécanisme de transfert d'électrons.

Contrairement à nos résultats, de nombreuses études rapportées dans la littérature ont démontré que les huiles essentielles de *Salvia officinalis* possèdent une activité antioxydante significative [215, 216, 218, 221-223].

3.2.2.2 Activité anticholinestérase

Les études précédentes sur les espèces de *Salvia* ont montré que les huiles essentielles sont utilisées traditionnellement pour divers troubles du système nerveux et qu'elles ont des effets thérapeutiques potentiels sur l'humeur et les fonctions cognitives grâce à l'inhibition du cholinestérase, ce qui pourrait être attribué aux terpènes [285, 338, 339]. L'activité anticholinestérase des huiles essentielles provenant de différentes parties (parties aériennes, feuilles et tiges) de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a été testée en utilisant une combinaison de deux méthodes complémentaires : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Les résultats d'inhibition de l'AChE et de la BChE, exprimés en pourcentage d'inhibition et en IC₅₀, sont présentés dans les tableaux 3.6 et 3.7, respectivement.

Dans le test d'inhibition de l'AChE (figure 3.13 et 3.14), l'huile essentielle des parties aériennes de *Salvia microphylla* a montré l'activité inhibitrice la plus élevée (IC₅₀ : 23,65 ± 0,73 µg/mL), avec une activité proche de celle du galantamine standard (IC₅₀ : 6,27 ± 1,15 µg/mL), suivie par l'huile essentielle des feuilles (IC₅₀ : 125,56 ± 0,32 µg/mL) et l'huile essentielle des tiges (IC₅₀ : 159,28 ± 2,13 µg/mL). En ce qui concerne *Salvia officinalis*, les huiles essentielles issues des différentes parties de la plante ont révélé des activités inhibitrices variables contre l'acétylcholinestérase (AChE). L'huile de la partie aérienne a montré une inhibition plus importante (IC₅₀ : 85,92 ± 4,82 µg/mL) par rapport aux tiges (IC₅₀ : 180,73 ± 1,00 µg/mL), mais reste moins efficace que la galantamine. Quant à l'huile essentielle extraite des feuilles, elle n'a pas montré d'activité anticholinestérase significative aux concentrations testées.

Les résultats obtenus pour l'huile des feuilles de *Salvia microphylla* sont en bon accord avec ceux de l'huile essentielle de *Salvia pseudeuphratica*, qui présente un IC₅₀ de 26,00 ± 2,00 µg/mL pour l'AChE [340]. Bien qu'il s'agisse de la première étude rapportant l'activité anticholinestérase des huiles essentielles de *Salvia microphylla*, des études antérieures indiquent que les huiles essentielles d'autres espèces du genre *Salvia* ont également montré une inhibition significative de l'AChE [10, 16, 17, 100, 341- 344].

Tableau 3.6 : Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

	% Inhibition de l'acétylcholinestérase							IC ₅₀ µg/mL
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	
HEASM	15,41±2,59	25,78±1,86	37,70±1,29	54,77±2,34	80,38±3,15	NT	NT	23,65±0,73
HEFSM	NA	NA	NA	NA	20,93±2,53	36,51±2,10	72,72±2,24	125,56±0,32
HETSM	NA	NA	NA	NA	26,77±3,98	47,25±3,29	56,81±1,02	159,28±2,13
HEASO	NA	NA	NA	4,63±0,48	29,13±1,19	53,48±4,20	81,75±1,45	85,92±4,82
HEFSO	NA	NA	NA	NA	3,68±1,58	20,68±0,43	42,58±1,65	>200
HETSO	NA	NA	NA	NA	23,00±2,87	43,40±2,75	50,97±0,72	180,73±1,00
Galantamine	35,93±2,28	43,77±0,00	68,50±0,31	80,69±0,41	85,78±1,63	91,80±0,2	94,77±0,34	6,27±1,15

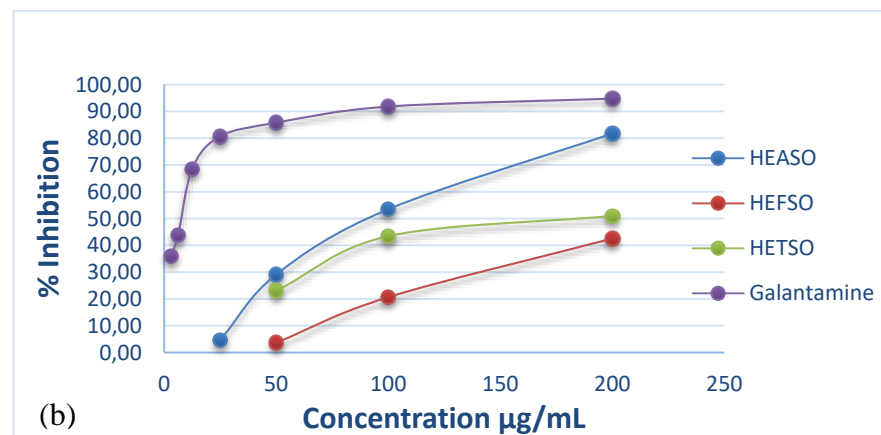
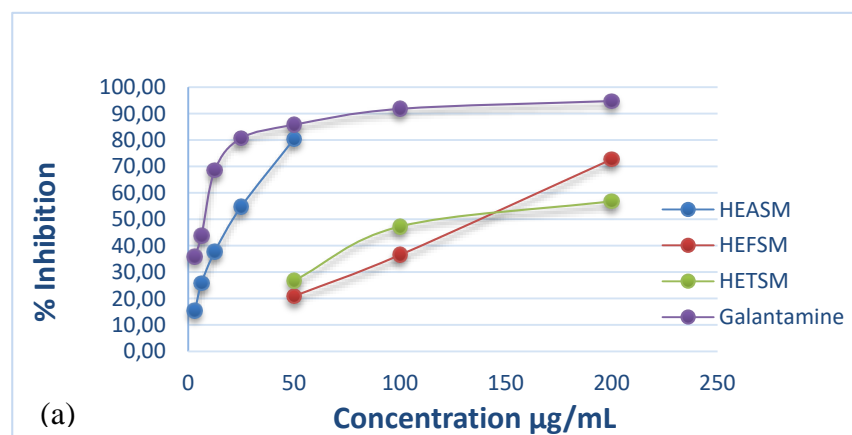


Figure 3.13 : Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de *Salvia microphylla* (a) et *Salvia officinalis* (b).

Les huiles essentielles extraites des parties aériennes de *Salvia officinalis* provenant du Portugal et de l'espèce colombienne ont montré une activité inhibitrice de l'AChE comparable à celle observée dans notre étude (IC_{50} : $85,92 \pm 4,82 \mu\text{g/mL}$), avec des valeurs d' IC_{50} respectives de $50,8 \pm 3,80 \mu\text{g/mL}$ et $78 \mu\text{g/mL}$. [345, 346]. En revanche, par rapport aux parties aériennes de *Salvia officinalis* cultivées en Espagne, nos résultats (IC_{50} : $85,92 \pm 4,82 \mu\text{g/mL}$) s'avèrent plus prometteurs que ceux rapportés par Cutillas et ses collègues [284], qui ont trouvé des IC_{50} variant entre $326,7 \pm 24,8 \mu\text{g/mL}$ et $867,4 \pm 82,3 \mu\text{g/mL}$ pour les quatre huiles essentielles. De plus, les huiles essentielles extraites des parties aériennes de *Salvia officinalis* récoltées dans trois zones distinctes du sud de l'Italie ont démontré une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase particulièrement intéressante, avec des valeurs d' IC_{50} comprises entre 47,68 et 77,51 $\mu\text{g/mL}$.

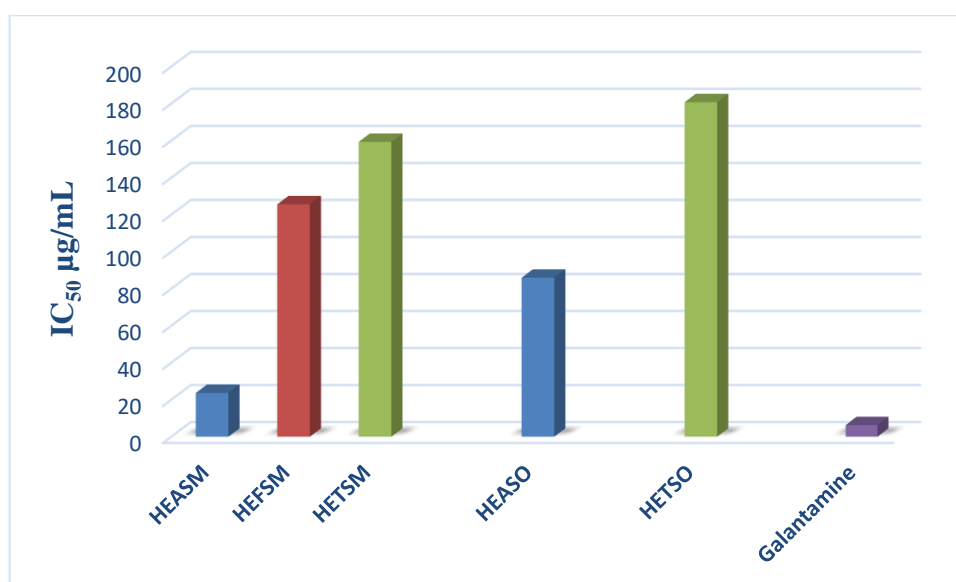


Figure 3.14 : Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (IC_{50}) des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

En ce qui concerne les feuilles, l'huile essentielle de *Salvia officinalis* cultivée en Tunisie a révélé une activité significative contre l'AChE, avec une valeur d' IC_{50} de $38,71 \pm 2,09 \mu\text{g/mL}$. Ce résultat est meilleur que celui de notre étude, où l' IC_{50} est supérieur à 200 $\mu\text{g/mL}$ [16].

Par ailleurs, d'autres recherches ont rapporté que l'huile essentielle de *Salvia officinalis* originaire de Turquie présentait un taux d'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) de 63,8% à une concentration de 1000 $\mu\text{g/mL}$ [347]. En comparaison, un taux d'inhibition de 46,4 % à une concentration de 500 $\mu\text{g/mL}$ a été rapporté pour des huiles essentielles de *Salvia officinalis* récoltées au Portugal [348]. Ces résultats

diffèrent considérablement des nôtres, obtenus à une concentration de 200 µg/mL, où des pourcentages d'inhibition de l'AChE beaucoup plus élevés ont été observés : $81,75 \pm 1,45$ % pour les parties aériennes, $42,58 \pm 1,65$ % pour les feuilles, et $50,97 \pm 0,72$ % pour les tiges.

Les recherches ont montré que l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) par l'huile essentielle de *Salvia officinalis* est fortement influencée par sa concentration en camphre. En effet, les huiles essentielles à forte concentration en camphre inhibent plus efficacement l'AChE que celles ayant une faible teneur en ce composé [340, 343]. En conséquence, l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Salvia officinalis* pourrait être idéale pour l'inhibition de l'AChE (IC_{50} : $85,92 \pm 4,82$ µg/mL) en raison de son taux élevé de camphre (23,57 %) par rapport à l'huile essentielle extraite des tiges, qui en contient moins de camphre (12,43 %), et montre donc une inhibition moins prononcée (IC_{50} : $180,73 \pm 1,00$ µg/mL). Ces résultats montrent que le camphre pourrait être responsable de l'effet inhibiteur sur l'enzyme AChE.

Malgré la concentration particulièrement élevée en camphre ($26,77 \pm 0,18$ %) dans l'huile essentielle des feuilles de *Salvia officinalis*, cette abondance ne se traduit pas par une inhibition significativement plus importante de l'acétylcholinestérase (AChE), avec un $IC_{50} > 200$ µg/mL, comparée à d'autres parties de la plante. Cette faiblesse d'inhibition pourrait être attribuée à des interactions antagonistes entre les composants de l'huile essentielle des feuilles, en particulier le camphre et le 1,8-cinéole. Il est également plausible que la combinaison de camphre et de 1,8-cinéole puisse induire des effets synergiques ou antagonistes sur l'inhibition enzymatique, comme le suggèrent des études antérieures [340,349].

Les huiles essentielles extraites des parties aériennes et des feuilles de *Salvia microphylla* contiennent des teneurs similaires de camphre (2,61 % et 2,58 %, respectivement). Cependant, les parties aériennes présentent une inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) beaucoup plus efficace, avec un IC_{50} de 23,65 µg/mL, comparé à 125,56 µg/mL pour les feuilles. En revanche, les tiges, qui ont la concentration la plus faible en camphre (1,10 %), montrent la plus faible efficacité d'inhibition avec un IC_{50} de 159,28 µg/mL, indiquant qu'elles sont les moins performantes dans cette activité. Bien que les feuilles contiennent une forte concentration en camphre, leur inhibition de l'AChE est beaucoup moins marquée que celle des parties aériennes, suggérant que d'autres composés présents dans l'huile essentielle pourraient également contribuer à l'inhibition de

l'AChE. Ainsi, le camphre est un facteur important mais pas le seul déterminant de l'activité inhibitrice.

Svaley et al. [343] ont signalé que les espèces de *Salvia* riches en 1,8-cinéole, mais pas en camphre, peuvent fournir des huiles aux activités cholinergiques plus puissantes. Les résultats de notre étude sur deux espèces du genre *Salvia* montrent que les huiles essentielles de *Salvia microphylla*, riches en 1,8-cinéole, exercent un effet inhibiteur plus marqué sur l'activité du cholinestérase par rapport à celles de *Salvia officinalis*, dont la teneur en camphre est plus élevée.

La figure 3.15 et 3.16 illustre l'effet inhibiteur des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* sur la butyrylcholinestérase. Les huiles essentielles provenant des tiges ($IC_{50} : 37,07 \pm 1,44 \mu\text{g/mL}$) ont montré l'activité inhibitrice la plus élevée contre la butyrylcholinestérase (BChE), similaire à celle de la galantamine ($IC_{50} : 34,75 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$), suivies des huiles essentielles des feuilles et des parties aériennes ($IC_{50} : 48,54 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$ et $69,65 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$, respectivement).

Concernant *Salvia officinalis*, les huiles essentielles extraites des feuilles et des tiges présentent une activité modérée d'inhibition de la butyrylcholinestérase (BChE), avec des valeurs IC_{50} de $180,99 \pm 9,23 \mu\text{g/mL}$ et $187,34 \pm 1,39 \mu\text{g/mL}$, respectivement. Ces valeurs indiquent que ces huiles ont une activité inhibitrice notable, bien que leur efficacité soit nettement inférieure à celle de la galantamine, dont l' IC_{50} est de $34,75 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$. En revanche, l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Salvia officinalis* n'a montré aucune activité significative contre la butyrylcholinestérase à toutes les concentrations testées, suggérant que son potentiel d'inhibition de la BChE est limité dans les conditions expérimentales utilisées.

Tableau 3.7 : Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

	% Inhibition de de la butyrylcholinestérase							
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
HEASM	9,50±2,88	12,21±2,19	20,40±0,35	27,81±0,81	42,21±1,38	59,41±0,23	65,82±1,50	69,65±0,87
HEFSM	8,37±3,95	13,04±3,92	27,93±8,31	35,59±0,25	50,57±0,63	58,85±1,19	66,87±3,61	48,54±0,67
HETSM	11,99±5,96	16,81±3,06	23,50±2,31	41,45±1,49	60,23±1,63	70,87±0,75	78,41±0,68	37,07±1,44
HEASO	12,91±0,46	14,65±4,72	16,06±3,45	19,75±2,76	31,63±3,22	33,15±3,22	43,19±1,50	>200
HEFSO	NA	7,64±2,06	12,36±1,19	18,36±3,34	30,36±3,09	33,33±0,58	52,27±5,01	180,99±9,23
HETSO	NA	NA	4,91±1,80	16,55±0,26	23,82±1,80	36,27±0,56	51,18±1,93	187,34±1,39
Galantamine	3,26± 0,62	6,93± 0,62	24,03±2,94	45,13± 2,60	63,87± 2,85	73,57± 0,77	78,95±0,58	34,75±1,99

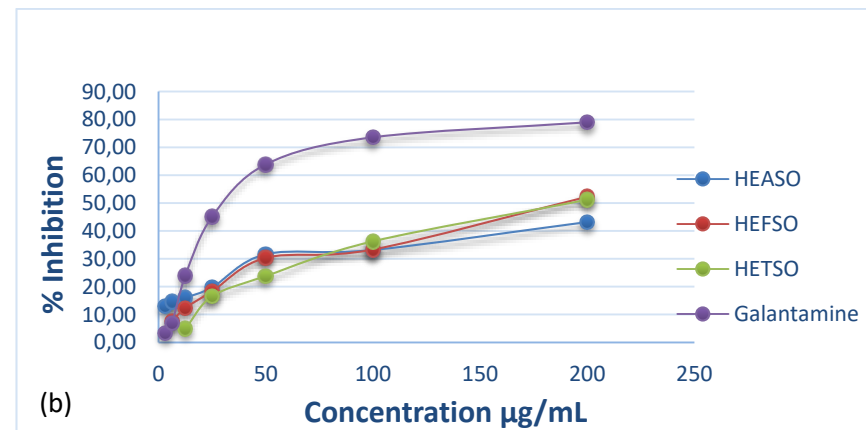
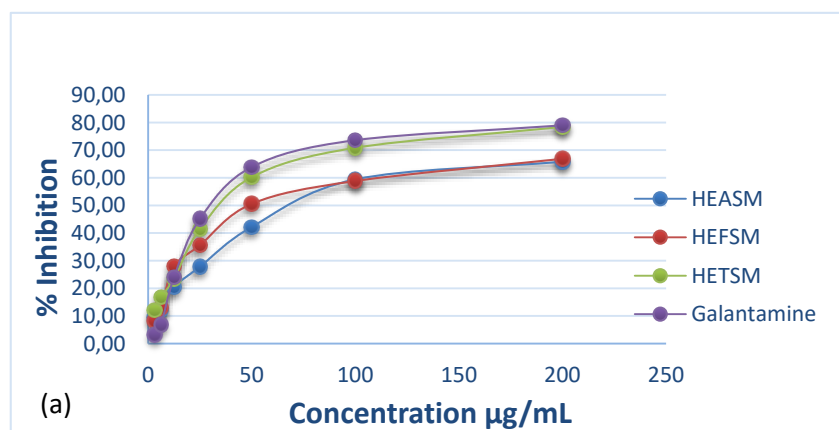


Figure 3.15 : Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de *Salvia microphylla* (a) et *Salvia officinalis* (b).

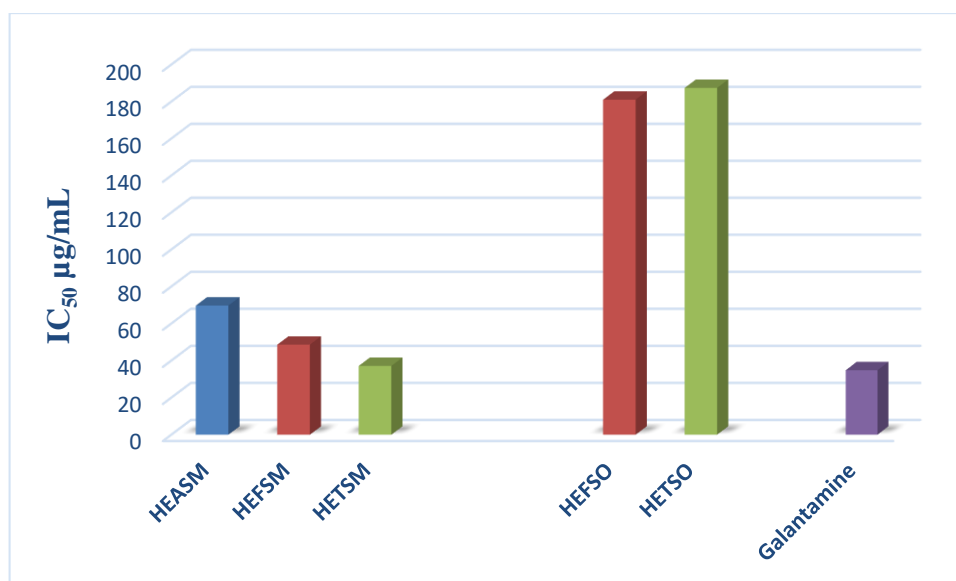


Figure 3.16: Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (IC₅₀) des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

Par rapport aux études précédentes, l'activité d'inhibition de la BChE de *Salvia microphylla* était similaire ou supérieure à celle des autres espèces de *Salvia* rapportées dans la littérature [100, 340, 341, 344, 350].

Des auteurs ont également montré que l'huile essentielle de *Salvia officinalis* présente une inhibition de 66,3 % de la BChE à une concentration de 1000 µg/mL, ce qui concorde en grande partie avec nos résultats [347]. En revanche, les huiles essentielles extraites des parties aériennes de *Salvia officinalis* récoltées dans trois régions distinctes du sud de l'Italie ont démontré une activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase nettement plus significative que celle que nous avons obtenue, avec des valeurs d'IC₅₀ allant de 33,13 µg/mL à 70,94 µg/mL [208].

Certaines études ont rapporté que le 1,8-cinéole a un effet inhibiteur sur l'activité BChE (IC₅₀: 0,93 mM). Cependant, le camphre n'a pas montré d'effet inhibiteur même à la concentration testée la plus élevée (10 mM) [340, 351]. Il est intéressant de noter que Bonesi et ses collègues [352] ont observé une activité sélective du trans-caryophyllène contre la BChE, avec une IC₅₀ de 78,6 µg/mL. D'après la littérature et les résultats obtenus, le β-caryophyllène, principal composant de *Salvia microphylla*, semble jouer un rôle crucial dans l'activité inhibitrice des huiles essentielles de cette plante. Ces huiles essentielles montrent une action plus marquée contre la BChE par rapport à celles de *Salvia officinalis*. Il est également probable que le 1,8-cinéole contribue à l'effet inhibiteur des huiles essentielles de *Salvia officinalis* sur la BChE. En outre, l'huile essentielle extraite des tiges

de *Salvia microphylla* présente une inhibition plus significative que celles issues des parties aériennes ou des feuilles, malgré une teneur en β -caryophyllène légèrement inférieure dans les tiges (15,65 %) par rapport aux parties aériennes (16,75 %) et aux feuilles (17,86 %). Le haut niveau d'inhibition de la BChE par l'huile essentielle des tiges est probablement dû à des interactions chimiques synergiques entre les composants de cette huile essentielle [340, 349]. Ces résultats pourraient justifier l'utilisation traditionnelle des huiles essentielles de *Salvia* pour les troubles de la mémoire.

3.2.2.3 Activité inhibitrice de l' α -glucosidase

Le diabète est l'une des maladies les plus courantes dans le monde. L' α -glucosidase est une enzyme clé responsable du catabolisme des glucides, l'inhibition de son activité joue un rôle essentiel dans la réduction du taux de glycémie et représente l'une des approches thérapeutiques de la lutte contre le diabète de type 2. Dans ce travail, nous avons étudié l'effet inhibiteur des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* sur l' α -glucosidase. Les effets inhibiteurs de l' α -glucosidase des huiles essentielles provenant de différentes parties des deux espèces sont présentés dans le tableau 3.8 et figure 3.17.

A l'exception de l'huile essentielle provenant des feuilles de *Salvia officinalis* (IC_{50} : $363,06 \pm 7,88$ $\mu\text{g/mL}$), toutes les huiles essentielles extraites des parties aériennes, des feuilles et des tiges des deux espèces ont montré une activité inhibitrice de l' α -glucosidase supérieure à celle de l'acarbose (IC_{50} : $275,43 \pm 1,59$ $\mu\text{g/mL}$). L'huile essentielle la plus active est celle obtenue à partir des tiges de *Salvia microphylla* (IC_{50} : $19,36 \pm 2,35$ $\mu\text{g/mL}$), suivie de celle des parties aériennes (IC_{50} : $41,34 \pm 1,79$ $\mu\text{g/mL}$) et des feuilles (IC_{50} : $50,25 \pm 1,75$ $\mu\text{g/mL}$). En revanche, les huiles essentielles extraites des parties aériennes et des tiges de *Salvia officinalis* ont montré une activité inhibitrice de l' α -glucosidase moins efficace que celles de *Salvia microphylla*, avec des IC_{50} respectifs de $118,53 \pm 2,62$ $\mu\text{g/mL}$ et $100,01 \pm 5,41$ $\mu\text{g/mL}$ (figure 3.18).

Il s'agit du premier rapport sur l'effet antidiabétique de *Salvia microphylla*, mais les résultats obtenus lors de l'évaluation de cette activité pour d'autres espèces du genre *Salvia* ont montré des effets similaires ou inférieurs aux nôtres [19, 20, 353].

Tableau 3.8 : Test d'inhibition de l' α -glucosidase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

Test d'inhibition de l' α -glucosidase								
	7,812 $\mu\text{g/ml}$	15,625 $\mu\text{g/ml}$	31,25 $\mu\text{g/ml}$	62,5 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	IC50 $\mu\text{g/mL}$
HEASM	NA	16,63 \pm 3,83	28,21 \pm 3,07	83,49 \pm 2,24	97,54 \pm 1,01	SAT	SAT	41,34\pm1,79
HEFSM	NA	4,10 \pm 1,22	28,18 \pm 3,10	64,88 \pm 2,08	87,85 \pm 0,35	SAT	SAT	50,25\pm1,75
HETSM	29,28 \pm 2,52	47,29 \pm 4,26	68,29 \pm 1,65	87,58 \pm 0,06	97,86 \pm 1,76	SAT	SAT	19,36\pm2,35
HEASO	NA	NA	1,54 \pm 4,12	20,45 \pm 4,82	53,36 \pm 2,00	86,33 \pm 1,32	SAT	118,53\pm2,62
HEFSO	NA	NA	NA	NA	4,34 \pm 1,75	29,36 \pm 1,75	75,91 \pm 1,75	363,06\pm7,88
HETSO	NA	3,52 \pm 2,10	14,01 \pm 0,93	39,15 \pm 1,04	59,46 \pm 2,91	82,29 \pm 2,89	SAT	100,01\pm5,41
Acarbose	78,125 $\mu\text{g/ml}$ 27,43 \pm 2,18	156,25 $\mu\text{g/ml}$ 38,91 \pm 3,20	312,5 $\mu\text{g/ml}$ 54,86 \pm 1,79	625 $\mu\text{g/ml}$ 67,29 \pm 2,63	1250 $\mu\text{g/ml}$ 80,19 \pm 1,66	2500 $\mu\text{g/ml}$ 85,54 \pm 0,45	5000 $\mu\text{g/ml}$ 91,05 \pm 0,72	275,43\pm1,59

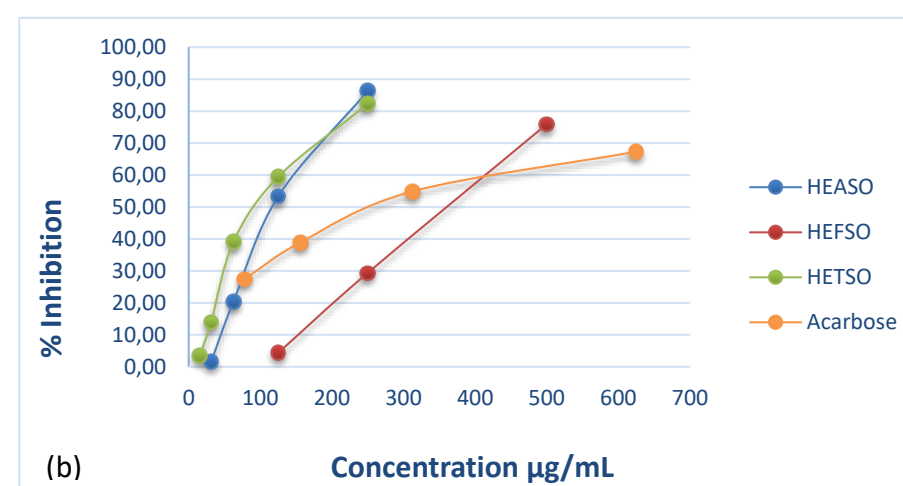
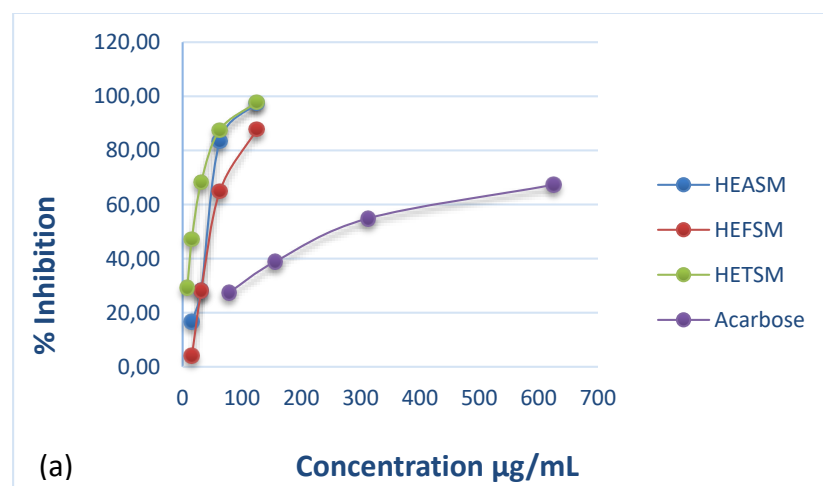


Figure 3.17 : Activité inhibitrice de l' α -glucosidase des huiles essentielles des parties aériennes, feuilles et tiges de *Salvia microphylla* (a) et *Salvia officinalis* (b).

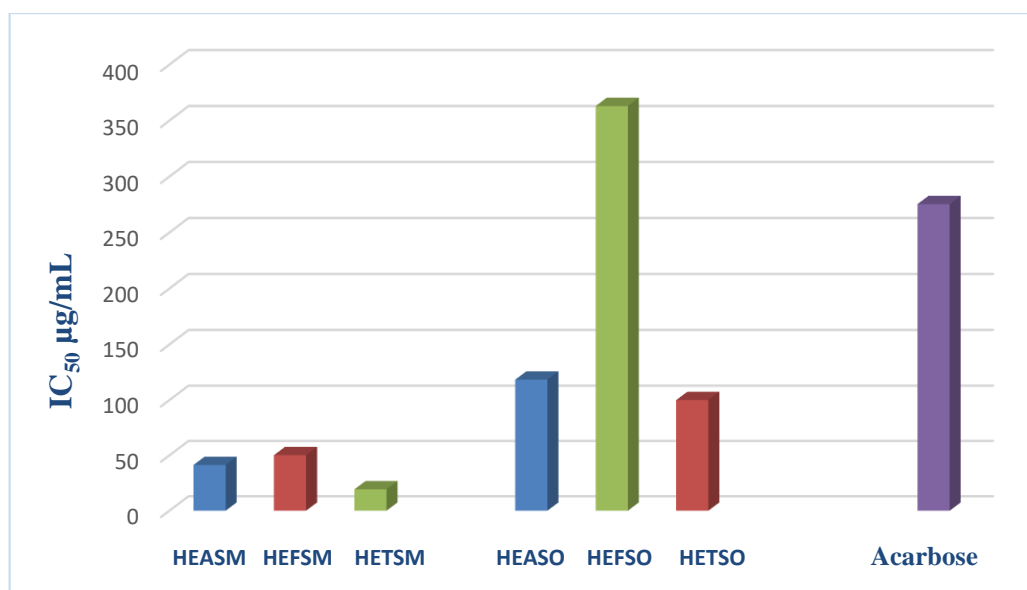


Figure 3.18: Activité inhibitrice de l' α -glucosidase (IC₅₀) des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

Concernant les effets antidiabétiques *in vitro* de *Salvia officinalis*, nos résultats concordent avec ceux obtenus par Al-Mijalli et al. [354], qui a examiné l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase de l'huile essentielle extraite des parties aériennes récoltées au Maroc. Ces auteurs ont montré que cette huile essentielle présente une activité antidiabétique comparable à la nôtre (IC₅₀ : $118,53 \pm 2,62$ µg/mL), avec une IC₅₀ de $113,17 \pm 0,02$ µg/mL. D'autres études sur les huiles essentielles obtenues des parties aériennes de *Salvia officinalis* récoltées à trois stades phénologiques au Maroc ont révélé une activité inhibitrice de l' α -glucosidase plus efficace que celle observée dans notre travail, avec des IC₅₀ comprises entre 22,24 µg/mL et 59,11 µg/mL [333]. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour les huiles de *Salvia microphylla*. Par ailleurs, l'huile essentielle des feuilles de *Salvia officinalis* cultivées au Liban a également montré une capacité significative à inhiber l'enzyme α -glucosidase à une concentration de départ de 10 % [211]. En outre, dans une étude *in vivo*, Baricevic et al. [355] ont démontré que l'administration d'huile essentielle réduisait significativement la glycémie chez des rats rendus diabétiques par l'alloxane.

Ces activités sont probablement attribuables aux principaux composés volatils de la plante, qui présentent un potentiel antidiabétique notable. Parmi ces composés figurent le camphre, le 1,8-cinéole, l' α -thujone, le trans-caryophyllène et la naphthalénone. Kuranov et al. [356] ont examiné le potentiel antidiabétique du camphre *in vivo* et *in vitro*, en utilisant respectivement l'OGTT chez la souris mâle albinos et l'inhibition de la dipeptidyl peptidase-

4 (DPP-4). Ils ont constaté que le camphre inhibe fortement l'activité de la DPP-4, avec des valeurs d'IC₅₀ variant entre 1,27 et 15,78 µM, et qu'il réduit la glycémie à jeun.

De même, le 1,8-cinéole a démontré un puissant pouvoir inhibiteur contre l'α-amylase, avec une IC₅₀ de 0,78 ± 0,05 mg/mL [357]. L'α-thujone, quant à elle, administrée par voie orale à une dose de 60 mg/kg/jour, diminue le taux de glucose plasmatique chez les rats diabétiques induits par STZ, en augmentant la production de glycogène via l'activation de la voie de signalisation Akt/GSK-3β [358]. En ce qui concerne le trans-caryophyllène, des études [359, 360] ont montré que ce composé peut restaurer certains paramètres liés au diabète, notamment en régulant la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS) dans les cellules β pancréatiques. Cela se fait par l'activation du récepteur cannabinoïde de type 2 (CB₂R), ce qui protège les cellules β pancréatiques, diminue la glycémie et augmente les niveaux d'insuline plasmatique. De plus, des substances bioactives capables d'inhiber les enzymes digestifs et possédant en même temps des activités antioxydantes potentielles pourraient être utilisées pour contrôler les niveaux de glucose sanguin et le stress oxydatif accompagnant le diabète [361]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour découvrir de nouveaux médicaments antidiabétiques à partir de ces huiles essentielles.

3.2.2.4 Activité antimicrobienne

3.2.2.4.1 Méthode de diffusion sur agar

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles des parties aériennes de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a été évaluée initialement par diffusion sur gélose, contre cinq bactéries à Gram négatif, six bactéries à Gram positif et deux levures. Après 24 heures d'incubation à 37°C, des zones d'inhibition ont été observées autour des disques. Les résultats présentés dans le tableau 3.9 montrent que presque toutes les souches à Gram positif sont extrêmement sensibles à l'huile essentielle de *Salvia microphylla*, avec des zones d'inhibition remarquables, notamment pour *Bacillus subtilis* (40 mm), *Listeria monocytogenes* (35 mm), *Enterococcus faecalis* (29 mm), *Staphylococcus aureus* (28 mm) et *Micrococcus luteus* (22 mm), témoignant d'une forte activité antibactérienne. Cependant, *Bacillus cereus* s'est révélée moins sensible avec une zone d'inhibition de 18 mm. De plus, l'huile essentielle de *Salvia microphylla* a démontré une activité significative contre deux souches à Gram négatif, *Escherichia coli* et *Agrobacterium tumefaciens*, avec des zones d'inhibition de 22 mm et 20 mm, respectivement.

L'huile essentielle de *Salvia officinalis* a montré des zones d'inhibition particulièrement intéressantes contre trois souches spécifiques : *Listeria monocytogenes* (33 mm), *Staphylococcus aureus* (30 mm) et *Bacillus subtilis* (30 mm). Les résultats obtenus révèlent une résistance notable de *Pseudomonas aeruginosa* face aux deux huiles essentielles étudiées. Cependant, une inhibition a été observée pour la levure *Candida albicans*, avec un diamètre de 30 mm pour l'huile de *Salvia microphylla* et de 26 mm pour celle de *Salvia officinalis*. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que nos huiles essentielles démontrent une activité antimicrobienne notable contre la plupart des souches microbiennes testées.

Tableau 3.9 : Diamètres des zones d'inhibition mesurés pour les différents microorganismes testés.

Souches	Diamètre d'inhibition (mm)	
	HEASM	HEASO
bactéries à Gram-positives		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	40	30
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14975	18	19
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 14110	22	19
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	28	30
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 49594	35	33
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	29	17
bactéries à Gram-négatives		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	22	11
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 23308	24	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25843	NI	NI
<i>Salmonella Abony</i> ATCC 14028	9	14
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	11	13
levures		
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	30	26
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	23	18

Boutebouhart et ses collaborateurs [216] ont étudié la *Salvia officinalis* de la région d'El Hamma et ont observé des diamètres de zones d'inhibition de 17 mm, 17 mm et 9 mm contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, respectivement. Ces valeurs indiquent un effet modéré par rapport à notre huile essentielle, qui a donné des résultats généralement meilleurs : 30 mm, 30 mm et 11 mm contre les mêmes souches.

Des diamètres d'inhibition supérieurs à ceux de notre étude ont été rapportés pour *Salvia officinalis* de la région de Bejaia [362], avec des mesures de 31,5 mm, 43,5 mm et 15,5 mm contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement. De plus, Mehalaine et al. [222] ont noté que l'huile essentielle de *Salvia officinalis* récoltée à Constantine présentait des effets antibactériens sur *Staphylococcus aureus*, légèrement inférieurs à ceux observés dans notre étude, avec un diamètre de zone d'inhibition de 15 mm, tandis qu'*Escherichia coli* a montré un effet antibactérien similaire à ceux de notre recherche. Nos résultats sont cohérents avec d'autres études qui ont démontré que la souche *Pseudomonas aeruginosa* est la plus résistante. [216, 221, 222, 276, 362].

D'autres recherches antérieures sur les huiles essentielles de *Salvia officinalis* cultivées dans deux régions d'Algérie ont révélé une activité antibactérienne plus marquée contre *Escherichia coli* ATCC 25922, avec des diamètres d'inhibition de 18 mm et 20 mm, en comparaison avec nos résultats [221, 276]. En ce qui concerne l'activité antifongique, l'huile essentielle de Mostaganem a montré une efficacité similaire à la nôtre contre *Candida albicans*, avec un diamètre d'inhibition de 22 mm [276].

3.2.2.4.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (MBC) ou fongicides (MFC)

Une méthode de microdilution en bouillon dans des microplaques à 96 puits a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*, contre cinq bactéries à Gram-négatives, six bactéries à Gram-positives et deux levures. Les huiles essentielles des différentes parties (parties aériennes, feuilles et tiges) ont été testées à des concentrations comprises entre 0,10 µL/mL et 26,66 µL/mL et les concentrations minimales bactéricides (CMB) et minimales fongicides (CMF) ont été déterminées pour les souches sensibles. Les valeurs de la CMI, la CMB et de la CMF des huiles essentielles des deux espèces et des standards (contrôle positif) sont présentées dans le tableau 3.10 et le tableau 3.11.

D'après les résultats obtenus, toutes les huiles essentielles des différentes parties (parties aériennes, feuilles et tiges) de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ont montré

une activité antimicrobienne contre tous les microorganismes, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, qui présentait une résistance totale. Cette résistance est due à la présence d'une barrière membranaire externe très restrictive entourant les cellules bactériennes à Gram négatif [264].

Listeria monocytogenes était sensible aux huiles essentielles des parties aériennes et des feuilles de *Salvia microphylla*, avec une valeur de CMI de 3,33 $\mu\text{L}/\text{ml}$, mais elle était résistante aux huiles essentielles des tiges. Ces résultats sont cohérents avec des recherches montrant que les huiles essentielles riches en 1,8-cinéole présentent une activité contre *Listeria monocytogenes* [363]. Ce composé a été retrouvé en forte concentration dans les parties aériennes et les feuilles de *Salvia microphylla* (4,49 et 7,50 %, respectivement), comparé à l'huile essentielle des tiges (1,98 % et valeur CMI de 26,66 $\mu\text{L}/\text{mL}$). L'huile essentielle extraite des tiges de *Salvia microphylla* a montré une forte activité antibactérienne contre toutes les autres bactéries, avec des valeurs de CMI comprises entre 0,20 et 3,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$. En particulier, *Enterobacter cloacae* était le plus sensible aux huiles essentielles des tiges, avec une CMI de 0,20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, suivi par *Bacillus cereus* et *Salmonella Abony*, avec des CMI de 0,83 $\mu\text{L}/\text{mL}$ et d'*Agrobacterium tumefaciens*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* avec des CMI de 1,66 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Par ailleurs, la plus faible activité a été observée contre *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis* avec des CMI de 3,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Cependant, les huiles essentielles des parties aériennes et des feuilles de *Salvia microphylla* ont montré une forte activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* avec des CMI respectives de 0,41 $\mu\text{L}/\text{mL}$ et 0,83 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Tandis que la valeur de la CMI la plus élevée a été enregistrée à 13,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour *Salmonella Abony*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Dans cette étude, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle isolée des tiges de *Salvia microphylla* contre tous les micro-organismes testés était supérieure à celle des autres parties (parties aériennes et feuilles). Il convient de noter que certains rapports antérieurs ont décrit que la forte activité peut être attribuée à la présence d' α -Eudesmol, de β -Caryophyllène, de γ -Eudesmol, de Bicyclogermacrène et des diterpènes (Abiétatriène, Ferruginol) qui sont présents en petites quantités, uniquement dans l'huile essentielle des tiges [364]. L'huile essentielle des parties aériennes de *Salvia microphylla* a montré des effets bactéricides (CMB/CMI < 4) pour *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli*.

Tableau 3.10 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Salvia microphylla*.

	HEASM		HEFSM		HETSM		standard	
	CMI	CMB/ CMF	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/ CMF	CMI *	CMI**
bactéries à Gram-positives								
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,41	0,83	0,83	1,66	3,33	26,66	11,25	NT
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14975	13,33	>26,66	13,33	13,33	0,83	>26,66	22,50	NT
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 14110	13,33	26,66	6,66	>26,66	3,33	13,33	11,25	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	13,33	13,33	13,33	13,33	1,66	>26,66	22,50	NT
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 49594	3,33	>26,66	3,33	>26,66	>26,66	>26,66	22,50	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	6,66	13,33	6,66	13,33	1,66	>26,66	11,25	NT
bactéries à Gram-négatives								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3,33	6,66	3,33	>26,66	3,33	>26,66	22,50	NT
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 23308	3,33	>26,66	1,66	>26,66	1,66	>26,66	11,25	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25843	NI	NI	NI	NI	NI	NI	45,00	NT
<i>Salmonella Abony</i> ATCC 14028	13,33	>26,66	13,33	>26,66	0,83	26,66	11,25	NT
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	13,33	>26,66	13,33	>26,66	0,20	>26,66	11,25	NT
Levures								
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	3,33	>26,66	3,33	>26,66	6,66	>26,66	NT	2,81
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	13,33	>26,66	13,33	>26,66	13,33	>26,66	NT	11,25

HEASM : Huile essentielle isolée des parties aériennes de *Salvia microphylla*. Tous les tests ont été effectués en double et répétés deux fois.

HEFSM : Huile essentielle isolée des feuilles de *Salvia microphylla*.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

HETSM : Huile essentielle isolée des tiges de *Salvia microphylla*.

CMB.CMF : Concentration Minimale Bactéricide et Concentration Minimale Fongicide ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

NI: aucune inhibition n'a été symbolisée. **NT**: Non Testé.

Contrôle positif : *Amoxicilline ($\mu\text{g}/\text{mL}$); **Kétoconazole ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

En outre, les effets bactéricides de l'huile essentielle des feuilles ont été marqués sur toutes les bactéries à Gram positif, à l'exception de *Listeria monocytogenes* et *Micrococcus luteus*. Cependant, l'huile essentielle des tiges a montré des effets bactériostatiques sur *Bacillus subtilis* et *Salmonella Abony*, car le CMB/CMI était supérieur à 4 [18,365].

Les résultats obtenus pour *Salvia officinalis* (tableau 3.10) révèlent que ses huiles essentielles sont particulièrement efficaces contre les bactéries Gram-positives, avec des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) généralement faibles, témoignant d'une forte activité antibactérienne. Parmi celles-ci, *Bacillus subtilis* se distingue par sa sensibilité marquée à l'huile essentielle extraite des parties aériennes et des feuilles, avec des CMI de 6,66 µL/mL. En revanche, l'huile provenant des tiges se montre deux fois moins active, avec une CMI de 13,33 µL/mL. Pour certaines bactéries, telles que *Micrococcus luteus*, les huiles essentielles des feuilles et des tiges sont plus efficaces que celles obtenues des parties aériennes, avec des CMI de 13,33 µL/mL contre 26,66 µL/mL. De plus, les huiles essentielles de toutes les parties de la plante présentent une efficacité comparable contre *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, avec des CMI uniformes de 13,33 µL/mL. Concernant *Listeria monocytogenes*, l'huile essentielle des parties aériennes et des tiges affiche une meilleure activité (CMI de 6,66 mg/mL) par rapport à celle extraite des feuilles, qui présente une CMI de 13,33 mg/mL. Enfin, face à *Enterococcus faecalis*, l'huile essentielle des tiges démontre une plus grande efficacité avec une CMI de 6,66 mg/mL.

Tandis que les huiles des parties aériennes et des feuilles montrent une activité modérée (CMI de 13,33 mg/mL).

En revanche, les bactéries Gram-négatives présentent une résistance accrue. Cependant, certaines souches telles qu'*Escherichia coli* et *Agrobacterium tumefaciens* révèlent une sensibilité à l'huile essentielle des tiges, avec des CMI respectives de 13,33 µL/mL et 6,66 µL/mL, mettant en évidence une meilleure activité de cette partie de la plante contre ces bactéries. À l'inverse, des bactéries comme *Salmonella Abony* et *Enterobacter cloacae* montrent une sensibilité équivalente aux trois huiles, avec des CMI de 13,33 µL/mL, indiquant ainsi une efficacité similaire de toutes les parties de la plante contre ces souches.

Tableau 3.11 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Salvia officinalis*.

	HEASO		HEFSO		HETSO		Standard	
	CMI	CMB/ CMF	CMI	CMB/ CMF	CMI	CMB/ CMF	CMI *	CMI **
bactéries à Gram-positives								
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6,66	26,66	6,66	13,33	13,33	26,66	11,25	NT
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14975	13,33	>26,66	13,33	>26,66	13,33	>26,66	22,50	NT
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 14110	26,66	26,66	13,33	26,66	13,33	>26,66	11,25	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	>26,66	22,50	NT
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 49594	6,66	>26,66	13,33	>26,66	6,66	>26,66	22,50	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	13,33	26,66	13,33	26,66	6,66	>26,66	11,25	NT
bactéries à Gram-négatives								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	26,66	>26,66	26,66	>26,66	13,33	>26,66	22,50	NT
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 23308	13,33	>26,66	13,33	>26,66	6,66	>26,66	11,25	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25843	NI	NI	NI	NI	NI	NI	45,00	NT
<i>Salmonella Abony</i> ATCC 14028	13,33	26,66	13,33	>26,66	13,33	26,66	11,25	NT
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	13,33	>26,66	13,33	>26,66	13,33	>26,66	11,25	NT
Levures								
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	13,33	>26,66	13,33	>26,66	13,33	>26,66	NT	2,81
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	26,66	>26,66	13,33	26,66	13,33	>26,66	NT	11,25

HEASO : Huile essentielle isolée des parties aériennes de *Salvia officinalis*.

HEFSO : Huile essentielle isolée des feuilles de *Salvia officinalis*.

HETSO : Huile essentielle isolée des tiges de *Salvia officinalis*.

NI: aucune inhibition n'a été symbolisée. **NT**: Non Testé.

Tous les tests ont été effectués en double et répétés deux fois.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

CMB.CMF : Concentration Minimale Bactéricide et Concentration Minimale Fongicide ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

Contrôle positif : *Amoxicilline ($\mu\text{g}/\text{mL}$); **Kétoconazole ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

L'huile essentielle extraite des parties aériennes a révélé des propriétés bactéricides significatives (avec un rapport CMB/CMI inférieur à 4) contre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Salmonella Abony*. Par ailleurs, les effets bactéricides de l'huile essentielle provenant des feuilles se sont avérés prononcés pour l'ensemble des bactéries à Gram positif, à l'exception de *Listeria monocytogenes* et *Bacillus subtilis*. En revanche, l'huile essentielle extraite des tiges a démontré une action bactéricide uniquement sur *Bacillus subtilis* et *Salmonella Abony* [18,365].

L'activité antifongique la plus forte a été observée contre *Candida albicans* en utilisant les huiles essentielles des parties aériennes et des feuilles de *Salvia microphylla*, avec des valeurs de CMI de 3,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Les huiles essentielles de *Salvia officinalis* possèdent une activité antifongique modérée contre les levures. En particulier, *Candida albicans* montre une sensibilité aux trois huiles essentielles, avec une concentration minimale inhibitrice de 13,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$, ce qui indique une efficacité notable. En revanche, les huiles essentielles extraites des feuilles et des tiges se révèlent plus efficaces contre *Saccharomyces cerevisiae*, avec une CMI de 13,33 $\mu\text{L}/\text{mL}$, alors que celles provenant des parties aériennes affichent une CMI de 26,66 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Des études antérieures ont confirmé que les monoterpènes bicycliques α -pinène et β -pinène présentaient une activité antifongique considérable. Ces composés ont été trouvés dans les parties aériennes et les feuilles de *Salvia microphylla* à des concentrations de 4,07-4,63 % et de 2,29-2,63 %, respectivement [364].

En générale, la majorité des composés sont souvent responsables de l'activité antibactérienne. Cependant, certaines études montrent que l'ensemble des principaux composants isolés présente une activité antibactérienne inférieure à celle des huiles essentielles. Cela peut s'expliquer par la présence d'un effet synergique entre les différents composés minoritaires des huiles essentielles [264, 366]. Cette différence significative est probablement due au moment de la récolte, à la région de collecte et aux facteurs environnementaux. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des tiges de *Salvia microphylla* n'a pas été rapportée ailleurs. Selon nos résultats, les huiles essentielles de *Salvia microphylla* pourraient être suggérées dans le traitement des maladies humaines et pourraient constituer une alternative intéressante aux médicaments synthétiques.

En comparaison avec une étude réalisée sur l'huile essentielle des feuilles de *Salvia microphylla* cultivées au Brésil et récoltées en février 2007 [202], nos observations indiquent

que cette huile a présenté une activité antibactérienne intéressante contre *Listeria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Salmonella choleraesui*, à l'exception d'*Escherichia coli* qui était résistante. Par ailleurs, une autre étude a été menée sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Salvia microphylla*, récoltée en Tunisie. Cette huile a montré un effet modéré contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Listeria monocytogenes*, avec des concentrations minimales inhibitrices de 275 µg/mL [205].

Plusieurs études antérieures ont également rapporté les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de *Salvia officinalis* récoltées dans différentes régions d'Algérie. Dans notre étude, la souche d'*Escherichia coli* s'est avérée moins sensible à notre huile essentielle de *Salvia officinalis*, contrairement à celles provenant de Batna et Mostaganem [221, 276], qui ont montré une efficacité avec des CMI respectives de 75 µg/mL et 80 µg/mL. L'huile essentielle de *Salvia officinalis* de la région de Bejaia [18] a présenté des CMI de 3,75 mg/mL contre *Escherichia coli* ATCC 25922 et de 7,5 mg/mL contre *Escherichia coli* 161, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 867, toutes inférieures à celles observées dans nos résultats.

Bouaziz et al. [329] ont démontré que l'huile essentielle de *Salvia officinalis* originaire de Tunisie possède des propriétés antimicrobiennes remarquables contre les bactéries, les levures et les moisissures. En effet, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) observées étaient nettement plus faibles que les nôtres, allant de 0,015 µL/mL à 0,25 µL/mL. Cette huile a montré une efficacité notable contre *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 10675, *Bacillus cereus* CTM 225, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Candida albicans* ATCC 10231. En revanche, l'huile de *Salvia officinalis* provenant de Syrie a montré des CMI plus faible que celles observées dans nos travaux antérieurs [335], avec des valeurs comprises entre 5 µL/mL et 10 µL/mL pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Une étude [201] a révélé que l'huile essentielle de *Salvia officinalis*, cultivée dans le sud du Brésil, présentait une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. Cependant, ces effets étaient comparables à ceux observés dans notre étude. L'étude de Marino et ces collaborateurs [367] a montré que l'huile essentielle de *Salvia officinalis* exerçait uniquement un effet bactériostatique. En revanche, notre huile essentielle a démontré une activité bactéricide contre la majorité des souches à Gram positif. D'autres chercheurs [188, 201] ont également

mis en évidence les propriétés bactéricide et fongicide de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* pourrait être due à la présence de camphre, de 1,8-cinéole, d' α -thujone et de β -thujone. Bien que cette activité soit souvent associée aux principaux constituants, il est désormais reconnu que la synergie ou les effets antagonistes des composés mineurs doivent également être pris en compte [264].

L'activité antimicrobienne observée est principalement attribuée à la composition chimique des huiles essentielles. Ces résultats justifient des investigations supplémentaires via des tests *in vivo*, en vue de développer un moyen de lutte biologique à base de substances naturelles contre les micro-organismes responsables d'infections pathogènes.

3.3 Etude phytochimique des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

3.3.1 Extraction, séparation et identification des métabolites secondaires de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

3.3.1.1 Rendement de l'extraction par différentes méthodes

Le rendement des extraits obtenus par macération à froid suivie par extraction liquide-liquide avec différents solvants ainsi que ceux obtenus par extraction à chaud à l'aide d'un Soxhlet ont été calculés pour les parties aériennes de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*. Chaque extrait a été caractérisé par son aspect, sa couleur et son rendement par rapport au poids de la poudre végétale. Ces éléments sont présentés dans le tableau 3.12.

Le tableau ci-dessous met en évidence les variations de rendement en fonction des différents solvants et techniques d'extraction employées (à froid et à chaud) pour *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*. Les données révèlent que les différents solvants ou méthodes d'extraction donnent des rendements variés.

Tableau 3.12 : Rendement d'extraction (%) de *Salvia microphylla* (SM) et *Salvia officinalis* (SO).

Extraits	Couleurs/Aspects	Rendements (%)
Extraction à froid		
EPSM	Pate visqueuse moutarde	2,06
ECSM	Poudre vert foncé	2,84
EASM	Pate miel	0,6
EBSM	Pate marron foncé	2,82
Extraction à chaud		
EDSM	Poudre vert foncé	2,631
EESM	Pate marron	8,109
EDSO	Poudre vert	2,442
EESO	Pate marron foncé	7,823

Pour *Salvia microphylla*, les différents solvants utilisés lors de l'extraction à froid montrent une légère variation dans les rendements. L'EPSM atteint un rendement de 2,06 %, tandis que l'ECSM offre un rendement plus élevé de 2,84 %, suivi de l'EBSM avec 2,82 %. En revanche, l'EASM affiche le rendement le plus faible, à seulement 0,6 %. En ce qui

concerne *Salvia officinalis*, les rendements sont plus bas pour les extraits EPSO (0,65 %) et EASO (0,78 %), et plus élevé pour les extraits ECSO et EBSO qui présentent les rendements 1,2 % et 3,15 %, respectivement. Contrairement à *Salvia microphylla*, l'extraction pour *Salvia officinalis* semble être légèrement plus efficace avec l'EBSO.

L'extraction à chaud révèle des rendements nettement plus élevés pour les deux espèces de plantes. Pour *Salvia microphylla*, le rendement de l'EDSM est de 2,631%, tandis que l'EESM affiche un rendement remarquable de 8,109%. Une tendance similaire est observée pour *Salvia officinalis*, avec un rendement de 2,442% pour l'EDSO et de 7,823% pour l'EESO. Ces résultats indiquent une amélioration significative des rendements par rapport à l'extraction à froid, en particulier pour l'EESO avec un solvant polaire, démontrant que l'application de chaleur améliore considérablement l'extraction des composés dans cette plante, notamment lorsqu'un solvant polaire est utilisé.

Les résultats de l'étude menée par Zavala-Sánchez et ses collaborateurs [269] sur l'espèce *Salvia microphylla* ne concordent pas avec les nôtres, où le rendement de l'extrait chloroformique était plus faible (1,18 %) que celui que nous avons obtenu (2,84 %). Des études précédentes sur les feuilles de *Salvia officinalis* ont révélé que le rendement de l'extrait éthanolique obtenu par ultrasons était de 12,40 %, ce qui diffère de nos résultats. En effet, l'extraction effectuée à chaud dans notre étude a produit un rendement plus faible, à savoir 7,823 % pour l'extrait éthanolique [285]. Nos résultats ne sont pas en accord avec une étude qui a rapporté que l'extrait d'acétate d'éthyle obtenu par macération des parties aériennes de *Salvia officinalis* présente le rendement le plus élevé par rapport à l'extrait butanolique [287].

D'après les résultats de l'étude de Truong et al. [368], le solvant a été identifié comme l'un des facteurs clés influençant le rendement d'extraction. Sur la base des résultats actuels, nous pouvons conclure que les solvants organiques, notamment le n-butanol et l'éthanol, sont les plus efficaces pour l'extraction des métabolites secondaires, offrant ainsi un meilleur rendement. Ces solvants facilitent l'extraction des composés chimiques solubles dans leur matrice.

En générale, les teneurs en extraits varient non seulement d'une plante à une autre mais également en fonction des paramètres et de la méthode d'extraction des métabolites secondaires, tels que la nature du solvant d'extraction, le temps d'extraction et la température d'extraction.

3.3.1.2 Quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux

Les analyses quantitatives des phénols totaux et des flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine, respectivement.

Dans cette étude, la quantification des phénols totaux et des flavonoïdes totaux a été réalisée en raison du rôle majeur des composés phénoliques dans l'activité antioxydante des plantes [369]. Ces composés exercent également diverses actions biologiques, notamment des effets anti-inflammatoires, antiviraux, antiallergiques et antithrombotiques, souvent liés à leur activité antioxydante [370].

➤ Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux (TPC) des différents extraits des deux plantes étudiées ont été mesurées à l'aide de la méthode de Folin-Ciocalteu à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide gallique à diverses concentrations, avec un coefficient de corrélation de $R = 0,9972$ (voir Appendice D1). Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait de plante ($\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) et sont présentés dans le tableau 3.13.

Tableau 3.13 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits des parties aériennes de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

Extraits	Teneurs en Polyphénols		
	Totaux TPC ($\mu\text{g EAG/mg}$)	Teneurs en flavonoïdes totaux TFC ($\mu\text{g EQ/mg}$)	
<i>Salvia microphylla</i>	EPSM	20,467±0,010	60,083±0,139
	ECSM	32,678±0,025	95,333±0,069
	EASM	286,555±0,072	222,333±0,127
	EBSM	76,666±0,026	206,750±0,079
	EDSM	70,623±0,020	99,50±0,0258
	EESM	276,109±0,034	146,05±0,0268
<i>Salvia officinalis</i>	EPSO	17,111±0,018	11,805±0,037
	ECSO	44,888±0,164	28,611±0,019
	EASO	266,555±0,065	76,388±0,366
	EBSO	214,777±0,0295	69,930±0,335
	EDSO	102,000±0,020	51,520±0,430
	EESO	385,001±0,115	157,620±0,250

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3).

Selon les résultats présentés dans le tableau 3.13 et la figure 3.19, les teneurs en polyphénols totaux montrent que l'EPSM et l'ECSM affichent les concentrations les plus faibles, avec respectivement $20,467 \pm 0,010 \mu\text{g EAG/mg}$ et $32,678 \pm 0,025 \mu\text{g EAG/mg}$. À l'inverse, l'EASM se distingue par une teneur exceptionnellement élevée en polyphénols, atteignant $286,555 \pm 0,072 \mu\text{g EAG/mg}$. Les extraits EBSM ($76,666 \pm 0,026 \mu\text{g EAG/mg}$) et EDSM ($70,623 \pm 0,020 \mu\text{g EAG/mg}$) présentent des valeurs modérées, supérieures à celles de l'EPSM et de l'ECSM, mais nettement inférieures à l'EASM. Enfin, l'extrait EESM, avec une concentration de $276,109 \pm 0,034 \mu\text{g EAG/mg}$ en polyphénols totaux, se rapproche de l'EASM.

Les teneurs en polyphénols totaux (TPC) des différents extraits de *Salvia officinalis* montrent que l'extrait éthanolique (EESO) ($385,001 \pm 0,115 \mu\text{g EAG/mg}$) se distingue par sa richesse exceptionnelle en polyphénols, suivi par les extraits EASO ($266,555 \pm 0,065 \mu\text{g EAG/mg}$) et EBSO ($214,777 \pm 0,0295 \mu\text{g EAG/mg}$). À l'inverse, l'EPSO ($17,111 \pm 0,018 \mu\text{g EAG/mg}$) présente la teneur la plus faible, indiquant une concentration extrêmement basse en polyphénols. Enfin, les extraits EDSO ($102,000 \pm 0,020 \mu\text{g EAG/mg}$) et ECSO ($44,888 \pm 0,164 \mu\text{g EAG/mg}$) affichent également des concentrations réduites en polyphénols, reflétant une richesse modérée en composés phénoliques par rapport aux autres extraits (EESO, EASO et EBSO).

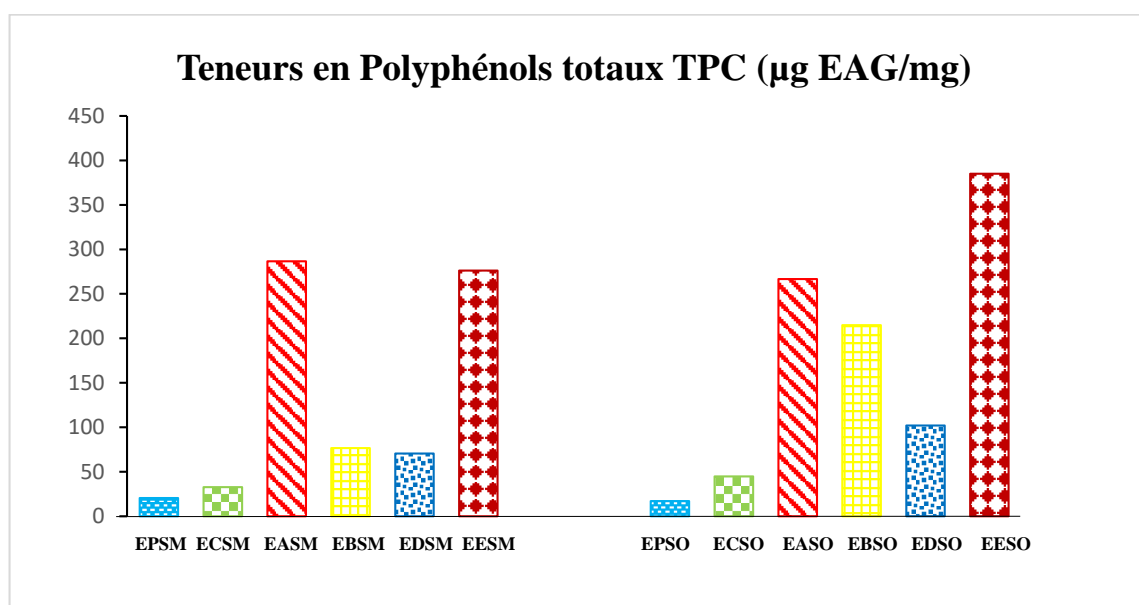


Figure 3.19 : Teneurs des polyphénols totaux dans les différents extraits des parties aériennes de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

L'étude comparative des différents extraits a mis en évidence la prédominance des composés phénoliques dans les extraits acétate d'éthyle, butanolique et éthanolique des deux espèces. Plus particulièrement, l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis* (EESO) s'est avéré être le plus riche en polyphénols totaux, avec une concentration record de 385,001 µg EAG/mg.

➤ Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃), qui est simple, économique et offre une bonne sensibilité. La quercétine a été utilisée comme référence à différentes concentrations, avec un coefficient de corrélation R = 0,997. Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait sec (µg EQ/mg) et sont présentés dans le tableau 3.12. La courbe d'étalonnage de la quercétine est représentée dans l'appendice (Appendice D2).

Les teneurs totales en flavonoïdes (TFC) des différents extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* sont présentées dans le tableau 3.13 et la figure 3.20.

Les extraits obtenus avec le chloroforme (ECSM) et le dichlorométhane (EDSM) révèlent de faibles concentrations en flavonoïdes totaux, avec des teneurs relativement similaires de $95,333 \pm 0,069$ µg EQ/mg et $99,50 \pm 0,0258$ µg EQ/mg, respectivement. En revanche, l'extrait de l'acétate d'éthyle (EASM) présente la plus forte teneur en flavonoïdes, atteignant $222,333 \pm 0,127$ µg EQ/mg, suivi de près par l'extrait butanolique (EBSM) avec une teneur de $206,750 \pm 0,079$ µg EQ/mg. L'extrait éthanolique (EESM) se situe à un niveau intermédiaire avec une teneur de $146,05 \pm 0,0268$ µg EQ/mg, inférieur à celui de l'EASM et de l'EBSM, mais supérieur aux autres extraits. En fin, l'EPSM présente une teneur extrêmement faible en flavonoïdes ($60,083 \pm 0,139$ µg EQ/mg).

Les teneurs en flavonoïdes totaux (TFC) des extraits de *Salvia officinalis* varient de manière significative selon le type d'extrait utilisé. L'EPSO présente la plus faible teneur avec $11,805 \pm 0,037$ µg EQ/mg, tandis que l'extrait éthanolique (EESO) affiche la teneur la plus élevée avec $157,620 \pm 0,250$ µg EQ/mg, suivis par l'EASO $76,388 \pm 0,366$, ainsi que l'extrait butanolique (EBSO) à $69,930 \pm 0,335$ µg EQ/mg et l'EDSO avec $51,520 \pm 0,430$ µg EQ/mg.

Ces résultats révèlent que les extraits acétate d'éthyle, butanolique et les extraits éthanolique des deux espèces sont les plus riches en flavonoïdes, notamment l'extrait d'acétate d'éthyle de *Salvia microphylla* (EASM) ($222,333$ µg EQ/mg).

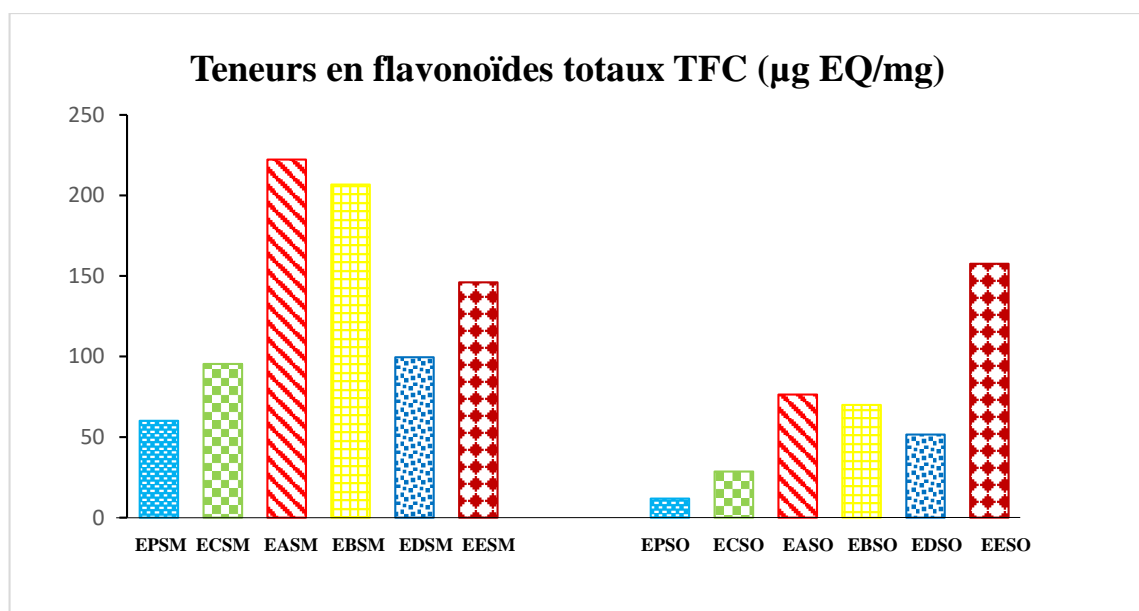


Figure 3.20 : Teneurs des flavonoïdes totaux dans les différents extraits des parties aériennes de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

Les extraits acétate d'éthyle, obtenus par macération à froid de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*, ont présenté les concentrations les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes. En revanche, les extraits éthanoliques, issus d'une extraction à chaud, ont révélé des teneurs supérieures en ces composés par rapport aux extraits de dichlorométhane.

Deux études réalisées sur *Salvia microphylla* récoltée en Corée ont révélé que l'extrait éthanolique obtenu par extraction à froid présentait des teneurs en composés phénoliques totaux (TPC) comprises entre 102,26 et 198,22 mg EAG /g, des valeurs inférieures à celles observées dans notre étude. En revanche, la teneur en flavonoïdes totaux (TFC) de notre extrait (EESM) s'est avérée plus faible que celles rapportées par ces mêmes études, qui indiquaient des valeurs comprises entre 291,55 et 377,42 mg EQU/g [266, 267].

La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes révèle que l'extrait éthanolique obtenu par macération à froid de *Salvia officinalis* collectée à Mascara [277] contient respectivement $221,08 \pm 2,36$ mg EAG/g et $80,54 \pm 1,3$ mg EQ/g. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus pour les extraits acétate d'éthyle (EASO) et butanolique (EBSO). Cependant, l'extrait éthanolique (EESO) présente une teneur plus élevée en ces composés par rapport à l'extrait éthanolique de Mascara.

Dans une étude menée par Ayda Khadhri et al. [205] sur l'espèce *Salvia microphylla* récoltée en Tunisie, les extraits obtenus par infusion ont révélé une faible concentration en polyphénols ($39 \pm 0,2$ mg EAG/g) et en flavonoïdes ($2,2 \pm 0,09$ mg EC/g), tandis que les

extraits méthanoliques présentaient respectivement $23,4 \pm 0,09$ mg EAG/g et $1,7 \pm 0,03$ mg EC/g. Ces valeurs étaient inférieures à celles obtenues dans notre étude actuelle.

Nos résultats ont révélé que les extraits éthanoliques de *Salvia officinalis* obtenus par extraction à chaud (EESO) présentent une teneur plus élevée en polyphénols ($385,001 \pm 0,115$ µg EAG/mg) et en flavonoïdes ($157,620 \pm 0,250$ µg EQ/mg) en comparaison avec les extraits obtenus par macération à froid. Ces données concordent avec celles de Martins et al. [371], qui ont montré que les extraits aqueux issus de la décoction des feuilles de *Salvia officinalis* récoltée en Espagne affichent une concentration en composés phénoliques supérieure à celle des extraits méthanoliques. Cela peut s'expliquer par l'influence de la température utilisée lors de l'extraction, celle-ci améliorant la solubilité des composés phénoliques. Cependant, une température trop élevée peut entraîner la dégradation de certains de ces composés [372]. Cependant, des études précédentes suggèrent que les composés phénoliques pourraient s'oxyder lors d'une extraction prolongée [372-374].

Dans une autre étude, les valeurs de la teneur en polyphénols totaux (TPC) et en flavonoïdes totaux (TFC) de l'extrait hydrométhanolique, ainsi que de ses fractions d'acétate d'éthyle, butanolique et aqueuse de *Salvia officinalis* L. provenant de deux régions du Maroc (Boulemane et Khenifra), variaient entre 70,5 et 176,5 mg EAG/g d'extrait pour les polyphénols totaux, et entre 1,92 et 9,07 mg QE/g d'extrait pour les flavonoïdes. Ces résultats sont nettement inférieurs à ceux que nous avons obtenus, mais concordent avec le fait que l'extrait hydrométhanolique de cette espèce marocaine, obtenu par extraction à chaud, présente la plus forte concentration en TPC et TFC [274]. De plus, Karimzadeh et Farahpour [375] ont démontré que l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *Salvia officinalis* récoltées en Iran contenait une concentration élevée en flavonoïdes ($116,71 \pm 2,34$ µg ER/mg d'extrait sec) ainsi qu'en polyphénols totaux ($298,8 \pm 4,3$ µg EAG/mg d'extrait sec), ce qui est comparable à nos résultats.

Des études sur différents extraits de *Salvia officinalis* ont montré que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes de cette plante varie en fonction de la région de récolte, de la saison, de la phase de développement de la plante et du solvant utilisé pour l'extraction [376, 377].

De plus, la méthode d'extraction et de quantification [378], ainsi que la polarité du solvant utilisé pour l'extraction et les structures chimiques (y compris les groupes hydroxyles, le poids moléculaire et la glycosylation des flavonoïdes) [379, 380] peuvent également influencer l'évaluation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux.

3.3.1.3 Analyse qualitative des composés phénoliques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

Dans cette étude, nous avons effectuée l'analyse chimique des extraits qui ont présentés les teneurs les plus élevées en composés phénoliques (EASM, EBSM, EASO, EBSO) et des fractions les plus actives dans le test de DPPH (MFD2, MFE3, OFD4, OFE4). La détermination de la composition a été réalisée par Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem (LC-MS/MS). Cette technique a permis d'obtenir des informations qualitatives sur la composition chimique de ces extraits par des chromatogrammes représentant les profils des extraits des deux espèces (Appendice E). L'identification des composés se fait en comparant les spectres obtenus avec des bases de données de référence.

Les résultats de l'analyse qualitative effectuée par LC-MS/MS des différents extraits et fractions de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* sont présentés dans les tableaux ci-dessous. Les tableaux qui répertorient les temps de rétention (TR), les rapports masse/charge (m/z), la masse moléculaire ainsi que les formules chimiques des substances, identifiées par comparaison des spectres de masse en mode ionisation électrospray (ESI) positif ou négatif avec des bases de données de référence pour les extraits EASM, EBSM, EASO et EBSO et les fractions MFD2, MFE3, OFD4 et OFE4 sont dans l'appendice F.

L'analyse des extraits par LC-MS/MS a mis en évidence la présence de 29 composés dans l'EASM et de 26 composés dans l'EBSM. Ces composés incluent principalement des acides phénoliques, des flavonoïdes, des terpènes, ainsi que d'autres substances bioactives, certaines étant communes aux deux extraits, tandis que d'autres sont propres à chacun.

Le tableau 3.14 répertorie les composés détectés par LC-MS/MS dans les extraits acétate d'éthyle (EASM) et butanolique (EBSM) de *Salvia microphylla*.

Parmi les composés phénoliques identifiés dans les extraits EASM et EBSM, nous observons principalement des acides phénoliques, tels que l'acide 4-méthoxybenzoïque, l'acide 2-méthoxybenzoïque, l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque, l'acide salicylique, l'acide coumarique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide cis-p-coumarique, la vanilline et l'acide férulique. Ces extraits renferment également des flavonoïdes comme la catéchine, la vitexine, la quercétine, la rutine, la myricétine et l'hespérétine. On trouve également parmi les composés phénoliques l'hydrate d'esculine, la curcumine, un curcuminoïde extrait du curcuma, ainsi que le verbascoside, un glycoside phénylpropanoïde issu de l'acide caféique. Les deux extraits contiennent également des composés terpéniques, avec la présence de

thymol et l'acide oléanolique, dans les deux extraits. D'autres composés communs, ont été également détectés, tels que l'acide kojique, l'acide folique (vitamine B9), le 8-hydroxyquinoline et la caféine.

Cependant, certains composés sont spécifiques à un extrait. L'extrait acétate d'éthyle (EASM) contient des composés uniques, telles que l'acide vanillique, la lutéoline et la naringénine, classées parmi les flavonoïdes. Il contient également du bêta-carotène, un caroténoïde aux puissantes propriétés antioxydantes. La présence de ces composés suggère une activité biologique potentiellement différente pour cet extrait.

L'EBSM présente également une molécule exclusive : la chrysin, un flavonoïde aux propriétés anxiolytiques et anti-inflammatoires. Cette différence dans la composition chimique peut indiquer des propriétés spécifiques à cet extrait.

Ainsi, bien que les deux extraits partagent une grande partie de leurs constituants, certains composés uniques à chaque extrait pourraient contribuer à des effets biologiques distincts.

Deux esters phénoliques, à savoir l'ester de l'acide 2-(p-hydroxyphényl) éthyle eicosaheptanoïque et l'ester d'hexacosylfêrulate, ont été isolés de l'extrait acétonique de *Salvia microphylla*. Par ailleurs, l'acide oléanolique, un triterpène présent dans nos extraits (EASM et EBSM), avait déjà été isolé et identifié dans l'extrait acétonique de *Salvia microphylla* provenant de Turquie [224].

Les composés identifiés par LC-MS/MS dans les extraits acétate d'éthyle (EASO) et butanolique (EBSO) de *Salvia officinalis* sont présentés dans tableau ci-dessus (tableau 3.14). L'analyse des extraits par LC-MS/MS a révélé la présence de 20 composés dans l'EASO et 21 composés dans l'EBSO. Les deux extraits sont principalement constitués d'acides phénoliques, de flavonoïdes et de triterpénoïdes, ainsi que d'autres types de composés.

Les extraits d'acétate d'éthyle (EASO) et butanolique (EBSO) de *Salvia officinalis* sont riches en composés phénoliques, comprenant des molécules telles que l'acide 4-méthoxybenzoïque, l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque, l'acide salicylique, l'acide caféique et l'acide cis-p-coumarique. Toutefois, certains acides phénoliques sont spécifiques à chaque extrait : l'acide férulique et l'acide gallique sont présents uniquement dans l'extrait acétate d'éthyle (EASO), tandis que l'acide sinapique, l'acide 4-méthoxybenzoïque, l'acide 2-méthoxybenzoïque, l'acide chlorogénique et l'acide coumarique se trouvent exclusivement dans l'extrait butanolique (EBSO).

Tableau 3.14 : Composés identifiés par LC-MS/MS de l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

N° Pic	Composés	EASM	EBSM	EASO	EBSO
1	Acide 4-méthoxybenzoïque	+	+	-	+
2	Acide sinapique	-	-	-	+
3	Acide coumarique	+	+	-	+
4	Acide 2-méthoxybenzoïque	+	+	-	+
5	Acide gallique	-	-	+	-
6	Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	+	+	+	+
7	Acide chlorogénique	+	+	-	+
8	Acide salysilique	+	+	+	+
9	Acide caféique	+	+	+	+
10	Acide vanillique	+	-	-	-
11	Acide cis-p.coumarique	+	+	+	+
12	Acide férulique	+	+	+	-
13	Vanilline	+	+	+	+
14	Catéchine	+	+	+	-
15	Chrysine	-	+	-	-
16	Hespérétine	+	+	+	+
17	Myricétine	+	+	+	+
18	Naringénine	+	-	+	-
19	Lutéoline	+	-	+	+
20	Quercétine	+	+	+	+
21	Rutine	+	+	+	+
22	Vitexine	+	+	+	-
23	4-hydroxy coumarine	-	-	-	+
24	Curcumine	+	+	-	+
25	Hydrate d'esculine	+	+	+	+
26	Verbascoside	+	+	-	-
27	8-hydroxyquinoline	+	+	-	-
28	Acide folique	+	+	+	+
29	Acide kojique	+	+	+	-
30	Bêta-carotène	+	-	-	-
31	Caféine	+	+	+	+
32	Acide oléanolique	+	+	+	+
33	Thymol	+	+	-	-

+ : Présent, - : Absent

Ces extraits contiennent également des flavonoïdes tels que la lutéoline, la quercétine, la rutine, la myricétine et l'hespérétine. L'extrait acétate d'éthyle de *Salvia officinalis* (EASO) se distingue par la présence des flavonoïdes spécifiques tels que la vitexine, la naringénine et la catéchine. En revanche, l'extrait butanolique (EBSO) est

caractérisé par la présence de 4-hydroxycoumarine, un dérivé phénylpropanoïde, ainsi que de la curcumine.

L'acide oléanolique est le seul triterpénoïde identifié dans les deux extraits de *Salvia officinalis*.

Des études antérieures sur l'extrait n-butanol des feuilles de *Salvia officinalis* récoltées aux États-Unis ont permis d'isoler plusieurs composés phénoliques, notamment l'acide caféique et l'acide 4-méthoxybenzoïque [227]. En effet, de nombreux composés phénoliques, tels que l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide caféique et l'hespérétine [228], ont été caractérisés par HPLC dans les extraits de *Salvia officinalis*. Ces travaux sont en accord avec nos propres résultats.

L'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique de *Salvia officinalis* ont révélé la présence de lutéoline, ce qui est en accord avec les résultats de Brieskorn et Biechele [232], qui ont démontré que les feuilles de *Salvia officinalis* contiennent des flavones, notamment, la lutéoline.

L'analyse qualitative de l'extrait hydrométhanolique de *Salvia officinalis* récoltée au Maroc, réalisée par HPLC, a mis en évidence la présence de l'acide ascorbique, de l'acide gallique, de l'acide 4-hydroxybenzoïque, de l'acide tannique ainsi que de la rutine. Cet extrait s'est révélé particulièrement riche en composés phénoliques, des résultats qui concordent avec les nôtres [274].

Les résultats de l'analyse qualitative effectuée par LC-MS/MS des fractions les plus antioxydants obtenues à partir du fractionnement des extraits dichlorométhane et éthanolique sont présentés dans les tableaux 3.15. Ces résultats ont clairement montré la richesse des fractions obtenues, dont 18 et 21 molécules ont été identifiées dans les fractions de *Salvia microphylla* MFD2 et MFE3. Tandis que, seize composés ont été identifiés dans les deux fractions de *Salvia officinalis* OFD4 et OFE4.

D'après le tableau 3.15, chaque fraction contient une liste de composés chimiques avec leurs propriétés spécifiques. En ce qui concerne les acides phénoliques, les fractions MFD2 et MFE3 de *Salvia microphylla* présentent plusieurs composés majeurs en commun, tels que l'acide caféique, l'acide cis-p.coumarique, l'acide salicylique, l'acide férulique et la vanilline. Toutefois, la fraction MFE3 renferme d'autres acides phénoliques, tels que l'acide 4-méthoxybenzoïque, l'acide 2-méthoxybenzoïque et l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque, qui ne sont pas présents dans la fraction MFD2.

Concernant les flavonoïdes, les deux fractions (MFD2 et MFE3) présentent des profils similaires, tels que la vitexine, la quercétine, la rutine, l'hespérétine et la myricétine.

De plus, la fraction MFD2 se distingue par la présence de la catéchine et de la naringénine, deux flavonoïdes absents dans la fraction MFE3.

Les deux fractions contiennent également du bêta-carotène (un caroténoïde) et de l'acide oléanolique, un triterpénoïde. On trouve également dans ces fractions l'acide kojique, l'acide folique (vitamine B9) et la caféine. L'hydrate d'esculine, un composé phénolique, a été identifié dans les quatre fractions analysées.

Tableau 3.15 : Composés identifiés par LC-MS/MS des fractions les plus antioxydants des extraits dichlorométhane et éthanolique de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* (MFD2, MFE3, OFD4 et OFE4)

N° Pic	Composés	MFD2	MFE3	OFD4	OFE4
1	Acide 4-méthoxybenzoïque	-	+	+	+
2	Acide coumarique	-	+	+	+
3	Acide 2-méthoxybenzoïque	-	+	-	-
4	Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	-	+	-	+
5	Acide salysilique	+	+	-	-
6	Acide caféique	+	+	-	+
7	Acide cis-p.coumarique	+	+	-	-
8	Acide férulique	+	+	+	-
9	vanilline	+	+	+	+
10	Catéchine	+	-	+	+
11	Hespérétine	+	+	+	-
12	Lutéoline	-	-	+	+
13	Myricétine	+	+	+	+
14	Naringénine	+	-	+	-
15	Quercétine	+	+	+	+
16	Rutine	+	+	+	+
17	Vitexine	+	+	-	-
18	Curcumine	-	+	-	-
19	Hydrate d'esculine	+	+	+	+
20	Verbascoside	-	-	-	+
21	Acide folique	+	+	+	+
22	Acide kojique	+	+	+	+
23	Bêta-carotène	+	+	-	-
24	Caféine	+	+	+	+
25	Acide oléanolique	+	+	+	+

+ : Présent, - : Absent

Les deux fractions de *Salvia officinalis* (OFD4 et OFE4) ont révélé une composition riche et variée en acides phénoliques et en flavonoïdes. La fraction OFE4 se distingue par la présence de l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque et l'acide caféique, qui ne sont pas présents dans la fraction OFD4. Tandis que, la fraction OFD4 montre la présence de flavonoïdes l'hespérétine et la naringénine.

En conclusion, les résultats obtenus de l'analyse LC-MS/MS concordent à ceux obtenus du dosage spectrophotométrique. La teneur élevée en composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) dans les extraits et les fractions des deux plantes étudiées a été expliquée.

3.3.2 Évaluation des activités biologiques des extraits des deux espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*

3.3.2.1 Activité antioxydante

3.3.2.1.1 Activité antioxydante des extraits dichlorométhane et éthanolique et de leurs fractions des deux espèces étudiées

Le pouvoir antioxydant des extraits chloroformique et éthanolique bruts et leurs fractions, a été déterminé par piégeage des radicaux libres DPPH. La capacité des extraits à neutraliser les radicaux libres DPPH, ce qui se traduit par un changement de couleur de violet foncé à jaune pâle.

Le tableau 3.16 présente les résultats de l'activité antioxydante des extraits dichlorométhane (EDSM, EDSO) et éthanolique (EESM, EESO), ainsi que de leurs différentes fractions. Cette activité a été évaluée par le test de piégeage des radicaux libres DPPH. Les mesures de l'activité antioxydante sont exprimées en pourcentage d'inhibition (IP %) à une concentration finale de 200 µg/mL et en concentration nécessaire pour inhiber 50 % du radical libre DPPH (IC₅₀). Une valeur IC₅₀ plus faible indique une plus grande efficacité antioxydante. Pour comparaison, deux antioxydants standards, le BHT et le BHA, ont été utilisés. D'après les résultats représentés dans le tableau ci-dessus, les extraits et ses fractions présentent une bonne activité antiradicalaire. L'activité la plus faible est celle de l'extrait dichlorométhane de *Salvia microphylla* (EDSM) avec une IC₅₀ de 141,71 ± 3,72 µg/mL. Par contre, l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis* (EESO) révèle l'activité la plus élevée avec une IC₅₀ de 3,86 ± 1,52 µg/mL. Ces résultats est proche à celle obtenu par Karimzadeh et Farahpour [375], qui ont rapporté une activité antioxydante élevée pour l'extrait hydroéthanolique des feuilles de *Salvia officinalis* récoltées en Iran (IC₅₀ : 7,12 µg/mL).

Tableau 3.16 : Résultat du test de piégeage des radicaux libres de DPPH des extraits EDSM et EESM, ainsi que de leurs fractions.

Espèces	Échantillons	test de piégeage des radicaux libres de DPPH	
		IP (%)	IC ₅₀ µg/mL
<i>Salvia microphylla</i>	EDSM	73,88± 1,09	141,71± 3,72
	MFD1	91,30 ± 0,34	34,29 ± 3 ,24
	MFD2	93,39 ± 1,04	1,99 ± 0,19
	MFD3	90,70 ± 0,43	17,04 ± 1,96
	MFD4	95,70 ± 1,64	30,83 ± 1,67
	MFD5	94,80 ± 2,15	24,04 ± 0,44
	MFD6	81,20 ± 1,38	44,95 ± 2,14
	MFD7	80,74 ± 4,23	51,13 ± 3,62
	EESM	89,74± 2,04	56,98± 1,13
	MFE1	78,10 ± 5,34	32,67 ± 4,61
	MFE2	84,40 ± 0,26	9,12 ± 1,38
	MFE3	94,00 ± 1,15	1,91 ± 1,34
	MFE4	96,00 ± 1,15	3,05 ± 1,95
	MFE5	93,20 ± 6,55	28,21 ± 2,07
	MFE6	94,60 ± 1,52	11,02 ± 1,75
	MFE7	91,10 ± 2,82	16,93 ± 2,50
	<i>Salvia officinalis</i>	EDSO	80,52± 1,39
OFD1		14,76± 1,50	>200
OFD2		97,60 ± 1,74	16,83 ± 0,45
OFD3		96,02 ± 0,97	15,07 ± 2,16
OFD4		94,59 ± 1,18	6,49 ± 0,92
OFD5		91,75 ± 3,03	21,04 ± 1,24
OFD6		88,21 ± 2,44	39,45 ± 1,81
OFD7		81,70 ± 1,45	33,03 ± 2,07
EESO		96,23± 0,90	3,86± 1,52
OFE1		66,24 ± 4,41	83,60 ± 3,14
OFE2		95,42 ± 1,30	12,23 ± 1,03
OFE3		99,77 ± 0,75	3,37 ± 4,08
OFE4		96,00 ± 0,56	2,73 ± 1,27
OFE5		93,40 ± 2,95	13,31 ± 3,37
OFE6		91,00 ± 4,34	53,19 ± 2,25
OFE7		91,40 ± 5,26	19,61 ± 2,14
standards		BHA	88,43 ± 0,23
	BHT	87,28 ± 0,26	22.32 ± 1.19

D'une façon générale, les extraits éthanoliques sont plus actifs que les extraits dichlorométhane, ce qui est en accord avec ses teneurs plus élevés en polyphénols et en flavonoïdes. De plus, une corrélation positive significative entre l'activité antioxydante et la teneur en flavonoïdes et polyphénols totaux a été rapportée et démontrée par Wojdyło

et al. [381]. Ces résultats s'accordent parfaitement avec ceux de Choi et Jo [266, 267], qui ont observé une excellente activité antioxydante dans l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Salvia microphylla* de Corée, avec un pourcentage d'inhibition de $79,00 \pm 0,16$ % et $91,76 \pm 0,05$ % à une concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$. En revanche, des recherches menées sur l'espèce tunisienne ont montré que l'extrait méthanolique de *Salvia microphylla* possède une faible capacité antiradicalaire avec une IC_{50} de $830 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$.

Nous observons parmi les fractions issues des extraits de dichlorométhane que pour l'espèce *Salvia microphylla*, la fraction MFD2 présente une activité antioxydante particulièrement élevée (IC_{50} : $1,99 \pm 0,19$ $\mu\text{g/mL}$), suivi par la fraction MFD3 avec une IC_{50} de $17,04 \pm 1,96$ $\mu\text{g/mL}$. Tandis que pour *Salvia officinalis*, la fraction la plus active était OFD4 avec une IC_{50} de $6,49 \pm 0,92$ $\mu\text{g/mL}$ suivi par la fraction OFD3 avec IC_{50} de $15,07 \pm 2,16$ $\mu\text{g/mL}$. Toutes ces fractions ont été obtenues de la colonne chromatographique éluée avec un pourcentage de 5 à 20% de MeOH. Par ailleurs, dans les fractions des extraits éthanoliques le pourcentage de méthanol dans l'éluion des colonnes chromatographiques entre 40 et 60 % a donné les fractions les plus actives. Pour l'espèce *Salvia microphylla*, les fractions MFE3 et MFE4 ont montré un pouvoir antioxydant très important avec des IC_{50} de $1,91 \pm 1,34$ $\mu\text{g/mL}$ et $3,05 \pm 1,95$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement. De même pour les fractions OFE4 et OFE3 de *Salvia officinalis* avec des IC_{50} de $2,73 \pm 1,27$ $\mu\text{g/mL}$ et $3,37 \pm 4,08$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement. En outre, l'activité antioxydante des fractions MFD2 et MFE3 est presque équivalente (IC_{50} de 1,99 et 1,91 $\mu\text{g/mL}$), cela revient peut être à la similarité dans la composition chimique, dont on trouve des composés qui existent dans les deux fractions, tels que l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide salicylique, la quercétine, la rutine, la vitexine, la myricétine et l'hespéretine. Ces composés sont bien connus pour leurs propriétés antioxydantes [382-384]. De plus, la présence de β -carotène, un puissant antioxydant, reconnu pour sa forte activité biologique, protégeant les membranes cellulaires des dommages causés par l'oxydation [385, 386], et utilisé comme agent colorant dans les boissons [387]. Sa présence dans les deux fractions contribue ainsi à leur capacité à piéger les radicaux libres. Ces composés agissent en synergie pour neutraliser les radicaux libres, menant à des activités antioxydantes presque équivalentes.

Néanmoins, la légère supériorité de MFE3 pourrait être due à la présence d'acides phénoliques supplémentaires, comme l'acide 4-méthoxybenzoïque, l'acide 2-méthoxybenzoïque et l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque, absents de MFD2. Ces acides sont également réputés pour leur efficacité antioxydante. Les fractions OFE4 (IC_{50} : $2,73 \pm 1,27$ $\mu\text{g/mL}$) et OFD4 (IC_{50} : $6,49 \pm 0,92$ $\mu\text{g/mL}$) se distinguent par leur bonne

activité antioxydante, cela est sûrement lié à leurs compositions chimiques distinctes. La fraction OFE4, caractérisée par une légère prédominance d'acides phénoliques spécifiques tels que l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque et l'acide caféique [227].

En revanche, la fraction OFD4 est caractérisée par la présence des flavonoïdes comme l'hespéretine et la naringénine. Bien que la lutéoline, un flavonoïde présent dans les fractions OFD4 et OFE4, montre une activité notable de piégeage des radicaux libres DPPH. Cette efficacité antiradicalaire s'explique par la satisfaction de plusieurs critères essentiels : la présence d'un groupe 3',4'-ortho-dihydroxyle sur le noyau B, une double liaison C2=C3 conjuguée avec le groupe 4-oxo, ainsi qu'un groupe hydroxyle libre en position C5 [381].

3.3.2.1.2 Activité antioxydante des extraits obtenus de la macération à froid

Six méthodes ont été utilisées pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits (acétate d'éthyle, butanol, chloroforme et éther de pétrole) des deux espèces étudiées, y compris le test de DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, CUPRAC, la méthode de phénanthroline et le test de blanchissement du β-carotène.

Les extraits des deux espèces étudiés ont été évalués pour leurs capacités antioxydantes, comparativement aux activités des composés antioxydants standards, l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'α-tocophérol, l'acide ascorbique, l'acide tannique. Les résultats sont exprimés en termes d'IC₅₀ (μg/mL) pour les tests DPPH, ABTS et le test de blanchissement du β-carotène et en A_{0.5} (μg/mL) pour les méthodes CUPRAC, FRAP et la méthode de Phénanthroline.

A. Test de DPPH[•]

Le tableau 3.17 et La figure 3.21, présentent la variation des taux de piégeage du DPPH des extraits en fonction des différentes concentrations des deux espèces étudiées. Pour les extraits de *Salvia microphylla* les résultats obtenus par cette méthode montrent que l'extrait butanolique (EBSM) présente la plus forte activité antioxydante, avec une valeur d'IC₅₀ de 8,71 ± 0,33 μg/mL. Cette activité est plus importante que celle du BHT (butylhydroxytoluène) avec une IC₅₀ de 22,32 ± 1,19 μg/mL et légèrement moins efficace que le BHA (butylhydroxyanisole) avec une IC₅₀ de 5,73±0,41 μg/mL.

De même, l'IC₅₀ de l'extrait acétate d'éthyle (EASM) est de 16,61 ± 0,28 μg/mL, ce qui indique que cet extrait a une activité antioxydante comparable au BHA, mais supérieure au BHT.

Par ailleurs l'extrait chloroformique (ECSM) montre une activité antioxydante beaucoup plus faible par rapport au standards avec une IC₅₀ de 85,61 ± 2,88 μg/mL.

Tableau 3.17 : Inhibition du radical DPPH par les différents extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

	% d'inhibition dans le test DPPH							IC ₅₀ µg/mL
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	
EASM	6,72±1,35	17,57±2,20	39,37±1,22	74,66±1,64	87,76±1,66	89,55±1,95	SAT	16,61±0,28
EBSM	17,72±1,98	36,04±0,74	72,13±5,41	87,95±1,20	88,55±1,02	89,90±1,21	SAT	8,71 ±0,33
ECSM	NA	NA	10,04 ±1,98	20,49 ±2,21	33,89 ±1,80	56,62 ±2,21	83,04 ±1,18	85,61 ±2,88
EASO	14,29±0,69	31,38±1,60	56,26±0,69	80,95±1,19	84,68±0,20	SAT	SAT	10,74 ±0,05
EBSO	0,93±1,78	6,04±1,98	17,56±1,31	31,71±3,60	56,59±1,68	80,49±0,41	SAT	43,42 ±0,89
ECSO	NA	2,70±0,79	8,46±1,80	20,05±1,87	45,00±1,48	81,93±0,39	SAT	59,57 ±0,90
BHA	28,95±1,16	54,33±1,59	76,76±1,65	84,09±0,35	87,53±0,82	87,73±0,15	88,43±0,23	5,73±0,41
BHT	11,69±1,88	22,21±1,30	37,12±1,80	52,63±2,70	68,02±0,53	83,60±0,23	87,28±0,26	22,32±1,19

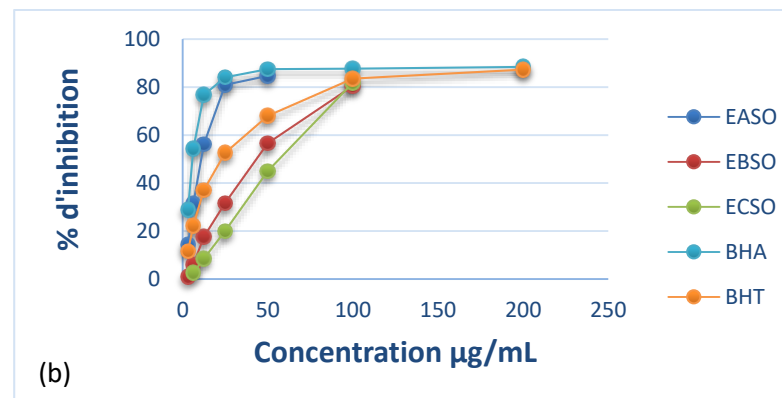
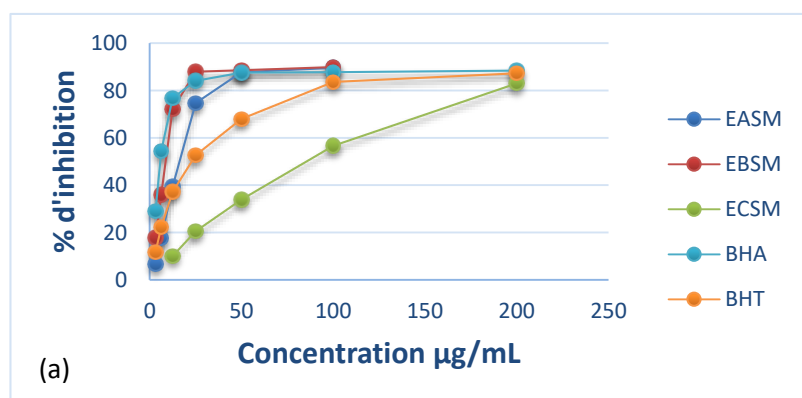


Figure 3.21 : Variation du taux de piégeage du DPPH en fonction des différentes concentrations de *Salvia microphylla* (a) et de *Salvia officinalis* (b).

En ce qui concerne les extraits de *Salvia officinalis*, l'extrait acétate d'éthyle (EASO) présente la plus forte activité antioxydante avec une IC_{50} de $10,74 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$. L'extraits butanolique (EBSO) montre également une activité antioxydante notable, bien qu'inférieure à celle de l'EASO, avec une IC_{50} égale à $43,42 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$. En revanche, l'extrait chloroformique (ECSO) présente la moins forte activité antioxydante parmi les extraits évalués, nécessitant une concentration plus élevée (IC_{50} : $59,57 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$) pour atteindre le même niveau d'inhibition des radicaux libres.

Les valeurs des IC_{50} pour les extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* et les standards sont données en $\mu\text{g/mL}$ et sont illustrées dans la figure 3.22.

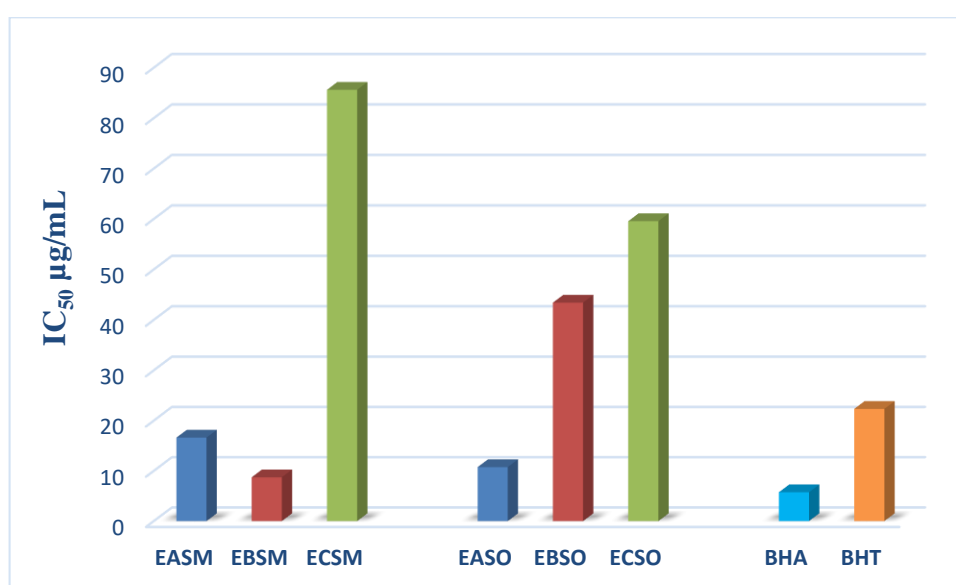


Figure 3.22 : Les valeurs d' IC_{50} des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ainsi que des standards dans le test DPPH.

D'après les résultats obtenus avec cette méthode et en comparaison avec les produits de référence, les extraits sont classés par ordre d'efficacité de la manière suivante :

BHA > EBSM > EASM > BHT > ECSM

BHA > EASO > BHT > EBSO > ECSO

B. Test de l'ABTS

Les données expérimentales obtenues sont présentées dans le tableau 2.18. Les concentrations nécessaires pour inhiber 50 % de l'activité du radical $ABTS^{*+}$ (IC_{50}) ont été déterminées à partir des courbes représentant le pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^{*+}$ en fonction des concentrations des extraits testés (figures 2.23).

Tableau 3.18 : Inhibition du radical DPPH par les différents extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

	% d'inhibition dans le test ABTS							IC ₅₀ µg/mL
	1,5625	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	
EASM	19,56±2,01	36,76±3,12	63,32±4,74	87,27±2,18	91,80±1,14	SAT	SAT	4,76±0,43
EBSM	12,41±0,96	14,73±3,14	31,71±5,59	56,23±6,83	77,16±6,58	88,43±2,45	90,70±1,58	11,00±0,96
ECSM	NA	NA	NA	47,17±3,84	67,77±5,07	88,31±6,02	90,96±5,45	14,18±0,62
EASO	16,28±1,49	29,03±3,04	48,82±3,87	75,02±2,00	92,19±0,78	93,00±0,38	SAT	6,49±0,67
EBSO	7,52±0,30	12,00±1,76	21,32±4,91	41,32±1,47	62,47±3,33	84,64±2,21	92,24±1,17	17,72±1,70
ECSO	4,90±3,75	9,99±0,35	16,74±1,44	29,58±0,66	51,59±0,23	77,94±2,28	87,51±7,08	24,00±0,01
BHA	83,42±4,09	93,52±0,09	93,58±0,09	93,60±0,16	93,63±0,95	94,20±0,90	95,39±2,62	1,03±0,00
BHT	49,22±0,75	59,22±0,59	78,55±3,43	90,36±0,00	92,18±1,27	93,37±0,86	94,87±0,87	1,59±0,03

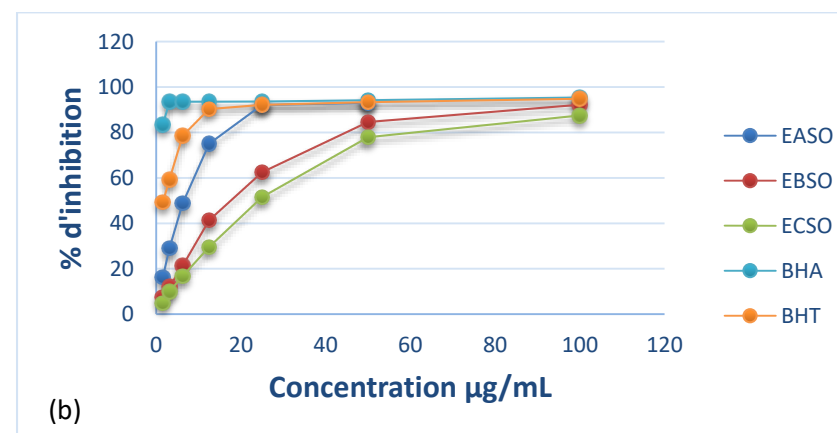
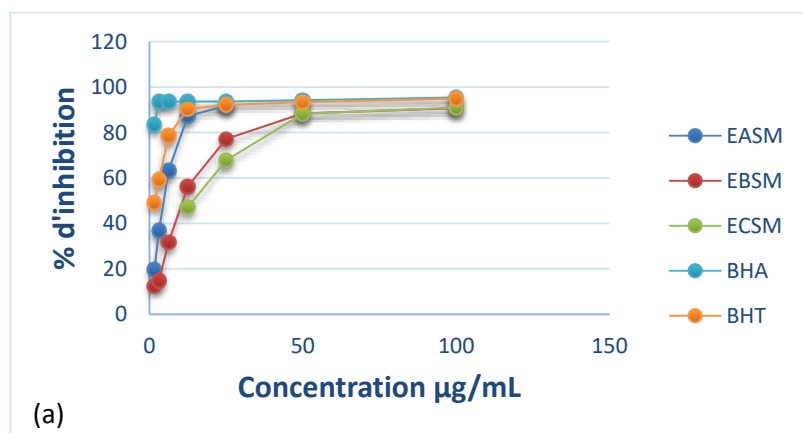


Figure 3.23 : Variation du taux de piégeage de ABTS^{•+} en fonction des différentes concentrations des extraits de *Salvia microphylla* (a) et de *Salvia officinalis* (b).

Parmi les extraits de *Salvia microphylla*, l'extrait acétate d'éthyles (EASM) se distingue par une activité antioxydante particulièrement élevée, avec une IC_{50} de $4,76 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$, indiquant une grande efficacité de cet extrait pour inhiber les radicaux $ABTS^{+}$. En revanche, l'EBSM (IC_{50} : $11,00 \pm 0,96 \mu\text{g/mL}$) et l'ECSM (IC_{50} : $14,18 \pm 0,62 \mu\text{g/mL}$) montrent une efficacité modérée par rapport à celle des antioxydants standards, BHA (IC_{50} : $1,03 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$) et BHT (IC_{50} : $1,59 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$).

Les valeurs IC_{50} des différents extraits des deux plantes étudiées sont illustrées dans la figure 3.24.

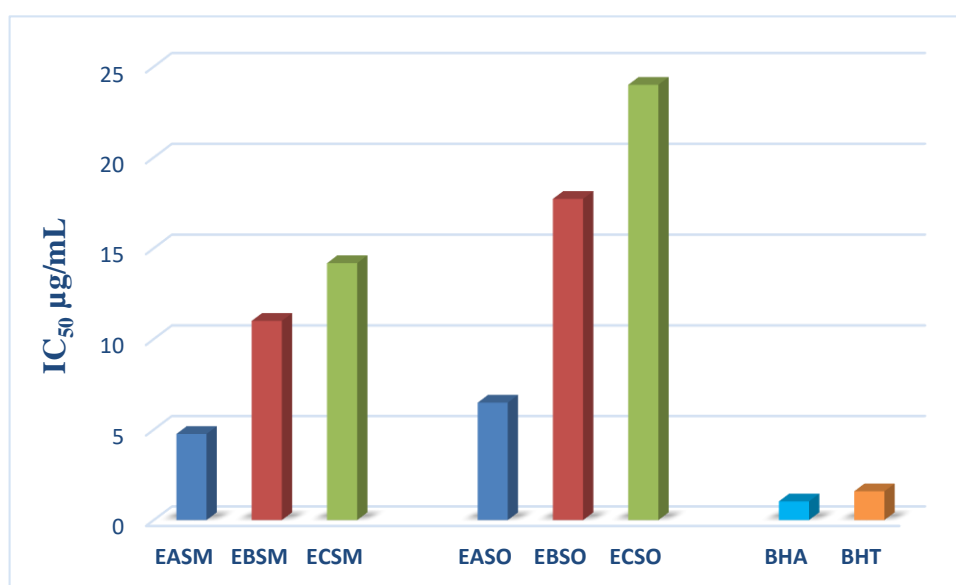


Figure 3.24 : Comparaison des valeurs d' IC_{50} des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* avec les standards dans le test ABTS.

En ce qui concerne les extraits de *Salvia officinalis*, l'EASO se distingue par la meilleure activité antioxydante, avec une IC_{50} de $6,49 \mu\text{g/mL}$. Bien que nettement moins élevée que celle des standards BHA (IC_{50} : $1,03 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$) et BHT (IC_{50} : $1,59 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$). Les autres extraits (EBSO et ECSO) présentent des IC_{50} plus élevées, respectivement de $17,72 \mu\text{g/mL}$ et $24,00 \mu\text{g/mL}$, indiquant une activité antioxydante plus faible par rapport aux standards.

L'ordre d'efficacité des extraits est le suivant :

BHA > BHT > EASM > EBSM > ECSM.

BHA > BHT > EASO > EBSO > ECSO.

Dans l'ensemble, bien que tous les extraits aient montrés une efficacité antioxydante, seul l'extrait d'acétate d'éthyle pour les deux espèces (EASM et EASO) a présenté une activité antioxydante très importante comparable à celle des antioxydants de synthèse le BHA et le BHT.

C. Test de réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats de la capacité antioxydante des différents extraits des deux espèces étudiées, ainsi que des standards BHA et BHT, déterminés à l'aide du complexe cuivre (II) (néocuproïne) (Cu(II)-Nc), sont présentés dans le tableau 3.19 ainsi que dans la figure 3.25.

Les standards BHA et BHT, utilisés comme références pour l'activité antioxydante, ont des valeurs $A_{0.5}$ de 3.64 ± 0.19 $\mu\text{g/ml}$ et 9.62 ± 0.87 $\mu\text{g/ml}$, respectivement.

Les extraits de *Salvia microphylla*, EASM et EBSM, démontrent une efficacité antioxydante proche des standards, avec des valeurs $A_{0.5}$ de $4,59 \pm 0,40$ $\mu\text{g/mL}$ et $10,71 \pm 0,56$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Par contre, l'ECSM affiche une valeur $A_{0.5}$ élevée de $144,92$ $\mu\text{g/mL}$, ce qui indique une faible activité antioxydante comparativement aux autres extraits.

En ce qui concerne les extraits de *Salvia officinalis*, l'EASO se distingue par sa valeur $A_{0.5}$ de $2,96$ $\mu\text{g/mL}$, inférieure à celle du BHA et du BHT, offrant ainsi une protection antioxydante accrue, suivi par l'EBSO qui affiche une valeur $A_{0.5}$ de $14,48 \pm 0,79$ $\mu\text{g/mL}$. En revanche, l'ECSO présente la valeur $A_{0.5}$ la plus élevée à $35,73 \pm 0,91$ $\mu\text{g/mL}$, ce qui en fait l'extrait le moins efficace.

Tableau 3.19 : Inhibition du CUPRAC par les extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

	Absorbances dans la méthode CUPRAC							$A_{0,50}$ $\mu\text{g/mL}$
	3,125 $\mu\text{g/mL}$	6,25 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	
EASM	0,40 \pm 0,04	0,62 \pm 0,03	0,99 \pm 0,05	1,64 \pm 0,20	2,66 \pm 0,27	3,72 \pm 0,72	SAT	4,59\pm0,40
EBSM	0,26 \pm 0,01	0,37 \pm 0,02	0,55 \pm 0,02	0,86 \pm 0,02	1,48 \pm 0,06	2,18 \pm 0,28	SAT	10,71\pm0,56
ECSM	NA	NA	0,15 \pm 0,00	0,20 \pm 0,00	0,31 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,60 \pm 0,02	144,92\pm1,42
EASO	0,55 \pm 0,05	0,81 \pm 0,02	1,26 \pm 0,11	1,66 \pm 0,04	2,80 \pm 0,05	3,98 \pm 0,09	4,22 \pm 0,18	2,96 \pm0,33
EBSO	NA	NA	0,46 \pm 0,03	0,72 \pm 0,01	1,21 \pm 0,07	2,02 \pm 0,16	3,11 \pm 0,11	14,48\pm0,79
ECSO	NA	NA	0,27 \pm 0,01	0,40 \pm 0,02	0,63 \pm 0,02	1,06 \pm 0,07	1,63 \pm 0,03	35,73\pm0,91
BHA	0,46 \pm 0,00	0,78 \pm 0,01	1,34 \pm 0,08	2,36 \pm 0,17	3,45 \pm 0,02	3,76 \pm 0,03	3,93 \pm 0,01	3,64\pm0,19
BHT	0,19 \pm 0,01	0,33 \pm 0,04	0,66 \pm 0,07	1,03 \pm 0,07	1,48 \pm 0,09	2,04 \pm 0,14	2,32 \pm 0,28	9,62\pm0,87

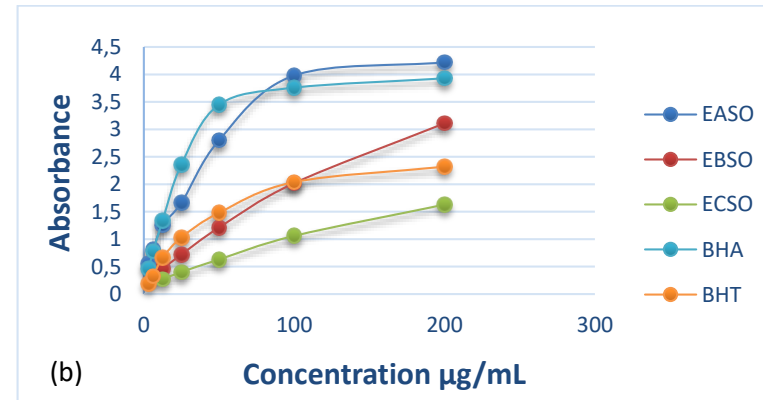
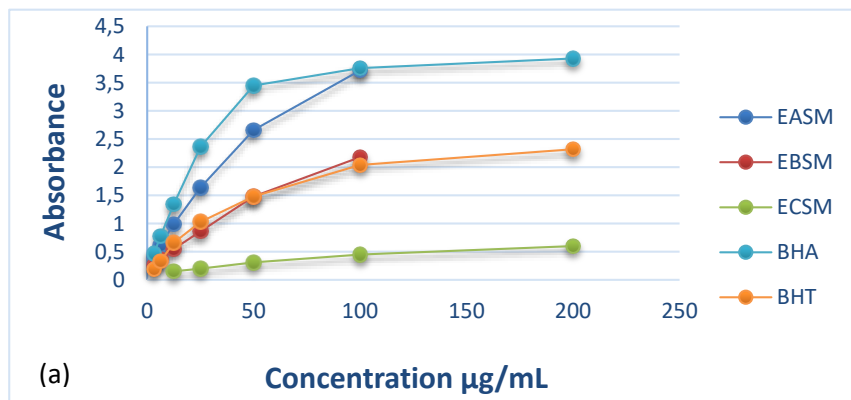


Figure 3.25 : Variation des absorbances dans le test CUPRAC en fonction des différentes concentrations des extraits de *Salvia microphylla* (a) et de *Salvia officinalis* (b).

En comparaison avec les standards, nous avons classé les extraits par ordre d'efficacité :

BHA > EASM > BHT > EBSM > ECSM

EASO > BHA > BHT > EBSO > ECSO

Ces résultats ont été exprimés en $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/ml}$) et représentés sur la figure 3.26.

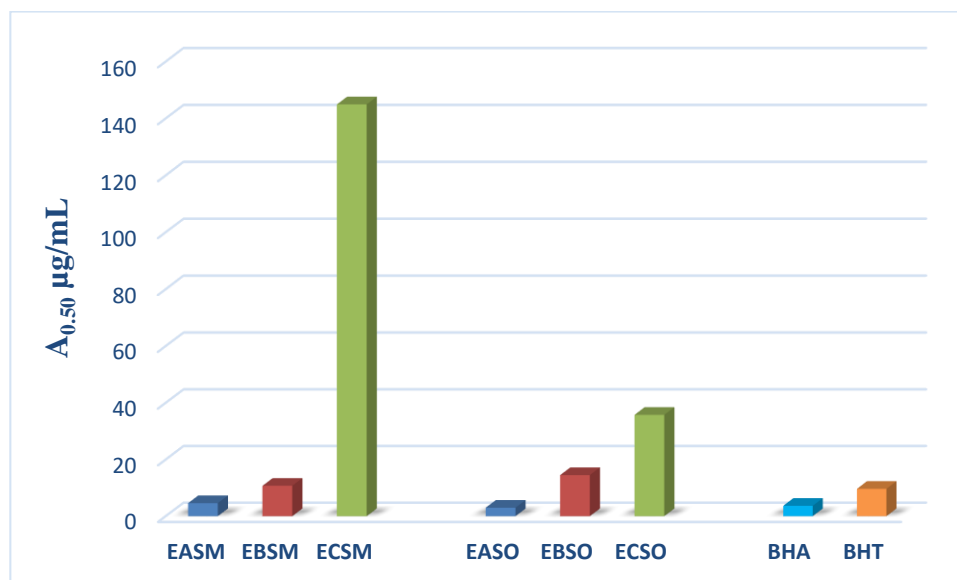


Figure 3.26 : Valeurs $A_{0.5}$ des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ainsi que des standards selon la méthode CUPRAC.

En conclusion, l'extrait acétate d'éthyle pour les deux espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a montré une capacité antioxydante très élevée par rapport aux standards. Cet extrait pourrait être considéré comme de potentiels agents antioxydants naturels.

D. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) mesure la capacité des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en ferreux (Fe^{2+}), un indicateur de l'activité antioxydante. Les résultats illustrés sur la figure 3.27 et le tableau 3.20, montrent que la capacité de réduction des ions Fe^{3+} en Fe^{2+} augmente proportionnellement avec la concentration.

Tableau 3.20 : Pouvoir réducteur des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* en fonction de la concentration.

	Absorbances dans la méthode de FRAP							
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	A _{0,50} µg/mL
EASM	0,32±0,03	0,49±0,02	0,72±0,04	1,22±0,11	1,47±0,00	1,59±0,02	1,29±0,28	6,92±0,21
EBSM	0,16±0,02	0,22±0,02	0,37±0,02	0,48±0,06	0,79±0,10	0,88±0,13	1,44±0,23	25,75±0,56
ECSM	0,07±0,01	0,10±0,01	0,15±0,01	0,24±0,02	0,35±0,01	0,63±0,07	0,87±0,06	77,29±2,72
EASO	0,25±0,01	0,39±0,01	0,68±0,00	0,75±0,15	0,83±0,12	0,90±0,05	1,34±0,12	8,69±0,06
EBSO	0,11±0,02	0,16±0,00	0,29±0,02	0,40±0,02	0,65±0,01	0,89±0,04	1,13±0,07	37,41±2,53
ECSO	0,09±0,00	0,12±0,00	0,17±0,01	0,27±0,00	0,44±0,01	0,78±0,02	1,01±0,07	67,11±0,42
Acide ascorbique	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	6,77±1.15
Acide tannique	0,28±0,02	0,78±0,06	1,02±0,07	1,24±0,18	SAT	SAT	SAT	5,39±0.91
α-Tocophérol	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	34,93±2.38

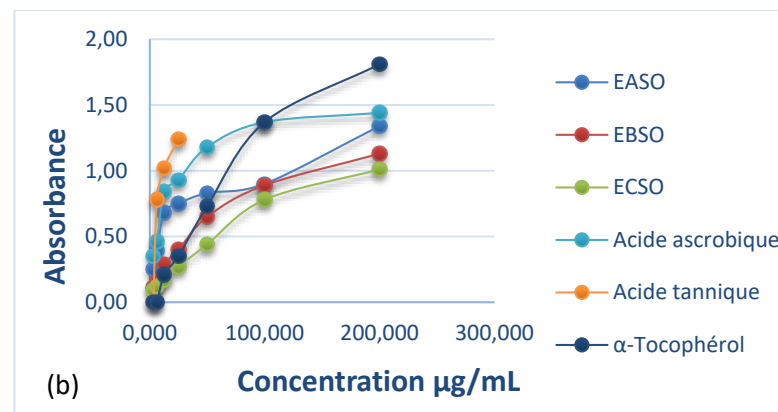
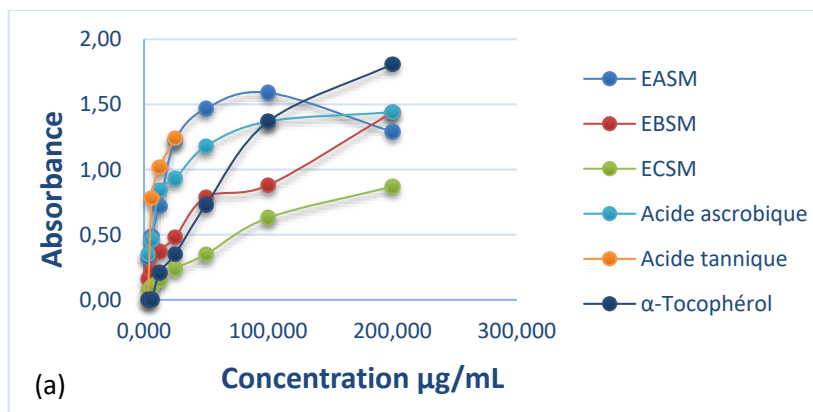


Figure 3.27 : Variation des absorbances dans le test de FRAP en fonction des différentes concentrations des extraits de *Salvia microphylla* (a) et de *Salvia officinalis* (b).

Pour les extraits de *Salvia microphylla*, l'extrait d'acétate (EASM) présente une très forte activité antioxydante, avec une $A_{0.5}$ de $6,92 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$, se rapprochant de la performance de l'acide ascorbique et de l'acide tannique avec une $A_{0.5}$ de $6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$ et $5,39 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$, respectivement. L'extrait de butanol (EBSM), avec une $A_{0.5}$ de $25,75 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$, présente une bonne activité antioxydante modérée, dépassant celle de l' α -Tocophérol ($A_{0.5}$: $34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/mL}$). Tandis que, l'extrait de chloroforme (ECSM) affiche une activité relativement faible avec une $A_{0.5}$ de $77,29 \pm 2,72 \mu\text{g/mL}$, indiquant une efficacité nettement inférieure aux deux premiers extraits.

Pour l'espèce *Salvia officinalis* l'extrait acétate d'éthyle (EASO) ($A_{0.5} = 8,69 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$) se rapproche de l'acide ascorbique ($A_{0.5}$: $6,92 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$) et de l'acide tannique ($A_{0.5}$: $5,39 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$) en termes d'efficacité, ce qui montre une très bonne activité antioxydante. En outre, l'extrait butanolique (EBSO) ($A_{0.5}$: $37,41 \pm 2,53 \mu\text{g/mL}$) enregistre une activité comparables à celle de l' α -tocophérol ($A_{0.5}$: $34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/mL}$).

D'après les résultats de l'activité antioxydante obtenue avec la méthode de FRAP, et en comparaison avec les produits de référence, les extraits sont classés par ordre d'efficacité comme suit :

Acide tannique > Acide ascorbique > EASM > EBSM > α -tocophérol > ECSM

Acide tannique > Acide ascorbique > EASO > α -tocophérol > EBSO > ECSO

Les valeurs d'absorbance $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$) calculé à partir des courbes d'absorbance en fonction de la concentration sont représentées dans la figure ci-dessous.

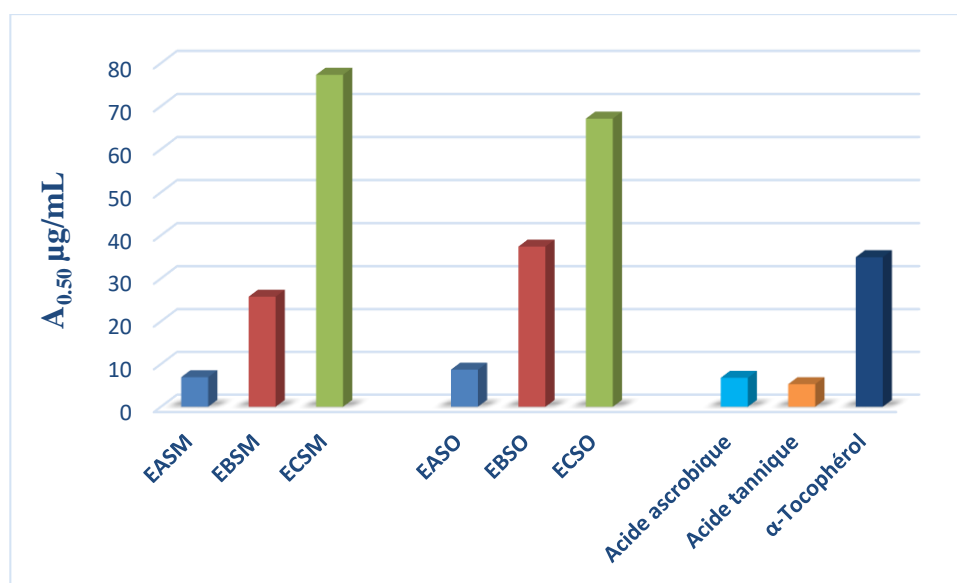


Figure 3.28 : Comparaison des valeurs d' $A_{0.5}$ des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* avec les standards dans le test FRAP.

Les résultats indiquent que les extraits acétate d'éthyle des deux espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ont une activité antioxydante très prometteuse, comparable aux standards forts comme l'acide ascorbique et l'acide tannique. Les autres extraits ont des efficacités variées, avec l'extrait chloroforme étant le moins efficace. Ces différences soulignent l'importance de choisir le bon solvant d'extraction pour maximiser l'activité antioxydante des extraits de plantes.

E. Test de blanchissement du β -carotène

Les résultats d'activité antioxydante pour les extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* sont exprimés en termes d'IC₅₀, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour inhiber 50 % de l'oxydation du β -carotène. Les valeurs d'IC₅₀ sont comparées à celles des standards, le BHA et le BHT, qui sont des antioxydants de synthèse bien connu (Tableau 3.21 et figure 3.29).

Les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanol de *Salvia microphylla* (EASM, EBSM) et *Salvia officinalis* (EASO, EBSO) n'ont pas d'activité antioxydante détectable aux concentrations testées.

L'extrait de chloroforme de *Salvia microphylla* (ECSM) montre une activité antioxydante modérée (IC₅₀ : 461,35±0,58 μ g/mL), tandis que l'extrait ECSO montre une inhibition très faible par rapport aux standards, avec un IC₅₀ supérieur à 800 μ g/mL.

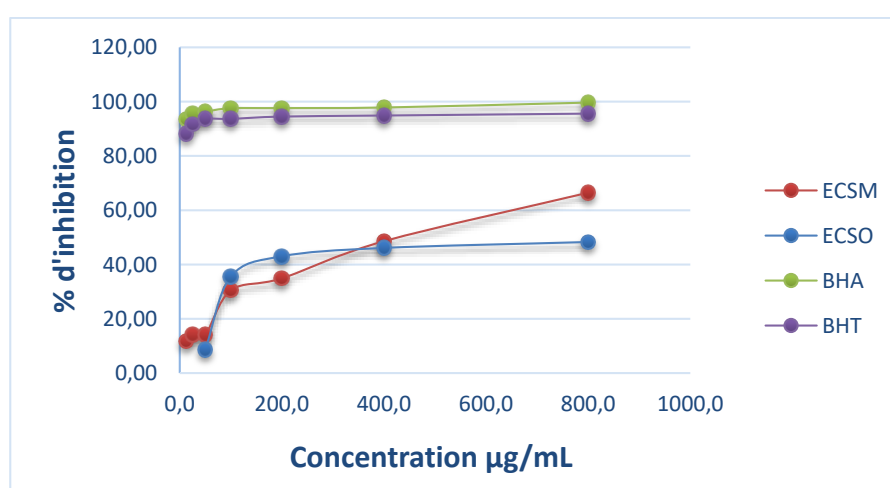


Figure 3.29 : Variation du pourcentage d'inhibition de blanchissement du β -carotène par les extraits chloroformique de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* en fonction des différentes concentrations.

Tableau 3.21 : Activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène en présence des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

% d'inhibition dans le Test de blanchissement du β -carotène								
	12,5 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	400 $\mu\text{g/mL}$	800 $\mu\text{g/mL}$	IC₅₀ $\mu\text{g/mL}$
EASM	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EBSM	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ECSM	11,76 \pm 4,28	14,25 \pm 5,08	14,13 \pm 0,61	30,50 \pm 6,56	34,92 \pm 4,78	48,58 \pm 5,70	66,45 \pm 4,17	461,35\pm0,58
EASO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EBSO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ECSO	NA	NA	8,64 \pm 1,31	35,48 \pm 0,75	43,02 \pm 1,42	46,10 \pm 1,82	48,28 \pm 1,11	>800
BHA	93,48 \pm 0,44	95,52 \pm 0,33	96,34 \pm 0,55	97,56 \pm 0,19	97,64 \pm 2,22	97,85 \pm 0,32	99,66 \pm 0,52	1,05\pm0,03
BHT	88,29 \pm 0,10	91,70 \pm 0,36	93,65 \pm 0,30	93,68 \pm 0,46	94,49 \pm 0,07	94,88 \pm 0,10	95,58 \pm 0,19	0,91\pm0,01

Tableau 3.22 : Activité phénanthroline des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

	Absorbances dans méthode de phénanthroline							
	0.390 µg/mL	0.781 µg/mL	1.562 µg/mL	3.125 µg/mL	6.25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL	A _{0.50} µg/mL
EASM	NA	0,34±0,02	0,42±0,01	0,49±0,02	0,67±0,01	1,05±0,07	1,71±0,09	3,18±0,19
EBSM	NA	0,31±0,00	0,34±0,02	0,39±0,02	0,52±0,02	0,71±0,02	1,17±0,14	6,06±0,47
ECSM	NA	NA	NA	0,47±0,01	0,49±0,03	0,57±0,01	0,70±0,03	6,34±1,90
EASO	0,25±0,01	0,29±0,01	0,36±0,02	0,46±0,01	0,58±0,01	0,93±0,05	1,54±0,09	4,17±0,22
EBSO	NA	0,21±0,01	0,24±0,01	0,27±0,00	0,33±0,02	0,44±0,02	0,70±0,03	15,11±1,04
ECSO	NA	NA	NA	0,22±0,01	0,26±0,01	0,31±0,01	0,42±0,01	34,04±1,04
BHA	NA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	0,93±0,07
BHT	NA	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	2,24±0,17

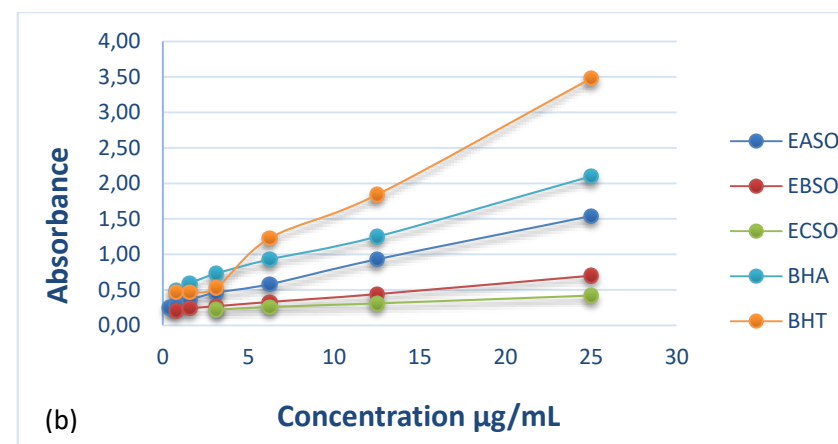
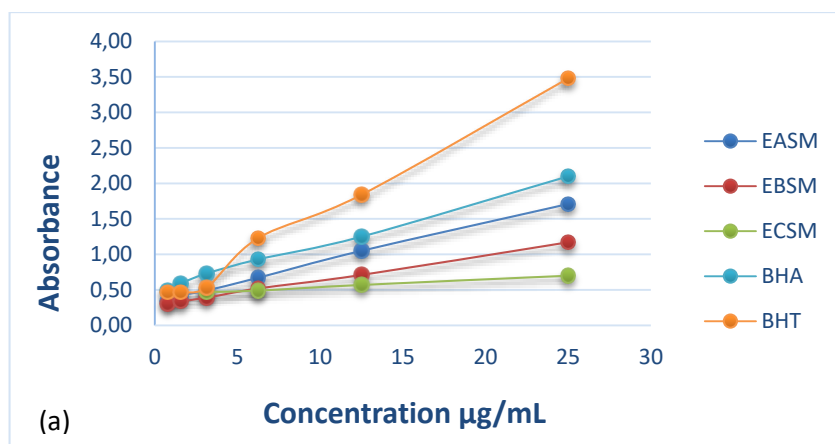


Figure 3.30 : Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits de *Salvia microphylla* (a) et de *Salvia officinalis* (b) dans le test de phénanthroline.

F. Test de l'activité phénanthroline

Le test du phénanthroline a été utilisé pour mesurer le fer dans de nombreux types d'échantillons. Les résultats obtenus dans ce test, nous permettent de tracer une courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration (figure 3.30). Les valeurs de l'absorbance $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$) de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* calculé à partir des courbes d'absorbance en fonction de la concentration sont représentées dans le tableau ci-dessus (tableau 3.22).

Pour l'espèce *Salvia microphylla*, l'extrait acétate d'éthyle (EASM) présente la meilleure activité antioxydante avec une $A_{0.5}$ de $3,18 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$, bien qu'inférieure à celle des standards synthétiques (BHA et BHT). Les extraits de butanol et de chloroforme (EBSM et ECSM) montrent également une bonne activité antioxydante dont les valeurs de $A_{0.5}$ sont très proche $6,06 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$ et $6,34 \pm 1,90 \mu\text{g/mL}$, respectivement (figure 3.31).

L'extrait acétate (EASO) de *Salvia officinalis* montre également une bonne activité antioxydante avec une $A_{0.5}$ de $4,17 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$, bien qu'un peu moins efficace que celui de l'EASM. Les extraits de butanol (EBSO) et chloroforme (ECSO) ont des valeurs $A_{0.5}$ plus élevées, ce qui signifie qu'ils sont moins efficaces pour neutraliser les radicaux libres par rapport à l'extrait acétate de la même plante (figure 3.31).

Les résultats obtenus permettent de classer l'efficacité de nos extraits comme suit : l'extrait acétate d'éthyle puis l'extrait butanolique et enfin l'extrait chloroformique et cela pour les deux espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

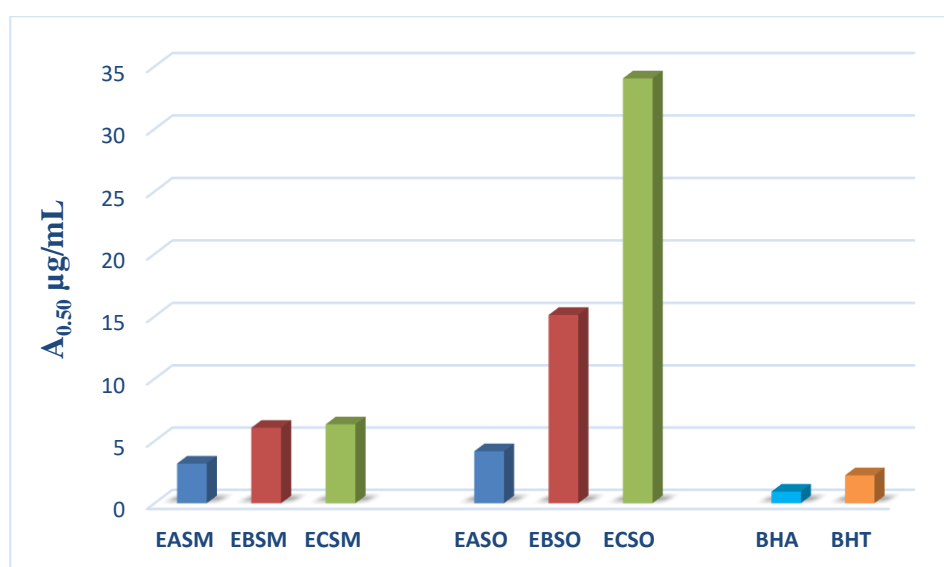


Figure 3.31 : Valeurs $A_{0.5}$ des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* ainsi que des standards obtenues par la méthode de phénanthroline

Salvia microphylla semble présenter une meilleure activité antioxydante globale par rapport à *Salvia officinalis*, en particulier avec son extrait d'acétate d'éthyle.

G. Discussion

L'étude de l'activité antioxydante de divers extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* (EA, EB et EC) révèle que leur efficacité varie en comparaison avec les standards de référence, selon les méthodes utilisées. Les résultats obtenus mettent en évidence une variation dans la composition chimique de chaque extrait, influençant les performances antioxydantes observées. Cette variabilité résulte à la fois de la nature chimique des extraits et des méthodes d'évaluation employées. Il est largement reconnu que l'activité antioxydante des polyphénols présents dans les extraits végétaux découle de leur capacité à céder des atomes d'hydrogène ou des électrons, ainsi qu'à capturer les radicaux libres [388]. Par conséquent, les plantes présentant une concentration élevée de groupes phénoliques affichent une activité antioxydante significative. De ce fait, les flavonoïdes exercent une puissante activité antioxydante, comme l'ont démontré N'guessan et al. [389] ainsi que Zhi et al. [390].

Les résultats des tests, tels que DPPH[•], ABTS^{•+}, CUPRAC, FRAP et la phénanthroline, montrent que les extraits d'acétate d'éthyle et butanoliques des deux espèces sont les plus actifs. Cela pourrait s'expliquer par la complexité des extraits, riches en composés phénoliques, incluant les acides phénoliques et les flavonoïdes, ainsi que par la synergie entre ces composés, ce qui améliore leur activité antioxydante [391].

Le test du β -carotène s'apparente à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, où les antioxydants apolaires se regroupent à l'interface entre les lipides et l'eau, empêchant ainsi la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène. Cela met en évidence leurs importantes propriétés antioxydantes. En revanche, les antioxydants polaires s'avèrent moins efficaces pour protéger les lipides, car ils restent dans la phase aqueuse. Nos résultats confirment cela, montrant que seul l'extrait chloroformique des deux espèces a démontré une activité antioxydante significative [392].

À notre connaissance, ce rapport est le premier dans la littérature à évaluer l'activité antioxydante des différents extraits (acétate d'éthyle, butanolique et chloroformique) de *Salvia microphylla* en utilisant les six tests appliqués.

D'un point de vue pharmacologique et selon les résultats obtenus par LC-MS/MS, la présence d'acide vanillique, de lutéoline, de naringénine, ainsi que de bêta-carotène, un caroténoïde aux puissantes propriétés antioxydantes [385, 386], en particulier dans l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia microphylla* (EASM), pourrait être responsable de l'activité

observée pour cet extrait dans toutes les méthodes testées. Cependant, l'extrait butanolique (EBSM) a montré une activité de piégeage plus efficace contre le radical DPPH, ce qui pourrait s'expliquer par la présence de chryisine, un flavonoïde présent uniquement dans l'EBSM.

L'extrait acétate d'éthyle de *Salvia officinalis* (EASO) a présenté les meilleures activités antioxydantes dans tous les tests, à l'exception du test de blanchiment du β -carotène, où il s'est avéré inactif. Cet extrait a démontré la plus forte capacité de piégeage du radical DPPH. Cette activité élevée est probablement due à la présence exclusive de l'acide gallique dans l'extrait acétate d'éthyle (EASO). Des chercheurs ont souligné que la structure chimique et la polarité de l'antioxydant influencent sa capacité à capturer les radicaux libres. Il existe une hétérogénéité structurelle parmi les composés phénoliques, et l'acide gallique a été identifié comme le composé le plus actif lors des tests utilisant le DPPH. De plus, il a été signalé que l'acide caféique, ainsi que d'autres polyphénols extraits de *Salvia officinalis*, possède des propriétés antioxydantes remarquablement puissantes [393].

Nos résultats concordent avec l'étude menée sur les fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol de la partie aérienne de *Salvia officinalis* récoltée à Tlemcen. Cette étude, réalisée par Mahdi [287], a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle possédait la plus grande capacité de piégeage des radicaux libres DPPH, ainsi qu'une forte capacité de réduction du fer et une puissante activité antioxydante totale.

Les études menées sur les fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol de la partie aérienne de *Salvia officinalis* récoltée dans différentes régions du Maroc (Boulemane, Khénifra) ont révélé des différences significatives dans leur capacité antioxydante. Les extraits issus de la région de Boulemane ont montré une activité antioxydante nettement plus puissante que celle obtenue dans notre étude. Cependant, nos extraits (EASO et EBSO) ont démontré une meilleure efficacité antioxydante, évaluée par les méthodes DPPH et FRAP, que ceux récoltés dans la région de Khénifra [274].

En conclusion, d'après le classement de l'activité des extraits étudiés par différentes méthodes, il ressort que les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol sont les plus efficaces. Cette observation est en accord avec leurs concentrations élevées en polyphénols et en flavonoïdes. Ces résultats mettent en évidence le potentiel antioxydant des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol des espèces *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*, suggérant qu'ils pourraient constituer des sources prometteuses d'antioxydants naturels.

3.3.2.2 Activité anticholinestérase

L'activité anticholinestérase de différents extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a été testée en utilisant une combinaison de deux méthodes complémentaires : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE).

Dans le test d'inhibition de l'AChE, aucune activité n'a été enregistrée pour tous les extraits des deux espèces.

Le tableau 3.23 illustre les pourcentages d'inhibition de la butyrylcholinestérase à diverses concentrations (en $\mu\text{g/mL}$) des extraits, ainsi que de la galantamine, un médicament de référence souvent utilisé pour traiter des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Les valeurs d' IC_{50} , qui représentent la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique, sont des indicateurs clés de l'efficacité des inhibiteurs (figure 3.32). L'analyse comparative des données met en évidence des niveaux d'efficacité variés parmi les extraits étudiés.

Les extraits EASM, EBSM, EASO et EBSO montrent une efficacité limitée pour inhiber cette enzyme, avec des IC_{50} supérieurs à $200 \mu\text{g/mL}$, ce qui indique qu'ils ne sont pas très efficaces, même à des concentrations élevées. Parmi eux, l'extrait EASM affiche la plus forte inhibition, atteignant 34,16 % à $200 \mu\text{g/mL}$.

En revanche, l'extrait ECSM se distingue par une IC_{50} de $38,99 \pm 1,96 \mu\text{g/mL}$, ce qui indique une meilleure capacité d'inhibition par rapport à EASM et EBSM. Cependant, son efficacité est légèrement inférieure à celle de la galantamine, qui présente une IC_{50} de $34,75 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$. Bien que l'ECSM se rapproche de la galantamine en termes d'inhibition, il demeure un peu moins performant.

Enfin, l'extrait ECSO a une IC_{50} de $178,11 \pm 4,21 \mu\text{g/mL}$, montrant une efficacité légèrement supérieure à celle d'EASO et d'EBSO, mais il reste largement moins efficace que la galantamine.

L'ordre d'activité BChE des extraits est dans le même sens pour les deux espèces étudiées, il a été établi comme suit :

Galantamine > EC > EA > EB.

Tableau 3.23 : Pourcentages d'inhibition de l'activité de butyrylcholinestérase des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*.

% Inhibition de de la butyrylcholinestérase								
	3,125 µg/mL	6,25 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/MI	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
EASM	NA	NA	NA	12,60±2,47	19,81±0,31	32,99±4,81	34,16±7,12	>200
EBSM	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4,95±2,78	>200
ECSM	NA	12,03±3,58	22,78±2,24	37,76±4,03	59,92±0,90	71,52±4,92	SAT	38,99±1,96
EASO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	11,07±6,57	>200
EBSO	NA	NA	NA	NA	0,52±1,95	1,72±0,73	13,48±4,87	>200
ECSO	NA	NA	NA	NA	7,06±5,84	23,81±1,70	54,68±4,14	178,11±4, 21
Galantamine	3,26± 0,62	6,93± 0,62	24,03±2,94	45,13± 2,60	63,87± 2,85	73,57± 0,77	78,95±0,58	34,75±1,99

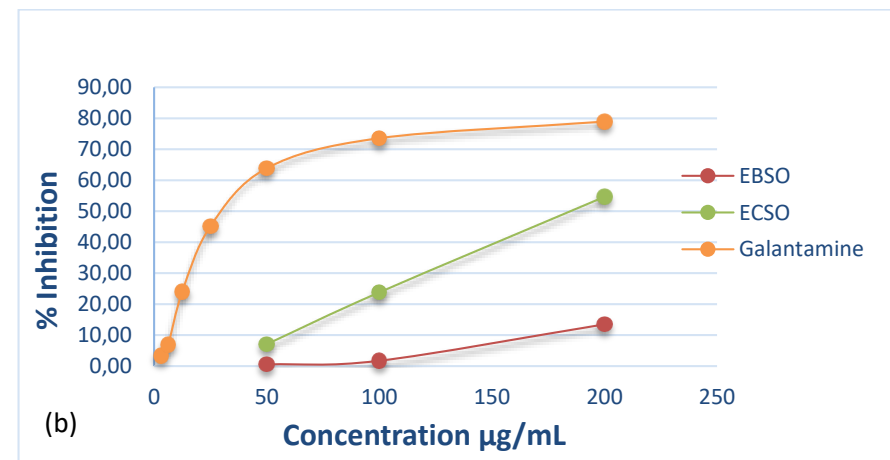
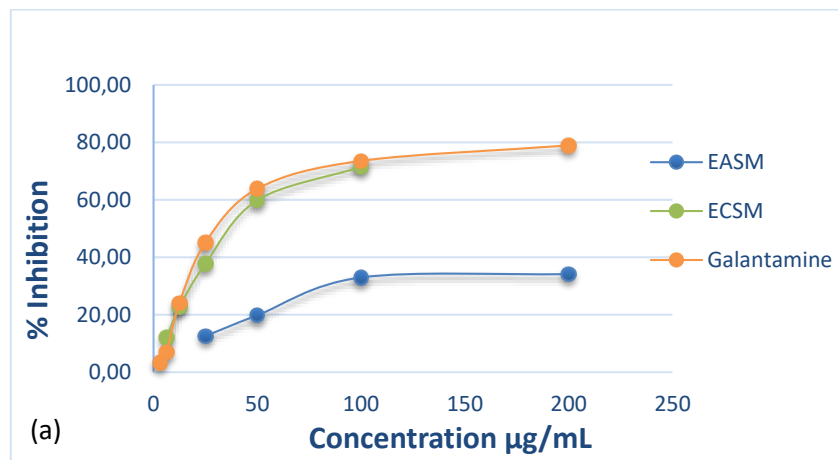


Figure 3.32 : Variation du pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinestérase des extraits de *Salvia microphylla* (a) et *Salvia officinalis* (b).

Dans cette étude, les extraits ECSM et ECSO ont démontré une efficacité supérieure pour inhiber l'activité de la BChE. Ce résultat indique que les extraits non polaires peuvent être classés comme des inhibiteurs des enzymes d'acétylcholinestérase. Ces observations suggèrent que les solvants organiques sont capables d'extraire efficacement des molécules ayant une inhibition optimale de l'enzyme [394].

Les différents extraits de *Salvia microphylla* ont été examinés pour la première fois afin d'évaluer leur capacité à inhiber l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Une étude réalisée sur des extraits éthanoliques de *Salvia microphylla* et de *Salvia officinalis* a révélé une activité neuroprotectrice significative dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer induite par la scopolamine. Ces extraits ont démontré leur capacité à diminuer la déposition de bêta-amyloïde, à inhiber l'activité de l'acétylcholinestérase et à réduire les marqueurs de stress oxydatif [270].

Une autre recherche chimique sur l'espèce *Salvia officinalis*, récoltée en Roumanie, a montré que l'extrait éthanolique de cette plante présente de fortes propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) [286].

En conclusion, *Salvia microphylla* renferme des composés bioactifs prometteurs, notamment dans ses extraits d'éther de pétrole et de chloroforme, ce qui justifie des recherches supplémentaires pour évaluer leur potentiel en tant qu'inhibiteurs de la BChE.

3.3.2.3 Activité inhibitrice de l' α -glucosidase

L' α -glucosidase joue un rôle clé dans le catabolisme des glucides. Son inhibition est essentielle pour réduire les niveaux de glucose dans le sang, représentant ainsi une stratégie thérapeutique importante dans la gestion du diabète de type 2. Dans cette partie, nous avons examiné l'effet inhibiteur des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* sur l' α -glucosidase. L'absence d'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été constatée dans tous les extraits de la plante *Salvia officinalis*, ainsi que dans les extraits butanolique et chloroformique de *Salvia microphylla* aux concentrations testées. Les résultats relatifs à l'inhibition de l' α -glucosidase par l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Salvia microphylla* sont présentés dans la figure 3.33.

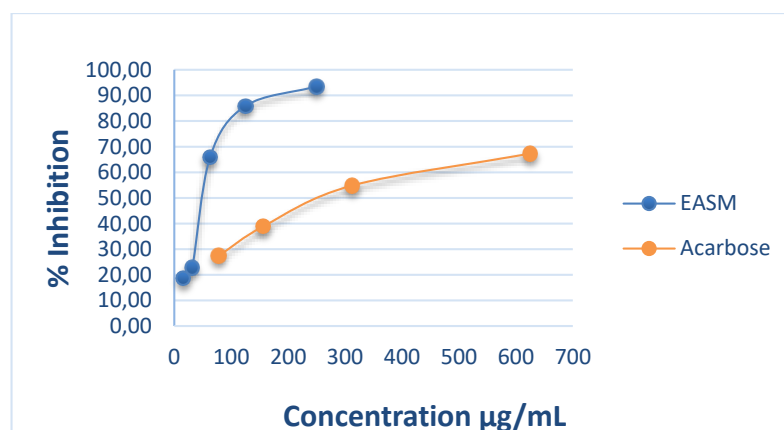


Figure 3.33 : Variation du pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase en fonction des différentes concentrations des extraits de *Salvia microphylla*.

Les résultats indiquent que l'extrait acétate d'éthyle (EASM) de la plante *Salvia microphylla* présente une activité inhibitrice prometteuse vis-à-vis de l' α -glucosidase. Son IC_{50} ($50,14 \pm 1,80 \mu\text{g/mL}$) est inférieur à celui de l'acarbose ($275,43 \pm 1,59 \mu\text{g/mL}$), ce qui suggère une inhibition très puissante.

Les activités antidiabétiques des extraits de l'espèce *Salvia microphylla* n'ont fait l'objet d'aucune investigation scientifique. Nos résultats sont comparables à ceux d'une étude menée sur la fraction d'acétate d'éthyle extraite de *Salvia officinalis* récoltée à Tlemcen, qui a révélé une activité antidiabétique supérieure, évaluée à travers des dosages d' α -amylase et d' α -glucosidase. Les valeurs d' IC_{50} obtenues étaient respectivement de $46,52 \pm 2,68 \mu\text{g/mL}$ et $104,58 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ [287].

Nos résultats montrent que les extraits de *Salvia officinalis* ne présentent aucune activité antidiabétique. Cependant, plusieurs études soulignent son potentiel dans ce domaine. Par exemple, Khacheba et ses collègues [395] ont observé un effet inhibiteur de l' α -glucosidase dans les extraits bruts de dix-huit plantes traditionnellement utilisées en Algérie pour traiter le diabète, y compris *Salvia officinalis*. De plus, d'autres recherches ont révélé que *Salvia officinalis* pourrait jouer un rôle dans la régulation de la glycémie, entraînant une réduction significative des niveaux de glucose et de cholestérol chez les patients diabétiques par rapport aux groupes témoins [396, 397].

Ces résultats révèlent que l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia microphylla* (EASM) pourrait être une source potentielle de nouveaux agents antidiabétiques. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour purifier et identifier les composés actifs impliqués dans l'inhibition de l'activité de l' α -glucosidase et pour évaluer leur efficacité et leur innocuité dans des modèles animaux et cliniques.

CONCLUSION

Dans le but de la recherche de nouvelles substances bioactives à intérêt thérapeutique, deux espèces de sauges ; *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis*, ont fait l'objet de la présente étude qui se concentre sur la détermination de la composition chimique et l'activité biologique de leurs huiles essentielles et de leurs extraits.

Les travaux de cette thèse ont d'abord porté sur l'étude de l'influence de la période de récolte, la méthode d'extraction et la partie de la plante utilisée sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles des deux espèces étudiées. A la lumière des résultats obtenus, nous avons adopté l'hydrodistillation conventionnelle comme procédé d'extraction des huiles essentielles, à partir des différentes parties des plantes (parties aériennes, des feuilles et des tiges), récoltées après la floraison. Les rendements obtenus sont respectivement 0,63 %, 0,75 % et 0,23 % pour les parties aériennes, les feuilles et les tiges de *Salvia microphylla*, et 1,42%, 1,89%, 0,54% pour *Salvia officinalis*.

L'analyse chimique des huiles essentielles par GC et GC-MS a conduit à l'identification de 36, 32 et 47 composés représentant 98,40%, 98,55% et 91,38% de la composition totale des parties aériennes, feuilles et tiges de *Salvia microphylla*, et de 33, 31 et 32 composés représentant 98,80%, 98,88% et 97,00% de la composition totale des parties aériennes, feuilles et tiges de *Salvia officinalis*. Le β -caryophyllène a été identifié comme le principal constituant des parties aériennes et des feuilles de *Salvia microphylla*, tandis que le camphre prédomine dans les mêmes parties de *Salvia officinalis*. En revanche, les composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles des tiges étaient l' α -Eudesmol pour *Salvia microphylla* et l' α -Thujone pour *Salvia officinalis*.

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux et des flavonoïdes ont été déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage exprimées successivement en microgramme équivalent d'acide gallique et microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'extraits sec. Les extraits d'acétate d'éthyle obtenu par macération et éthanolique obtenu par Soxhlet, des deux espèces étudiées, ont présenté les teneurs les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes.

Le potentiel antioxydant in vitro des huiles essentielles et des extraits sont évaluées par six méthodes complémentaires, à savoir : DPPH, ABTS^{•+}, FRAP, CUPRAC, la méthode

de Phénanthroline et le test de blanchissement du β -carotène. Les résultats ont révélé des activités antioxydantes intéressantes pour les extraits acétate d'éthyle des deux plantes dans les tests : DPPH^{*}, ABTS^{*+}, FRAP, phénanthroline et CUPRAC, en raison de leurs teneurs élevées en composés phénoliques. Par contre, les huiles essentielles ont donné un potentiel antioxydant faible, sauf l'huile essentielle extraite à partir des tiges qui a présenté un pouvoir antioxydant important par l'essai CUPRAC.

La composition chimique des deux extraits acétate d'éthyle et butanolique pour les deux espèces, ainsi que les quatre fractions obtenues par chromatographie sur colonne de gel de silice des extraits de dichlorométhane et éthanolique qui ont présentent l'activité antioxydante la plus élevée, a été déterminé par analyse par Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS/MS). Les résultats obtenus ont révélé la présence de 29 et 26 composés dans les extraits (EASM et EBSM) de *Salvia microphylla*, et 20 et 21 composés dans les extraits (EASO et EBSO) de *Salvia officinalis*, respectivement. 18 et 21 molécules ont été identifiées dans les fractions MFD2 et MFE3, respectivement. Tandis que, seize composés ont été déterminés dans chacune des fractions OFD4 et OFE4. La plupart de ces composés appartiennent à la famille des composés phénoliques (acides phénoliques et flavonoïdes).

L'activité anti-cholinestérasique des huiles essentielles et des extraits de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* a été réalisée en utilisant une combinaison de deux méthodes complémentaires : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). L'huile essentielle obtenue de la partie aérienne de *Salvia microphylla* a présenté une bonne activité contre l'acétylcholinestérase. Tandis que, l'activité la plus élevée contre la butyrylcholinestérase a été observée dans l'huile essentielle obtenue des tiges et dans l'extrait chloroformique de la même espèce.

L'huile essentielle extraite des tiges et l'extrait acétate d'éthyle de *Salvia microphylla* ont montré l'activité inhibitrice la plus puissante sur l'enzyme α -glucosidase, surpassant ainsi celle du standard, l'acarbose.

La méthode de microdilution en bouillon a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Salvia microphylla* et *Salvia officinalis* contre onze souches bactériennes et deux levures. Les huiles essentielles ont montré une meilleure activité contre toutes les souches bactériennes, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*. L'huile essentielle des tiges de *Salvia microphylla* a présenté l'efficacité la plus élevée, en

particulier contre *Enterobacter cloacae*. De plus, la plus forte activité antifongique de tous les échantillons testés a été observée contre *Candida albicans*.

En fin, à partir des résultats obtenus de cette étude, nous pouvons conclure que ces deux espèces de sauge peuvent être une source importante de composés antioxydants naturels et peuvent être utilisées pour les maladies chroniques neurodégénératives et antidiabétiques. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer leurs applications dans les domaines alimentaire, cosmétique et médicale, en particulier l'espèce *Salvia microphylla*.

PERSPECTIVES

- Isolement, purification et identification des composés spécifiques responsables des activités anticholinestérasiques, antidiabétiques et antioxydantes ;
- Confirmer les effets observés *in vitro* sur des modèles animaux pertinents de la maladie d'Alzheimer et du diabète de type 2 ;
- Élargissement du spectre d'activités biologiques par réalisation d'autres tests biologiques *in vivo* et *in vitro* (activité anti-inflammatoires, anticancéreuses, anti-enzymatiques, antivirales et insecticides) ;
- Utilisation des techniques de microencapsulation, notamment pour les huiles essentielles, afin de fournir des systèmes stables qui peuvent être utilisés dans les aliments et même dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

APPENDICE A
LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
AChE	l'acétylcholinestérase
ATCC	American Type Culture Collection
A _{0.5}	Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
BChE	Butyrylcholinestérase
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMF	Concentration minimale fongicide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DPPH	2,2-diphényl-1 picrylhydrazyl
EASM	Extrait acétate d'éthyle de <i>Salvia microphylla</i>
EASO	Extrait acétate d'éthyle de <i>Salvia officinalis</i>
EBSM	Extrait butanolique de <i>Salvia microphylla</i>
EBSO	Extrait butanolique de <i>Salvia officinalis</i>
ECSM	Extrait chloroformique de <i>Salvia microphylla</i>
EC SO	Extrait chloroformique de <i>Salvia officinalis</i>
EI	Electron Ionization
EPSM	Extrait éther de pétrole de <i>Salvia microphylla</i>
EPSO	Extrait éther de pétrole de <i>Salvia officinalis</i>
GC/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HE	huile essentielle
HEASM	Huile essentielle isolée des parties aériennes de <i>Salvia microphylla</i>
HEASO	Huile essentielle isolée des parties aériennes de <i>Salvia officinalis</i>
HEFSM	Huile essentielle isolée des feuilles de <i>Salvia microphylla</i>
HEFSO	Huile essentielle isolée des feuilles de <i>Salvia officinalis</i>
HEs	huiles essentielles

HETMS	Huile essentielle isolée des tiges de <i>Salvia microphylla</i>
HETSO	Huile essentielle isolée des tiges de <i>Salvia officinalis</i>
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
LC-MS/MS	Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem
MFD	Fraction dichlorométhane de <i>Salvia microphylla</i>
MFE	Fraction éthanolique de <i>Salvia microphylla</i>
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OFD	Fraction dichlorométhane de <i>Salvia officinalis</i>
OFE	Fraction éthanolique de <i>Salvia officinalis</i>
TFC	Le contenu en flavonoïdes totaux
TPC	Le contenu phénolique total

APPENDICE B

LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES EN FONCTION DE LA PERIODE DE RECOLTE

Appendice B 1 : La composition chimique des huiles essentielles de *salvia microphylla* selon la période de récolte.

N°	Composés	LRI	période de récolte « Teneur en % »										
			janvier	février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Septembre	Octobre	Novembre	
1	Tricyclène	923	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-	0,12
2	α -Thujène	925	0,24	0,24	-	-	0,14	0,21	-	0,44	0,28	0,18	
3	α -Pinène	939	2,53	2,15	0,87	0,93	1,49	1,73	4,09	3,91	2,74	3,56	
4	Camphène	952	2,74	2,48	1,18	1,17	1,6	1,44	4,04	3,74	2,65	3,74	
5	Sabinène	973	0,18	0,18	-	-	-	-	-	0,21	0,19	-	
6	β -Pinène	978	1,42	1,32	0,71	0,71	0,73	0,86	2,29	2,7	1,73	1,15	
7	β -Myrcène	992	-	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	α - Phellandrène	1002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	
9	α -Terpinène	1017	0,14	0,21	-	-	-	-	-	0,22	-	0,14	
10	P-Cymène	1026	0,45	0,55	0,46	0,39	0,33	0,3		0,57	0,48	0,65	
11	β -Phellandrène	1045	1,75	-	1,94	2,23	1,36	1,52	1,65	-	-	-	
12	1,8 Cinéol	1033	3,63	6,81	2,55	2,3	1,29	0,77	5,87	9,06	6,52	7,18	
13	γ -Terpinène	1060	0,63	1,23	0,8	1,01	0,39	0,65	-	0,58	0,43	0,23	
14	α -Thujone	1105	-	-	0,26	0,22	-	-	-	-	-	-	
15	Camphre	1145	2,01	2,88	1,9	1,73	0,99	1,19	2,61	3,03	2,37	3,17	
16	Bornéol	1166	0,7	1,27	0,91	1,18	0,54	0,61	-	0,33	0,47	0,81	
17	4-Terpinéol	1177	0,23	0,34	0,22	0,21		0,25	-	0,49	0,29	0,26	
18	Acétate de bornyl	1287	8,44	9,9	8,77	8,06	7,51	5,46	8,14	7,91	7,43	10,8	
19	δ -Elemène	1338	-	0,12	0,16	0,15	-	-	-	-	-	-	

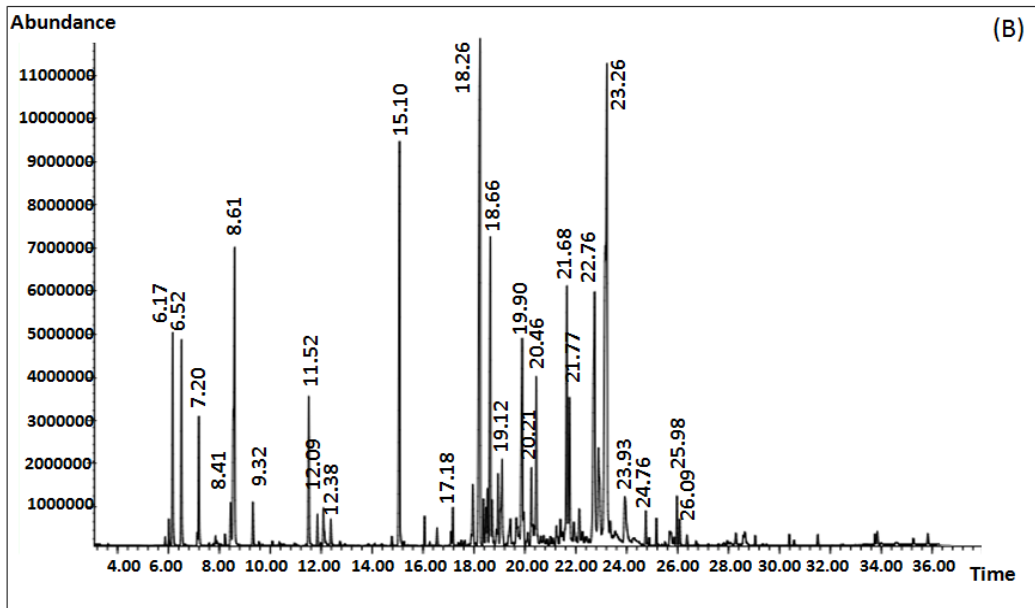
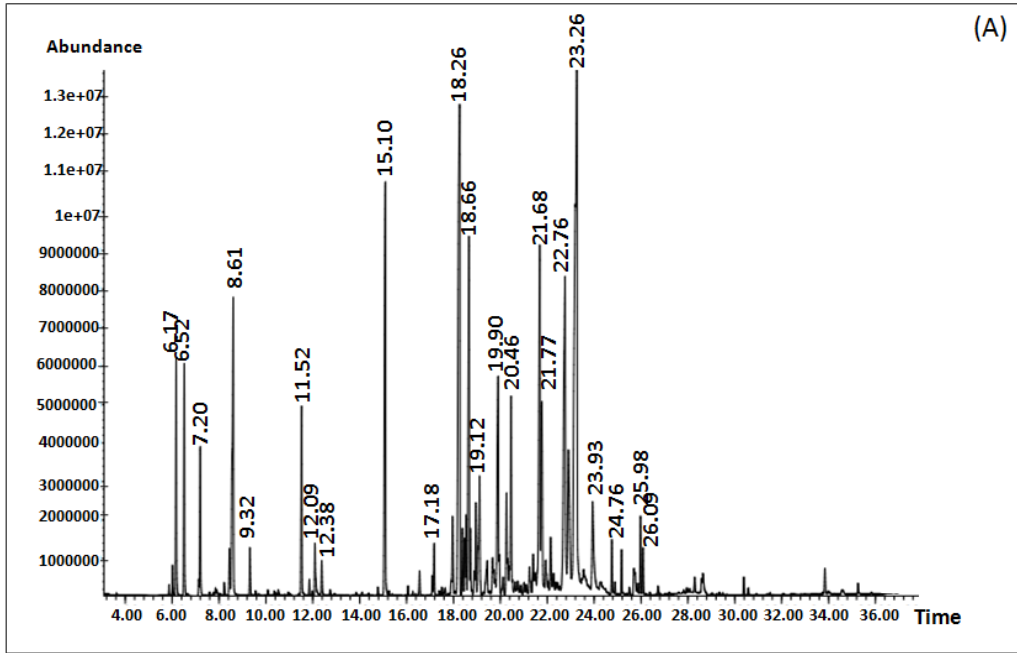
20	α -Cubebène	1351	0,11	-	0,16	0,19	0,18	0,2	-	0,2	0,21	0,21
21	Isoledène	1374	0,13	0,12	0,15	0,18	0,18	-	-	0,2	0,18	0,16
22	α -Copène	1376	0,26	0,24	0,38	0,5	0,47	0,43	-	0,4	0,46	0,49
23	β -cis-caryophyllène	1404	0,14	0,13	-	-	-	-	-	0,12	-	0,12
24	α -Gurjunène	1408	0,64	0,71	1,12	1,26	1,2	1,12	1,01	0,88	1,05	0,7
25	β-trans-caryophyllène	1417	10,34	11,11	12,69	13,76	13,58	10,64	16,75	10,18	11,12	9,45
26	γ -Maaliène	1430	0,46	0,42	0,5	0,6	0,47	0,6	0,67	0,71	0,52	0,62
27	α -Maaliène	1438	-	-	-	-	-	-	0,69	-	-	-
28	β -Gurjunène	1440	0,34	0,28	0,33	0,39	0,36	0,35	-	0,51	0,35	0,48
29	Aromadendrène	1441	3,29	2,93	3,25	3,54	3,81	3,72	5,39	5,07	4,2	4,43
30	α -Humulène	1452	0,69	0,79	1,1	1,21	1,04	0,98	0,92	0,79	0,89	0,6
31	allo-Aromadendrène	1467	1,82	1,9	2,23	2,05	1,87	1,57	2,02	1,79	1,63	1,59
32	γ -Muuroène	1474	0,22	0,22	0,31	0,65	0,64	0,7	-	0,56	0,65	0,56
33	β -Selinène	1489	0,34	0,3	0,32	0,37	0,41	0,48	-	0,43	0,49	0,6
34	Bicyclogermacrène	1500	5,21	6,07	7,52	7,61	7,19	5,55	3,65	4,26	6,18	1,4
35	γ -Cadinène	1511	0,62	1,02	1,66	1,18	1,05	1,12	1,28	1,07	1,53	0,88
36	δ -Cadinène	1519	1,34	1,32	1,93	2,04	2,11	2,47	1,98	1,64	1,8	1,33
37	Elemol	1549	0,18	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-
38	Spathuléol	1571	5,69	4,4	4,31	2,96	3,9	5,07	5,04	3,34	4,39	5,95
39	Oxide de caryophyllène	1582	3,9	3,09	1,94	1,59	2,1	3,17	3,26	3,08	2,65	2,6
40	Viridiflorol	1592	0,61	0,43	0,55	0,33	0,57	0,74	-	0,32	0,36	0,48
41	Rosifoliol	1603	0,76	0,57	0,56	0,5	0,8	1,12	0,65	0,53	0,58	0,71
42	γ-Eudesmol	1630	5,55	4,94	4,55	4,71	5,94	8,9	6,27	5,92	6,59	6,55
43	T-Cadinol	1645	3,12	2,94	2,57	2,1	2,98	4,46	2,68	2,24	2,51	1,19
44	β-Eudesmol	1650	6,32	5,42	4,66	-	5,99	-	6,04	5,69	-	6,34
45	α-Eudesmol	1652	8,19	7,37	6,85	12,37	9,56	18,38	11,41	8,88	16,4	10,38
46	Abiétatriène	2054	0,17	-	-	-	-	-	-	0,41	0,27	0,15
	Total		85,53	86,56	80,5	80,38	82,77	86,76	98,4	92,56	90,59	90,17

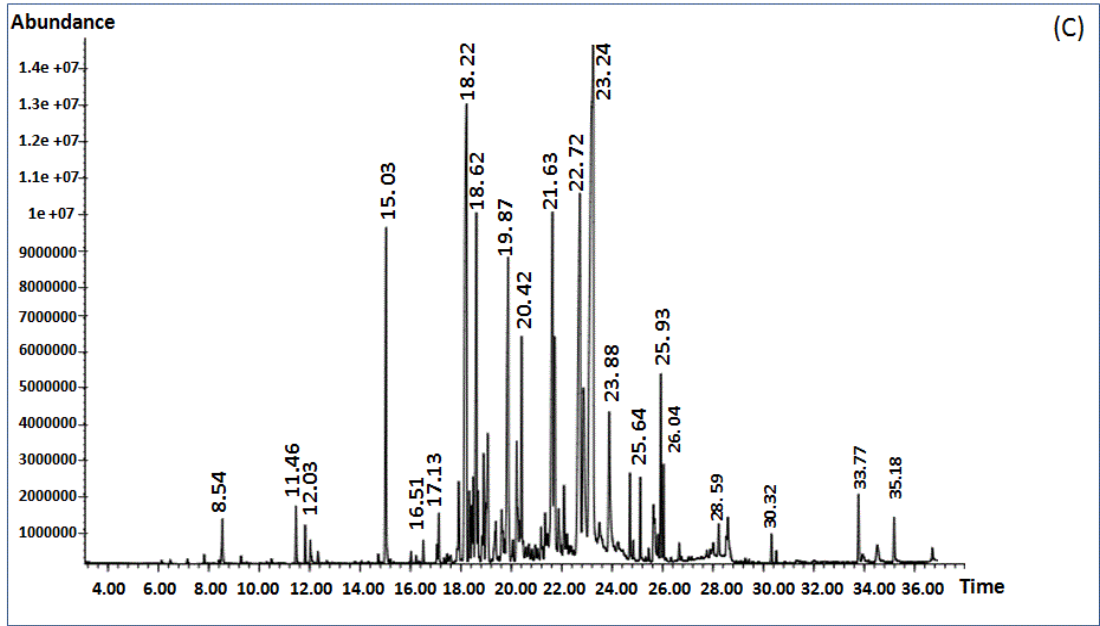
Appendice B 2 : La composition chimique des huiles essentielles de *Salvia officinalis* selon la période de récolte

N°	Composés	LRI	période de récolte « Teneur en % »									
			janvier	février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Septembre	Octobre	Novembre
1	Cis-Salvène	847	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-
2	α -Thujène	925	-	0,56	0,37	0,28	-	0,39	0,28	0,3	-	-
3	α -Pinène	939	0,49	1,49	1,01	0,84	0,56	1,56	1,68	2,19	1,97	0,78
4	Camphène	951	0,95	2,54	1,45	1,43	1,21	3,2	4,06	5,31	5,42	1,6
5	Sabinène	973	0,18	0,54	0,4	0,32	0,22	0,27	0,17	-	-	0,17
6	β -Pinène	978	1,25	3,62	2,99	2,17	1,46	2,61	2,14	2,19	2,12	1,51
7	β -Myrcène	992	0,79	1,67	1,41	1,43	1,31	1,7	1,7	1,61	1,11	0,97
8	α -Phellandrène	1017	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-
9	α -Terpinène	1026	0,18	0,56	0,4	0,34	0,24	0,42	0,31	0,33	-	0,23
10	P-Cymène	1045	0,37	0,65	0,27	-	0,17	-	0,21	0,56	0,63	0,71
11	1,8 Cinéole	1046	9,86	13,18	10,05	9,62	8,99	12,49	12,78	13,35	14,75	11,31
12	Cis- ocimène	1037	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-
13	γ -Terpinène	1060	0,54	1,08	0,85	0,73	0,66	0,82	0,71	0,62	0,37	0,48
14	Cis-sabinène hydrate	1070	0,45	0,24	0,23	0,29	0,3	0,23	0,21	-	-	0,19
15	α -Terpinolène	1093	0,26	0,39	0,37	0,48	0,54	0,76	-	0,9	0,42	0,33
16	Trans-sabinène hydrate	1098	0,36	0,23	0,25	0,22	0,26	-	-	-	-	0,18
17	α-Thujone	1105	17,57	18,41	12,73	10,93	12,94	16,52	16,48	18,36	20,07	16,35
18	β-Thujone	1117	5,82	6,4	4,93	4,43	4,76	5,91	5,18	4,83	4,84	4,58
19	Thujanol	1134	-	-	-	0,15	0,28	-	1,11	-	-	-
20	Camphre	1145	15,08	14,07	11,04	11,99	16,35	20,46	23,57	25,16	26,34	15,87
21	Trans 3-Pinanone	1158	0,5	0,7	0,54	0,38	0,35	0,28	0,17	-	-	0,26
22	Bornéol	1166	2,07	1,97	2,95	3,44	4,21	2,69	2,53	3,2	3,05	2,25
23	Cis3-Pinanone	1172	-	0,23	0,25	0,24	0,22	-	0,1	-	-	-

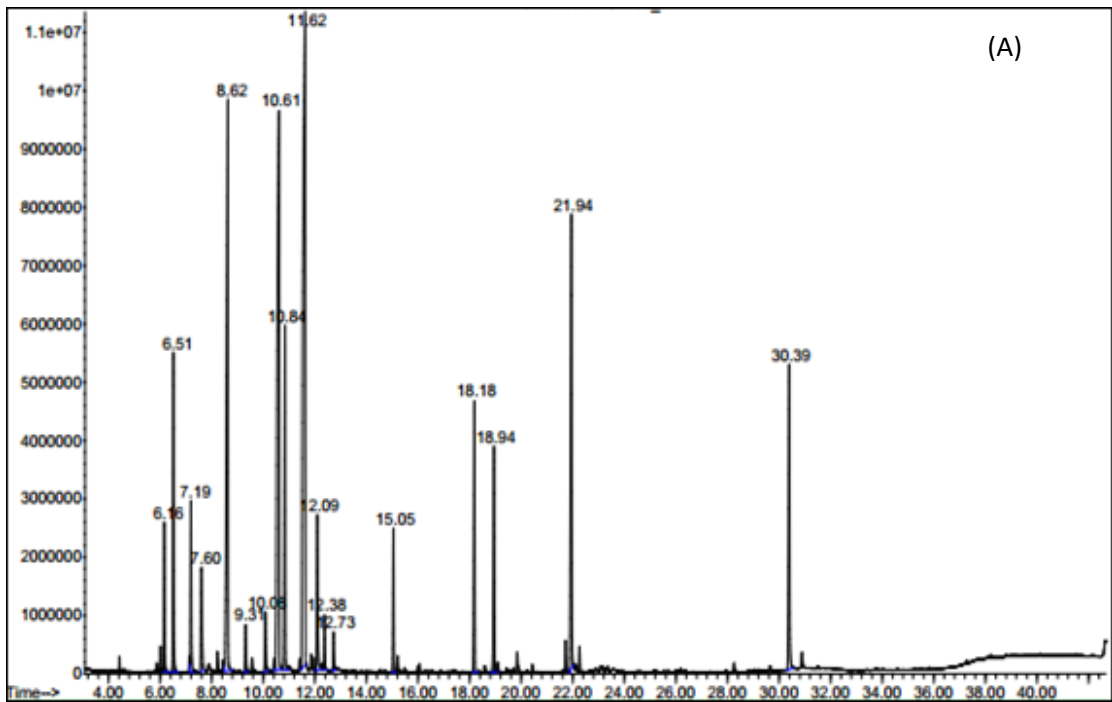
24	4-Terpinéol	1177	0,81	1,21	0,78	0,57	0,72	0,8	0,71	0,97	0,59	0,95
25	α -Terpinéol	1190	0,24	0,28	0,38	0,43	0,56	0,5	0,52	0,46	0,28	0,26
26	Myrtenol	1194	0,22	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Acétate de bornyle	1287	0,43	-	0,54	0,78	0,92	0,93	1,83	1,26	0,63	0,41
28	Acétate de sabinyle	1289	-	-	-	-	-	-	0,21	-	-	-
29	β-Caryophyllène	1417	4,28	2,77	6,49	8,72	6,42	4,8	3,79	2,25	1,64	3,98
30	Aromadendrène	1441	0,2	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-
31	α-Humulène	1452	4,15	3,35	7,41	8,84	6,65	4,18	3,12	1,77	1,23	3,44
32	Allo-Aromadendrène	1467	0,4	0,27	0,39	0,37	0,33	0,25	0,15	-	-	0,27
33	γ -Muuroolène	1479	0,19	-	0,17	-	-	-	-	-	-	0,28
34	Leden	1496	0,72	0,51	0,75	0,59	0,62	0,46	0,19	0,31	0,29	0,56
35	γ -Cadinène	1511	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-
36	δ -Cadinène	1519	0,32	0,18	0,32	0,25	-	-	0,1	-	-	0,43
37	Oxide de caryophyllène	1582	1,46	1,25	0,9	0,42	0,87	0,57	0,48	0,99	1,07	1,49
38	Viridiflorol	1592	13,05	12,32	14,16	12,32	14,31	10,29	8,28	7,11	6,83	11,83
39	β -Eudesmol	1649	0,2	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-
40	α -Eudesmol	1652	0,3	-	0,29	-	-	-	-	-	-	0,19
41	Manool	2057	13,46	7,5	11,57	14,79	11,19	5,94	5,78	5,09	3,71	14,59
Total			97,15	98,41	97,31	97,79	97,62	98,23	98,8	99,12	97,36	96,45

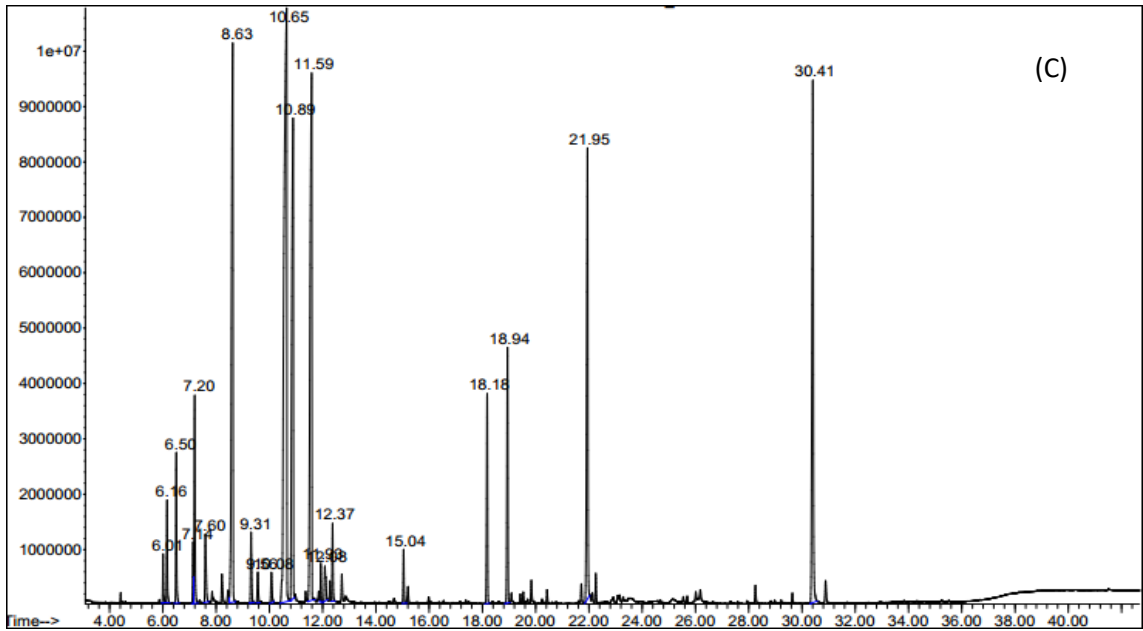
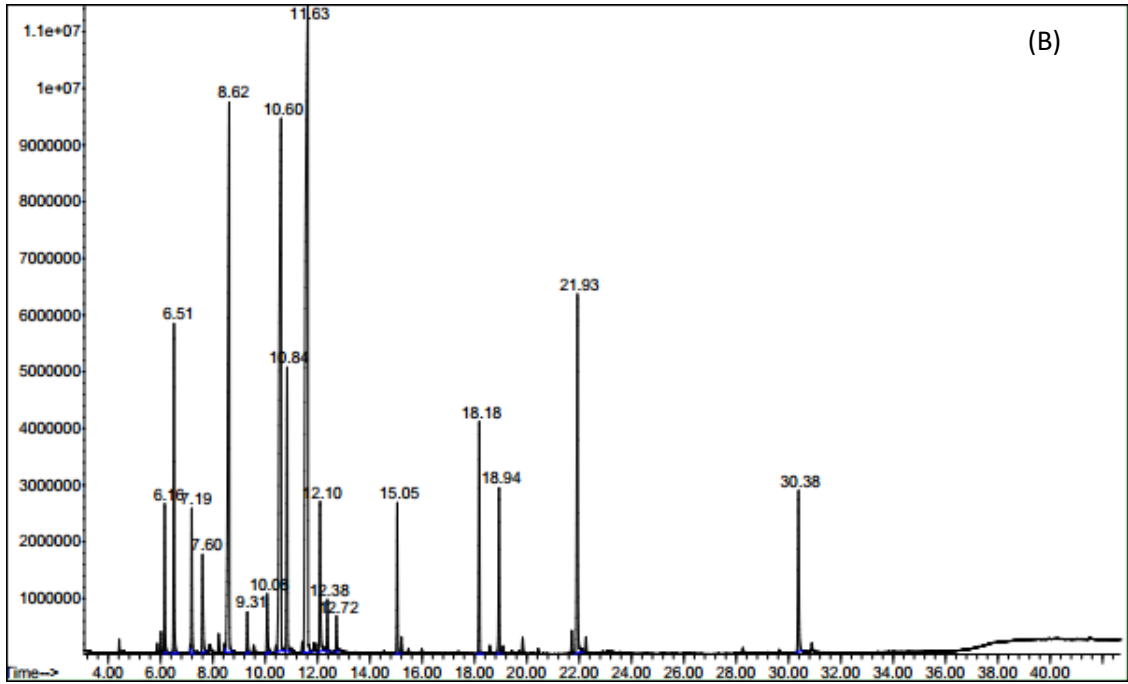
APPENDICE C
DIFERENTS PROFILS CHROMATOGRAPHIQUE DES HUILES
ESSENTIELLES



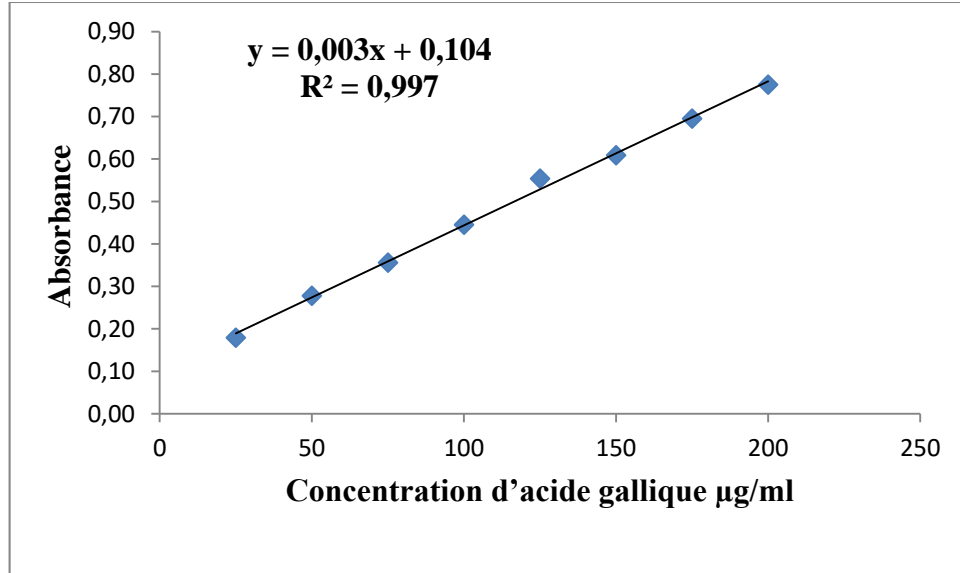
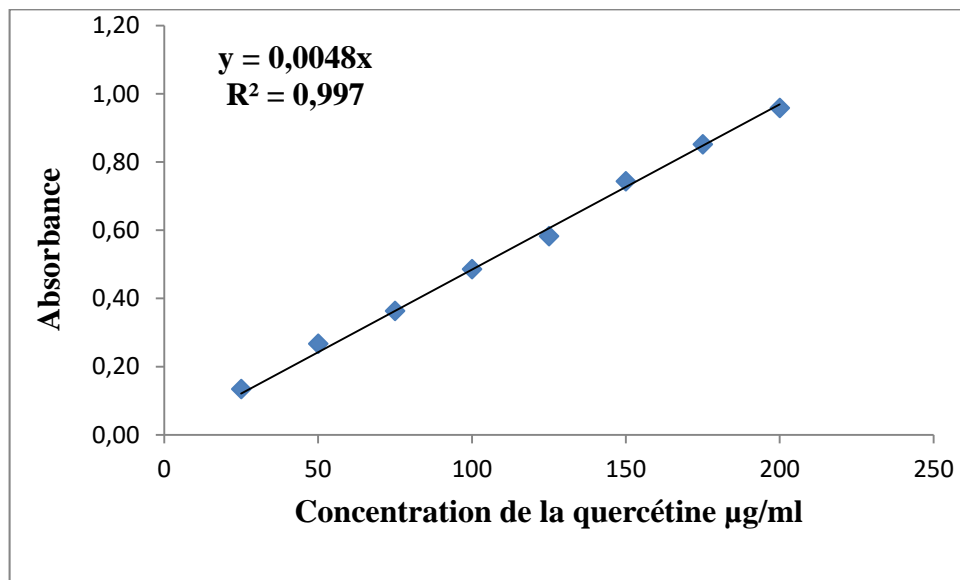


Appendice C 1 : profil chromatographique des huiles essentielles de *Salvia microphylla*: parties aériennes (A), feuilles (B), tiges (C).





Appendice C 2 : profil chromatographique des huiles essentielles de *Salvia officinalis*; Parties aériennes (A), f, feuilles (B), tiges (C).

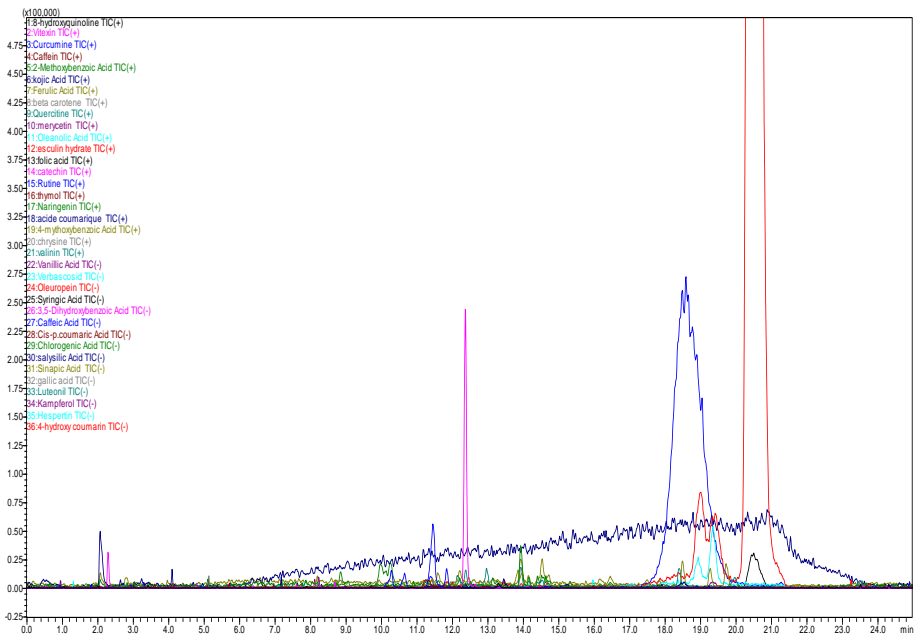
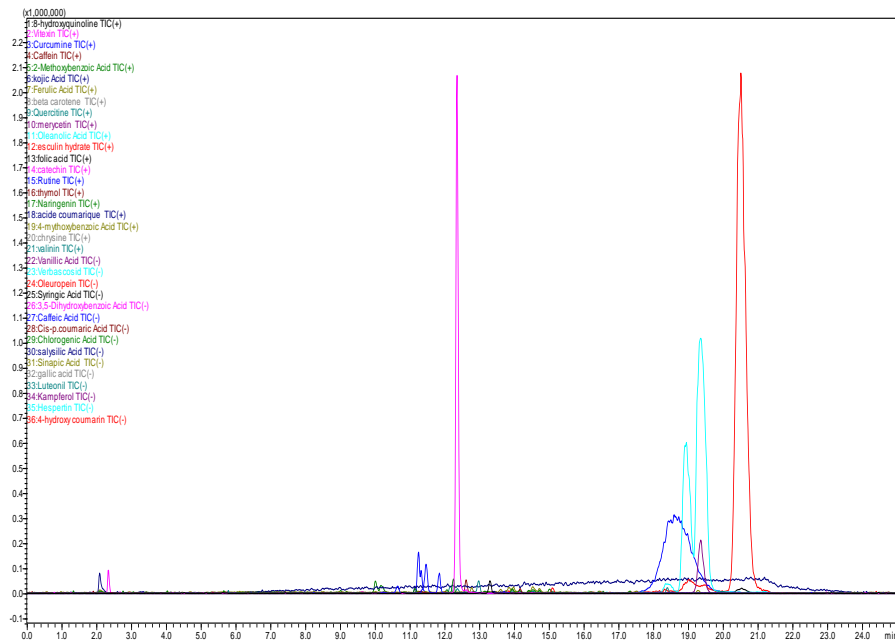
APPENDICE D**Les courbes d'étalonnage****Appendice D1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.****Appendice D 2 : Courbe d'étalonnage de la quercitrine**

APPENDICE E

DIFFERENTS PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES REALISES PAR LC-MS/MS DES DIVERS EXTRAITS ET FRACTIONS DE *SALVIA MICROPHYLLA* ET *SALVIA OFFICINALIS*.

A

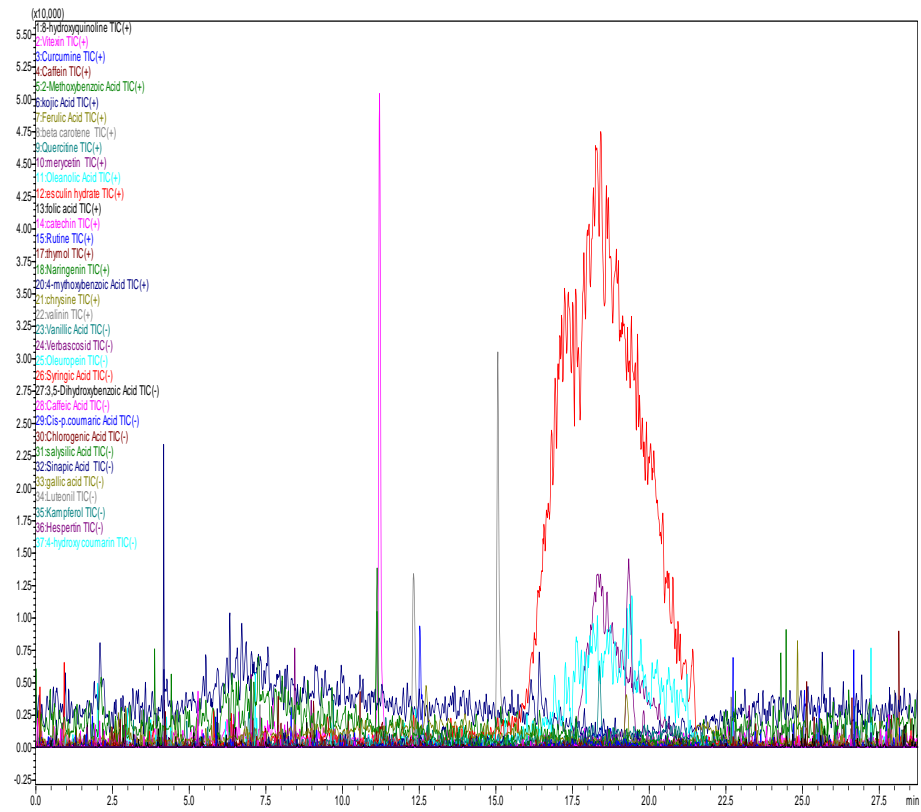
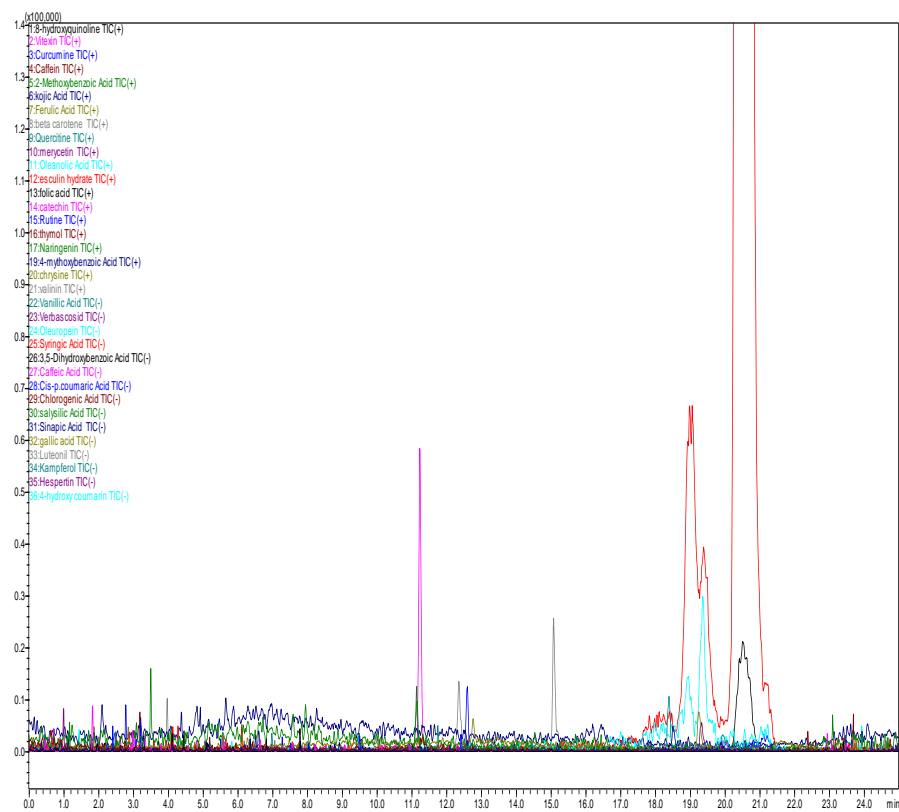
B



Appendice E.1 : Profils des chromatogrammes des extraits acétate d'éthyle (A) et butanolique (B) de *Salvia microphylla*.

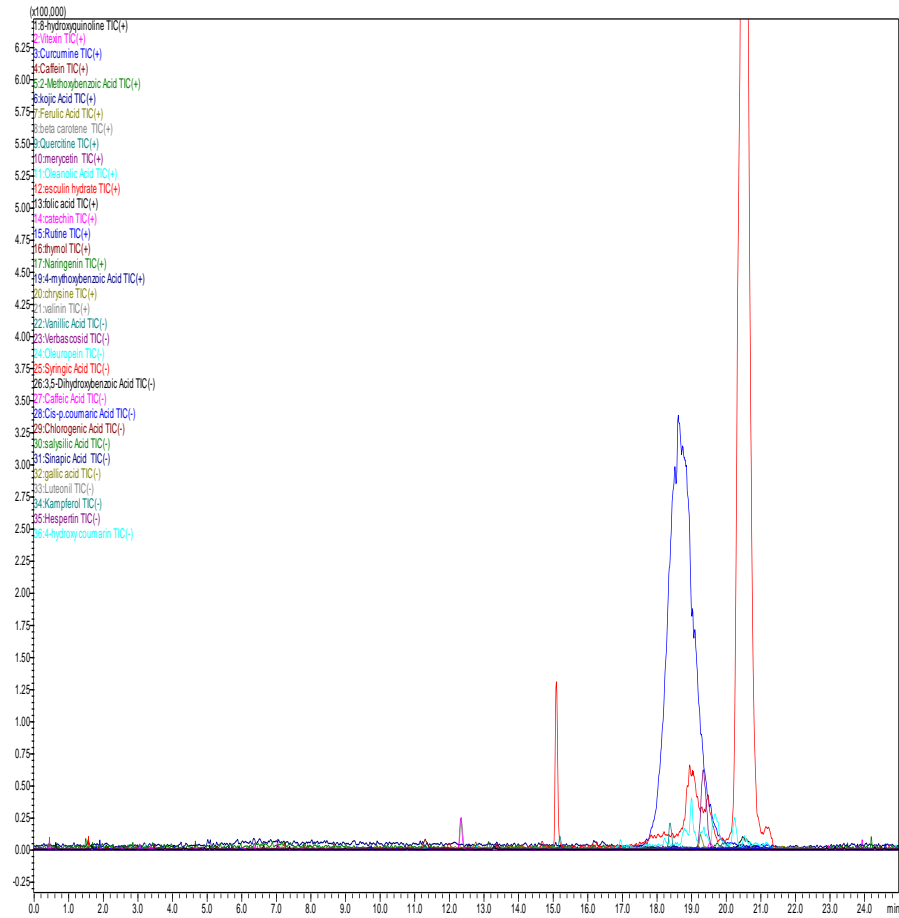
A

B

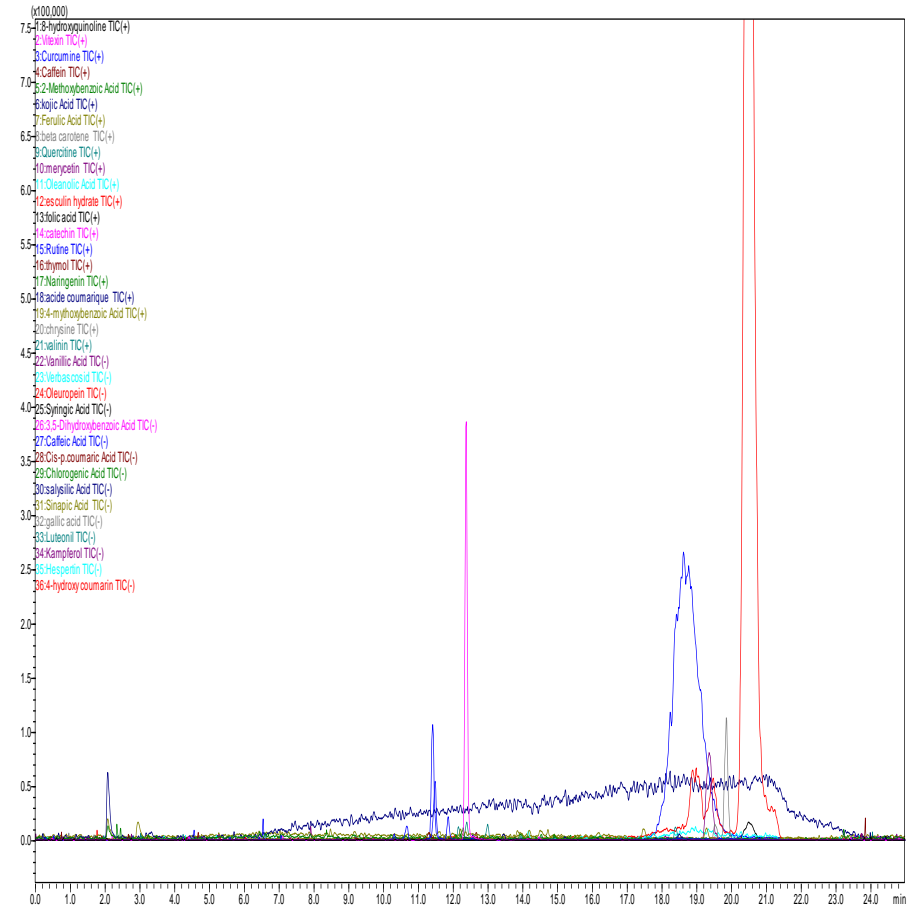


Appendice E.2 : Profils des chromatogrammes des extraits acétate d'éthyle (A) et butanolique (B) de *Salvia officinalis*.

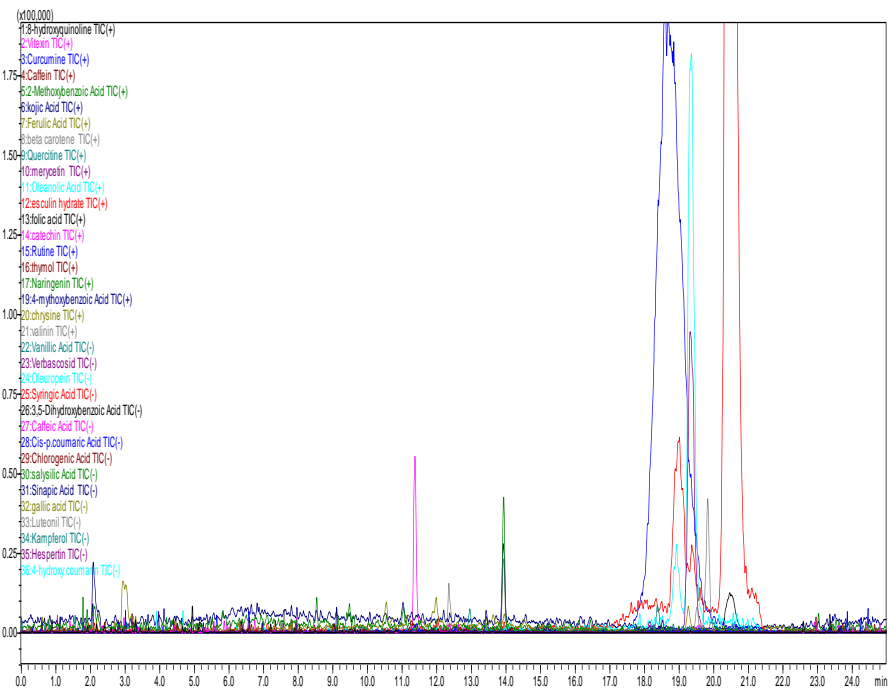
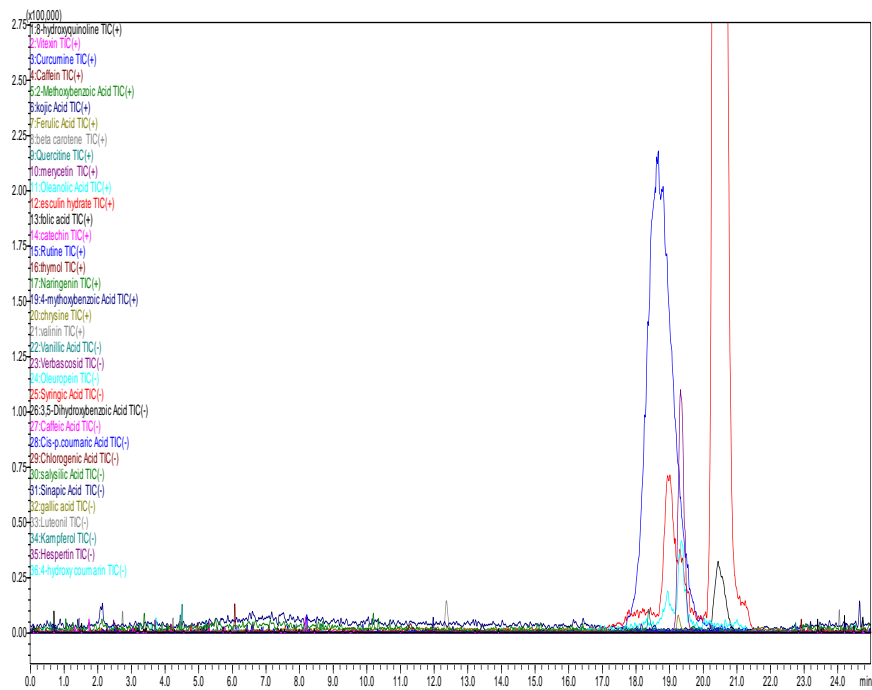
A



B



Appendice E.3 : Profils des chromatogrammes des fractions MFD2 (A) et MFE3 (B) de *Salvia microphylla*.

A**B**

Appendice E.4 : Profils des chromatogrammes des fractions OFD4 (A) et OFE4 (B) de *Salvia officinalis*.

APPENDICE F

**LES COMPOSES IDENTIFIES PAR LC-MS/MS DANS LES DIVERS EXTRAITS
ET FRACTIONS DE *SALVIA MICROPHYLLA* ET *SALVIA OFFICINALIS*.**

Appendice F1: Composés identifiés par LC-MS/MS de l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique de *Salvia microphylla*.

Extraits	N° Pic	TR (min)	Composés	Formule moléculaire	Masse moléculaire	ESI Charge (+/-)	transition m/z
EASM	1	2.079	Acide 4-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	2	2.090	Acide coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(+)	165.1000
	3	2.106	Acide 2-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	4	2.341	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	(+)	291.1000
	5	9.641	Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	C ₇ H ₆ O ₄	154.12	(-)	153.1000
	6	10.010	Acide chlorogénique	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	(-)	353.0500
	7	10.918	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	(+)	151.7500
	8	11.148	Acide salysilique	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	(-)	137.1000
	9	11.255	Acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	(-)	179.1000
	10	11.417	Curcumine	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368.4	(+)	369.0000
	11	11.497	Acide vanillique	C ₈ H ₈ O ₄	168.15	(+)	167.1500
	12	12.167	Vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.1000
	13	12.357	Vitexine	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.4	(+)	433.0000
	14	12.618	Acide cis-p.coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(-)	163.1500
	15	13.306	8-hydroxyquinoline	C ₉ H ₇ NO	145.16	(+)	146.0500
	16	13.426	Acide kojique	C ₆ H ₆ O ₄	142.11	(+)	143.0000
	17	13.850	Acide férulique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	(+)	194.9000
	18	14.173	Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	(+)	195.1000
	19	14.516	Verbascoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.6	(-)	623.1000
	20	14.789	Bêta-carotène	C ₄₀ H ₅₆	536.87	(+)	537.2000
	21	15.081	Lutéoline	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	(-)	284.9500
	22	18.401	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	(+)	302.9000
	23	18.592	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	(+)	611.2000
	24	18.768	Naringénine	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	(+)	272.9500
	25	18.939	Hespérétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	(-)	300.9000
	26	18.944	Acide oléanolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	(+)	457.2000
	27	19.018	Hydrate d'esculine	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.3	(+)	359.1000
	28	19.369	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	(+NH ₄ ⁺)	336.2500
	29	20.537	Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.14	(+)	442.9000
EBSM	1	2.073	Acide 4-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	2	2.075	Acide coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(+)	165.1000
	3	2.106	Acide 2-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	4	2.298	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	(+)	291.1000
	5	9.409	Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	C ₇ H ₆ O ₄	154.12	(-)	153.1000
	6	9.537	Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.24	(+)	255.1000
	7	9.977	Acide chlorogénique	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	(-)	353.0500
	8	10.808	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	(+)	151.7500
	9	11.246	Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	(+)	195.1000

10	11.393	Acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	(-)	179.1000
11	11.431	Curcumine	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368.4	(+)	369.0000
12	12.376	Vitexine	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.4	(+)	433.0000
13	12.388	Vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.1000
14	12.669	Acide cis-p.coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(-)	163.1500
15	13.301	8-hydroxyquinoline	C ₉ H ₇ NO	145.16	(+)	146.0500
16	13.456	Acide kojique	C ₆ H ₆ O ₄	142.11	(+)	143.0000
17	13.773	Acide salysilique	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	(-)	137.1000
18	14.578	Verbascoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.6	(-)	623.1000
19	18.404	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	(+)	302.9000
20	18.498	Acide férulique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	(+)	194.9000
21	18.591	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	(+)	611.2000
22	19.010	Hydrate d'esculine	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.3	(+)	359.1000
23	19.138	Hespérétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	(-)	300.9000
24	19.326	Acide oléanolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	(+)	457.2000
25	19.359	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	(+NH ₄ ⁺)	336.2500
26	20.506	Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.14	(+)	442.9000

Appendice F2: Composés identifiés par LC-MS/MS de l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique de *Salvia officinalis*.

Extraits	N° Pic	TR (min)	Composés	Formule moléculaire	Masse moléculaire	ESI Charge (+/-)	transition m/z
EASO	1	1.829	Vitexine	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,4	(+)	433.0000
	2	4.088	Acide gallique	C ₄ H ₄ O ₄	170.12	(-)	168.8000
	3	9.551	Acide 3,5-dihydroxybzoiq	C ₇ H ₆ O ₄	154.12	(-)	153.1000
	4	11.143	Acide salysilique	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	(-)	137.1000
	5	11.152	Naringénine	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	(+)	272.9500
	6	11.237	Acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	(-)	179.1000
	7	11.325	Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	(+)	195.1000
	8	12.364	Vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	194.19	(+)	153.1000
	9	12.598	Acide cis-p.coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(-)	163.1500
	10	13.334	Acide kojique	C ₆ H ₆ O ₄	142.11	(+)	143.0000
	11	15.077	Lutéoline	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	(-)	284.9500
	12	18.395	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	(+)	302.9000
	13	18.970	Hespérétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	(-)	300.9000
	14	19.062	Hydrate d'esculine	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.3	(+)	359.1000
	15	19.253	Acide férulique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	(+)	194.9000
	16	19.299	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	(+NH ₄ ⁺)	336.2500
	17	19.370	Acide oléanolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	(+)	457.2000
	18	19.948	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	(+)	291.1000
	19	20.516	Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.14	(+)	442.9000
	20	21.214	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	(+)	611.2000
EBSO	1	2.087	Acide coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(+)	165.1000
	2	2.087	Acide sinapique	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224.21	(-)	223.0000
	3	2.096	Acide 4-méthoxybenzoique	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	4	2.115	4-hydroxy coumarine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	162.14	(-)	160.8000

5	9.616	Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	C ₇ H ₆ O ₄	154.12	(-)	153.1000
6	9.998	Acide chlorogénique	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	(-)	353.0500
7	11.304	Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	(+)	195.1000
8	11.382	Acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	(-)	179.1000
9	12.372	Vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	194.19	(+)	153.1000
10	12.632	Acide Cis-p.coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(-)	163.1500
11	13.753	Acide salicylique	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	(-)	137.1000
12	13.925	Acide 2-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
13	15.088	Lutéoline	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	(-)	284.9500
14	18.398	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	(+)	302.9000
15	19.005	Hydrate d'esculine	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.3	(+)	359.1000
16	19.011	Hespérétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	(-)	300.9000
17	19.344	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	(+)	611.2000
18	19.359	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	(+NH ₄ ⁺)	336.2500
19	19.387	Acide oléanolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	(+)	457.2000
20	19.599	Curcumine	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368.4	(+)	369.0000
21	20.554	Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.14	(+)	442.9000

Appendice F4: Composés identifiés par LC-MS/MS des fractions les plus antioxydantes des extraits dichlorométhane et éthanolique de *Salvia officinalis* (MFD2 et MFE3).

Extraits	N°	TR	Composés	Formule moléculaire	Masse moléculaire	ESI Charge (+/-)	transition m/z
	Pic	(min)					
MFD2	1	11.245	Acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	(-)	179.1000
	2	11.301	Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	(+)	195.1000
	3	12.306	Acide Cis-p.coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(-)	163.1500
	4	12.336	Vitexine	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.4	(+)	433.0000
	5	12.349	vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	194.19	(+)	153.1000
	6	13.203	Acide salicylique	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	(-)	137.1000
	7	13.391	Acide kojique	C ₆ H ₆ O ₄	142.11	(+)	143.0000
	8	18.385	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	(+)	302.9000
	9	18.626	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	(+)	611.2000
	10	18.952	Hydrate d'esculine	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.3	(+)	359.1000
	11	18.974	Hespérétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	(-)	300.9000
	12	19.261	Acide férulique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	(+)	194.9000
	13	19.339	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	(+NH ₄ ⁺)	336.2500
	14	19.551	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	(+)	291.1000
	15	19.635	Acide oléanolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	(+)	457.2000
	16	19.861	Bêta-carotène	C ₄₀ H ₅₆	536.87	(+)	537.2000
	17	20.485	Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.14	(+)	442.9000
	18	20.485	Naringénine	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	(+)	272.9500
MFE3	1	2.078	Acide coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(+)	165.1000
	2	2.082	Acide 4-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	3	2.091	Acide 2-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	4	9.631	Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	C ₇ H ₆ O ₄	154.12	(-)	153.1000
	5	11.305	Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	(+)	195.1000
	6	11.418	Acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	(-)	179.1000
	7	11.434	Curcumine	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368.4	(+)	369.0000
	8	12.380	Vitexine	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.4	(+)	433.0000

9	12.401	vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.1000
10	12.669	Acide Cis-p.coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(-)	163.1500
11	13.447	Acide kojique	C ₆ H ₆ O ₄	142.11	(+)	143.0000
12	13.776	Acide salysilique	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	(-)	137.1000
13	18.395	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	(+)	302.9000
14	18.629	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	(+)	611.2000
15	18.869	Acide oléanolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	(+)	457.2000
16	18.990	Hydrate d'esculine	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.3	(+)	359.1000
17	19.025	Hespérétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	(-)	300.9000
18	19.290	Acide férulique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	(+)	194.9000
19	19.362	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	(+NH ₄ ⁺)	336.2500
20	19.859	Bêta-carotène	C ₄₀ H ₅₆	536.87	(+)	537.2000
21	20.489	Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.14	(+)	442.9000

Appendice F4: Composés identifiés par LC-MS/MS des fractions les plus antioxydants des extraits dichlorométhane et éthanolique de *Salvia officinalis* (OFD4 et OFE4).

Extraits	N° Pic	TR (min)	Composés	Formule moléculaire	Masse moléculaire	ESI Charge (+/-)	transition m/z
OFD4	1	2.092	Acide coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(+)	165.1000
	2	2.097	Acide 4-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	3	11.320	Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	(+)	195.1000
	4	12.374	vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	194.19	(+)	153.1000
	5	13.441	Acide kojique	C ₆ H ₆ O ₄	142.11	(+)	143.0000
	6	15.089	Lutéoline	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	(-)	284.9500
	7	18.385	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	(+)	302.9000
	8	18.627	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	(+)	611.2000
	9	19.019	Hydrate d'esculine	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.3	(+)	359.1000
	10	19.267	Acide férulique	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	(+)	194.9000
	11	19.332	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	(+NH ₄ ⁺)	336.2500
	12	19.378	Acide oléanolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	(+)	457.2000
	13	19.444	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	(+)	291.1000
	14	19.713	Naringénine	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.25	(+)	272.9500
	15	20.451	Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.14	(+)	442.9000
	16	23.707	Hespérétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28	(-)	300.9000
OFE4	1	2.085	Acide coumarique	C ₉ H ₈ O ₃	164.16	(+)	165.1000
	2	2.090	Acide 4-méthoxybenzoïque	C ₈ H ₈ O ₃	152.15	(+)	153.0500
	3	3.974	Verbascoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.6	(-)	623.1000
	4	9.617	Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	C ₇ H ₆ O ₄	154.12	(-)	153.1000
	5	11.280	Caféine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	(+)	195.1000
	6	11.386	Acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	(-)	179.1000
	7	12.360	vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	194.19	(+)	153.1000
	8	13.435	Acide kojique	C ₆ H ₆ O ₄	142.11	(+)	143.0000
	9	15.112	Lutéoline	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24	(-)	284.9500
	10	18.381	Quercétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	(+)	302.9000
	11	18.714	Rutine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.5	(+)	611.2000
	12	18.994	Hydrate d'esculine	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.3	(+)	359.1000
	13	19.327	Myricétine	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	(+NH ₄ ⁺)	336.2500
	14	19.358	Acide oléanolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.7	(+)	457.2000
	15	19.598	Catéchine	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27	(+)	291.1000
	16	20.470	Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.14	(+)	442.9000

REFERENCES

1. Sherwin, E.: "Antioxidants", Marcel Dekker, New York, (1990), Vol. 139.
2. Grice, H. C., "Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium", *Food and Chemical Toxicology*, 26(8), (1988), 717-723.
3. Sharifzadeh A., Jebeli Javan A., Shokri H., Abaszadeh K., Keykhosravy, "Evaluation of antioxidant and antifungal properties of the traditional plants against foodborne fungal pathogens", *Journal de mycologie medical*, (2016), 26: 11-17.
4. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., & Idaomar M., "Biological effects of essential oils—a review", *Food and chemical toxicology*, 46(2), (2008), 446-475.
5. Teissedre, P. L.; Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Peleg, H.; German, J. B., "Inhibition of *In vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, (1996), 55-61.
6. Böhm H., Boeing H., Hempel J., Raab B., Kroke A., "Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases", *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37, (1998), 147-163.
7. Hedge, I. C., "A global survey of the biogeography of the Labiatae", *Advances in Labiatae science*, (1992), 7-17.
8. Kabouche, A., & Kabouche, Z., "Bioactive diterpenoids of *Salvia* species", *Studies in natural products chemistry*, 35, (2008), 753-833.
9. Medjahed, F., Merouane, A., Saadi, A., Bader, A., Cioni, P. L., & Flamini, G., "Chemical profile and antifungal potential of essential oils from leaves and flowers of *Salvia algeriensis* (Desf.): A comparative study", *Chilean journal of agricultural research*, 76(2), (2016), 195-200.
10. Beladjila, K. A., Berrehal, D., Al-Aboudi, A., Semra, Z., Al-Jaber, H., Bachari, K., & Kabouche, Z., "Composition and antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities of the essential oil of *Salvia buchananii* from Algeria", *Chemistry of Natural Compounds*, 54, (2018), 581-583.

11. Garcia, C. S.; Menti, C.; LAMBERT, A. P. F.; Barcellos, T.; Moura, S.; Calloni, C.; Branco, C. S.; Salvador, M.; Roesch-Ely, M.; Henriques, J. A., "Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells", *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88,(2016), 281-292.
12. Perry, N. B.; Anderson, R. E.; Brennan, N. J.; Douglas, M. H.; Heaney, A. J.; McGimpsey, J. A., Smallfield, B. M., "Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, (1999), 2048-2054.
13. Şenol, F. S., Orhan, I., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., Yilmaz, G., & Şener, B., "Survey of 55 Turkish *Salvia taxa* for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities", *Food Chemistry*, 120(1), (2010), 34-43.
14. Kamatou, G. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N., & Viljoen, A. M., "South African *Salvia* species: a review of biological activities and phyto-chemistry", *Journal of ethnopharmacology*, 119(3), (2008), 664-672.
15. Kamatou, G. P., Van Zyl, R. L., Davids, H., Van Heerden, F. R., Lourens, A. C. U., & Viljoen, A. M. "Antimalarial and anticancer activities of selected South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. radula*", *South African Journal of Botany*, 74(2), (2008), 238-243.
16. El Euch, S. K., Hassine, D. B., Cazaux, S., Bouzouita, N., & Bouajila, J., "*Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities", *South African Journal of Botany*, 120, (2019), 253-260.
17. SÜZGEÇ SELÇUK, S., Özek, T., Özek, G., Yur, S., Göger, F., Gurdal, M., & Baser, K., "The leaf and the gall volatiles of *Salvia fruticosa* Miller from Turkey: Chemical composition and biological activities", *Records of Natural Products*, 15(1), (2021).
18. Adrar, N., Oukil, N., & Bedjou, F., "Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination", *Industrial Crops and Products*, 88, (2016), 112-119.
19. Bahadori, M. B., Dinparast, L., Zengin, G., Sarikurkcu, C., Bahadori, S., Asghari, B., & Movahhedini, N., "Functional components, antidiabetic, anti-Alzheimer's disease, and antioxidant activities of *Salvia syriaca*", *L. International journal of food properties*, 20(8), (2017), 1761-1772.

20. Bahadori, M. B., Salehi, P., & Sonboli, A. "Comparative study of the essential oil composition of *Salvia urmiensis* and its enzyme inhibitory activities linked to diabetes mellitus and Alzheimer's disease", *International journal of food properties*, 20(12), (2017), 2974-2981.
21. Heywood V.H., Brumitt R.k., Culham A., Seberg O., "Flowering plant families of the world", Royal botanic Gardens, (2007), 424 p.
22. Grayer R.J., Eckert M.R., Veitch N.C., Kite G.C., Marin P.D., Kokubun T., "The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, Nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry*", Simmonds M.S.J., Paton A.J., (2003), 64: 519-528.
23. Guignard J.L., Dupont F., "Botanique: Systématique moléculaire", 13^{ème} édition Paris: Masson. (2004).
24. Piozzi F., Bruno M., "Diterpenoids from Roots and Aerial Parts of the Genus *Stachys*", *Records of Natural Products*, 5, (2011), 1-11.
25. Harley R. M., Atkins S., Budantsev A., Cantino P.D., Conn B., Grayer R.J., Harley M.M., deKok R.P.J., Krestovskaja T., Morales A., Paton A. J., Ryding O., Upson T., "The Families and Genera of Vascular", *Plants Labiatae*. In Kadereit J. W. (ed), 7, (2004), 167-275.
26. Quezel F., Santana S., "Nouvelle flore d'Algérie", C.N.R.S., Paris (1963).
27. Ozenda P., "Flore et vegetation du Sahara" (2^{ème} édition). Paris, France, CNRS, (1991), 662 p.
28. Couplan F., "Dictionnaire étymologie de botanique", Nestlé (éd), Luisane. Paris, (2000), 283 p.
29. Naghibi F., Mosaddegh M., Motamed M.S., Ghorbani A., "Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology", *Iranian journal of pharmaceutical research*, 2, (2005), 63-79.
30. Guignard J.L., "Botanique systématique moléculaire", Masson, Paris, (2001) 221-225.
31. Stevens, P.F. (2001 onwards), "Angiosperm Phylogeny Website. Version 14", (July 2017).
32. Tabti M.E., tahdjerit O., "Étude taxonomique de quelques populations de *Salvia Verbenaca* ssp. *Euverbenaca* et ssp. *clandestina* (Lamiaceae) du golfe de Bejaia et

- de la vallée de la soummam”, mémoire de l'obtention du diplôme master en taxogénétique végétale et évolution, université de Bejaia (2017).
33. Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N., *Agric J. Food Chem.*, (2002), 50, 1845.
 34. Guillen M.D., Manzanos M.J. *Plant. Food Chem*, 63, (1998), 373 p.
 35. Hanson J.R., “in *Terpenoids and Steroids Specialist Periodical Reports*”, the chemical Society, and *Nat. Prod. Reports*, London, (1984-1995), 1-12.
 36. Ulubelen A., Topcu G., "Studies in Natural Products Chemistry", Ed In attarRahman, (1998), 20-659.
 37. Bailey L. H., “Manual of Cultivated Plants”, (1924).
 38. Walker J.B., Sytsma K.J., Treutlein J., Wink M., “*Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae”, *American Journal of Botany*, (2004), 91 (7): 1115–25.
 39. Salimpour F., Mazooji A., Darzikolaei S.A., “Chemotaxonomy of six *Salvia* species using essential oil composition markers”, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (2011), 1795- 1805.
 40. Auge R.M., Stodola A.J.W., Moore J.L., Klingeman W.E., Duan X., “Comparative dehydration tolerance of foliage of several ornamental crops”, *Scientia Horticulture*, 98, (2003), 511-516.
 41. Ryu S.Y., Lee C.O., Choi S.U., “In vitro cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*”, *Planta Medica*, 63, (1997), 339-342.
 42. Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., & Perry, N. B., "Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures", *Food chemistry*, 101(4), (2007), 1417-1424.
 43. Loizzo M.R., Tundis R., Menichini F., Saab A.M., Statti G.A., Menichini, F. “Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models”, *Anticancer Research*, 27, (2007), 3293-3299.
 44. Kelen M., Tepe B., “Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora”, *Bioresource Technology*, 99, (2008), 4096-4104.
 45. Loizzo M.R., Saab A.M., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Piccolo V., Statti, B. de Cindio G.A., Houghton P.J., “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, (2008), 109-116.
46. Akaberi M., Mehrib S., Iranshahi M., “Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species”, *Fitoterapia*, 100, (2015), 118-132.
 47. Salhi S., Fadli M., Zidane L., Douira A., “Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc)”, *Lazaroa*, 3, (2010), 133-146.
 48. Zhang H.J., Li L.N., “Salvianolic Acid I: A New Depside from *Salvia cavaleriei*”, *Planta Medica*, 60(1), (1994), 2-70.
 49. Peana A., Satta M., Moretti M.D., Orecchioni M., “A study on choleric activity of *Salvia desoleana* essential oil”, *Planta Medica*, 60(5), (1994), 9-478.
 50. Yeşilada Honda G., Sezik E. et al, “Traditional medicine in Turkey IV, Folk medicine in Mediterranean Subdivision”, *J. Ethnopharmacol*, 39, (1993), 31-3.
 51. Fiore G., Nencini C., Cavallo F., Capasso A., Bader A., Giorgi G., Micheli L., "In vitro antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines", *Phytotherapy Research*, 20, (2006), 701-703.
 52. Canzoneri M., Bruno M., Rosselli S., Russo A., Cardile V., Formisano C., Rigano D., Senatore F., “Chemical composition and biological activity of *Salvia verbenaca* essential oil”, *Nat Prod Commun*, 6, (2011), 1023-1026.
 53. Siebert, D.J., “*Salvia divinorum* and salvinorin A: new pharmacologic findings”, *Journal of ethnopharmacology*, 43(1), (1994), 53-56.
 54. Miller., “les méthodes les plus sûres”, *Dictionnaire des jardiniers* 8^{ème} Ed, Paris, (1785), 647 p.
 55. Iserin P., “Encyclopédie des plantes médicinales”, Larousse VUEF, 2^{ème} Ed.14, Paris, (2001), 335 p.
 56. Yuan, Y., Wu, Q., Shi, J. S., & Chen, X. P., “Advance in studies on hepatoprotective effect of *Salvia miltiorrhiza* and its main components. *Zhongguo Zhong yao za zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi*”, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 40(4), (2015), 588-593.
 57. Chen, F., Li, L., & Tian, D. D., “*Salvia miltiorrhiza* roots against cardiovascular disease: consideration of herb-drug”, *interactions, BioMed Research International*, (2017).

58. AFNOR, "Huiles essentielles, Tome 1- Echantillonnage et méthode d'analyse, Tome 2- Monographies relatives aux huiles essentielles", 6^{ème} édition, Afnor; Paris, France, (2000).
59. 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, (1993), 159-165.
60. G. Roulier, "Les huiles essentielles pour votre santé Traité pratique d'aromathérapie, propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes", Ed Dangles, France, (1992).
61. Pourmortazavi, S. M., & Hajimirsadeghi, S. S., "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis", J. Chromatogr. A., (2007), 1163: 2-24.
62. Duraffourd C., Lapraz J.C., "Examen de Laboratoire. In Traité de phytothérapie clinique", Edition Masson, (2002), 120-123.
63. Charabot.E, Dupont .J, Pillet L., Beranger.C, "Les huiles essentielles et leurs principaux constituants", Paris, France, (1899).
64. Chemat, F., Abert-Vian, M., & Fernandez, X, "Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. In Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice", Boston, MA: Springer US (2012), 53-68.
65. Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Scheffer J.J.C., "Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils", Flavour and Fragrance Journal 23, (2008), 213–226.
66. Stewart, G. H., "Oil bodies of the New Zealand leafy Hepaticae (Jungermanniales)", New Zealand Journal of Botany, 16(2), (1978), 185-205.
67. Regnault-Roger, C, "The potential of botanical essential oils for insect pest control", Integrated Pest Management Reviews, 2, (1997), 25-34.
68. Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J, "Biochemistry of plant volatiles", Plant Physiol, (2004), 135:1893-1902.
69. Unsicker S. B., Kunert G., Gershenzon J., "Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores", Curr. Opin. Plant Biol; 12(4), (2009), 479- 485.
70. Pichersky E., Gershenzon J, "The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense", Current Opinion in Plant Biology 5, (2002), 237– 243.

71. Ronniger K., "Die britishen Arten und Formen", Feddes Repert, 20, (1924), 321 p.
72. Fine D.H., "Listerine: past, present and future – A test of thyme", Journal of Dentistry 38, (2010), S2–S5.
73. Cho J.S., Kim T.H., Lim J.-M., Song J.-H., "Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons", Brain Research 1243, (2008), 53–62.
74. Lang G., Buchbauer G., "A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals", A review. Flavour and Fragrance Journal 27, (2012), 13–39.
75. Santana A., Ohashi S., De Rosa L., Green C.L., "Brazilian rosewood oil: The prospect for sustainable production and oil quality management", International Journal of Aromatherapy 8, (1997), 16–20.
76. Li Y., Fabiano-Tixier A-S, Chemat F., "Essential oils as reagents in green chemistry", Springer, Inde, (2014).
77. Schmidt E., "Production of essential oils, Handbook of essential oils (Science, Technology and Applications)", Taylor & Francis Group, USA, (2010).
78. Boutemak K., Contribution conventionnels et innovants appliques a la récupération de l'huile essentielle de l'armoise blanche d'Algérie (*Artimisia herba alba*)", Département de chimie des procédés, Faculté des sciences de l'ingénieur, Université Blida 1, (2011).
79. Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J, "Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydrodistillation", J. Chromatogr. A, (2004), 1043(2): 323-327.
80. Chemat, F., Zill-e-Huma, H., Khan, M.K., "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction.", Ultrasonics sonochemistry 18.4, (2011), 813-835.
81. SID-ALI, L., Brada, M., Fauconnier, M. L., & Kenne, T, "Optimization of Algerian *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut Essential Oil Extraction by Electromagnetic Induction Heating", Natural Product Sciences, (2018), 71-78.
82. Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., & Witier, P., "Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed Masson, Paris. 29. Arvy, M.P., & Gallouin, F., 2003", Epices, aromates et condiments. Ed. Belin, Paris, (1995), 412 p.

83. Lawrencet B., M., "Essential oils: from agriculture to chemistry", *J.Aromatherapy*, (2000), 10: 82-98.
84. Adams, R. P., "Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy", 4th ed. Allured Publ.Corp., Carol stream, IL, (2001), 445 p.
85. Lianga, Y. Z., Xieb, P., & Chan, K., "Quality control of herbal medicines", *J Chromatogr. B*, (2004), 812: 53-70.
86. Senatore, F., Arnold, N. A., Piozzi, F., "Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon.", *J. Chromatogr. A.*, (2004), 1052: 237-240.
87. Askun T., Baser K.H.C., Tumen G., Kurkcuoglu M., "Characterization of essential oils of some *Salvia* species and their antimycobacterial activities", *TUBİTAK*, 34, (2010), 89-95
88. Akin M., Demirci B., Yavuz Bagci, Baser K.H.C., "Antibacterial activity and composition of the essential oils of two endemic *Salvia* sp. from Turkey", *Journal of Biotechnology*, (15), (2010), 2322-2327.
89. Kunduhoglu B., Kurkcuoglu M., Duru M.E., Can Baser K.H., "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), (2011), 6484-6490.
90. Al-Jaber H.I., Al-Qudah M.A., Barhoumi L.M., Abaza I.F., 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, (2012), 1179-1187.
91. Cardile V., Russob A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Arnold N.A., Piozzi F., "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, (2009), 265-272.
92. Russo A., Formisano C., Rigano D., Cardile V., Arnold N.A, Senatore F., "Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three lebanese *Salvia* species", *Industrial Crops and Products*, 83, (2016), 492- 499.

93. Sepahvand R., Delfan B., Ghanbarzadeh S., Rashidipour M., Veiskarami G.H., Ghasemian-Yadegari J., “Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of *Salvia sclareoides*”, Journal of Tropical Biomedicine; 5(1), (2014), 930-935.
94. Ghavam, M., Manca, M. L., Manconi, M., & Bacchetta, G, “Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC”, ex Benth. Scientific reports, 10(1), (2020), 15647 p.
95. Goldansaz, S.M., Hakimi Meybodi, M.H., Mirhosseini, A., & Mirjalili, M.H, “Essential oil composition of *Salvia tebesana* Bunge (Lamiaceae) from Iran”, Rec Nat Prod, 11(9), (2017).
96. Yousefzadi M., Sonboli A., Karimi F., Ebrahimi S.N., Asghari B., Zeinalia A., “Antimicrobial Activity of Some *Salvia* Species Essential Oils from Iran”, Z. Naturforsch, (2007), 514-518.
97. Elshafie, H.S., Aliberti, L., Amato, M., De Feo, V., & Camele, I, “Chemical composition and antimicrobial activity of chia (*Salvia hispanica* L.) essential oil”, European Food Research and Technology, 244, (2018), 1675-1682.
98. Russo A., Cardile V., Grazianob A.C.E., Formisano C., Rigano D., Canzoneri M., Bruno M., Senatore F., “Comparison of essential oil components and in vitro anticancer activity in wild and cultivated *Salvia verbenaca*”, Natural Product Research, 10, (2014), 1080 p.
99. Alves-Silva, J.M., Cocco, E., Piras, A., Gonçalves, M.J., Silva, A., Falconieri, D. & Salgueiro, L, “Unveiling the chemical composition and biological properties of *Salvia cacaliifolia* Benth. essential oil”, Plants, 12(2), (2023), 359 p.
100. Salinas, M., Bec, N., Calva, J., Ramírez, J., Andrade, J. M., Larroque, C & Armijos, C, “Chemical composition and anticholinesterase activity of the essential oil from the Ecuadorian plant *Salvia pichinchensis* Benth. Rec”, Nat. Prod, 14(4), (2020), 276-285.
101. Ben taarit M., Msaada K., Hosni K., Chahed T., Marzouk B., “essential oil composition of *salvia verbenaca* l. growing wild in tunisia”, Journal of Food Biochemistry, 34, (2010), 142-151.
102. Marchev A., Ivanov I., Denev P., Nikolova M., Gochev V., Stoyanova A., Pavlov A., Georgiev V., “Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant, and antimicrobial

- activities of *Salvia tomentosa* Mill essential oil", J. BioSci. Biotechnol, 4(2), (2015), 219-229.
103. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer", Pharmacol Rev, 52; pp: 673-839, (2000).
 104. Martin S. et Andriantsitohaina R., "Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium", Annales de cardiologie et d'angéiologie, (2002), 51 ; pp : 304-315.
 105. Barboni T., "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, université de Corse, France, (2006), 26 p.
 106. Ribereau G.P., "Les composés phénoliques des végétaux", Dunod, Paris, (1968), 254 p.
 107. Winkel-Shirley B., "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress", Current Opinio in Plant Biology, 5, (2002), 218-223.
 108. Das, A., Islam, M., Faruk, M., Ashaduzzaman, M., Dungani, R., "Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities", South African Journal of Botany, 135, (2020), 58-70.
 109. Ajila, C., Brar, S., Verma, M., Tyagi, R., Godbout, S., Valero, J., "Extraction and analysis of polyphenols: recent trends", Critical reviews in biotechnology, 31(3), (2011), 227-249
 110. Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review", Journal of food engineering, 117(4), (2013), 426-436.
 111. Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T., "Techniques for analysis of plant phenolic compounds", Molecules, 18(2), (2013), 2328-2375.
 112. Lagnika L., "Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises", Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, (2005), 249 p.
 113. Chirinos, R., Campos, D., Costa, N., Arbizu, C., Pedreschi, R., Larondelle, Y. (2008). Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. Food Chemistry, 106(3), 1285-1298.

114. Watson, J.T. and O.D. Sparkman, "Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation", John Wiley & Sons, (2007).
115. Wu Z., Ouyang M., Yang C., "Polyphenolic constituents of *Salvia sonchifolia*", Yunnan Zhiwu Yanjiu, 21 (1999), 393-398, Chemical Abstracts, 132 (1999), 205-422.
116. Topcu G., Tan N., Ulubelen A., Sun D., Watson W.H., "Terpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Salvia candidissima*", Phytochemistry, 40 (1995), 501-504.
117. Xu J, Wei K, Zhang G, Lei L, Yang D, Wang W, et al., "Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species", A review. J Ethnopharmacol. (oct 2018), 225:18-30.
118. Mericli A.H., Mericli F., Tanker N., Koyuncu M., "Constituents of *Salvia albimaculata*. II. Marmara", Chemical Abstracts (110, 237002e), 3, (1987), 53-55.
119. Li J., Li L., Song W., "Chemical constituents of root of Bowley sage (*Salvia bowleyana*)", Chemical Abstracts (121, 251274d), 25, (1994), 347-349.
120. Doganis B., "Pharmacognostical study of *Salvia*", Chemical Abstracts (78, 33856x), (1971), 27, 127 p.
121. Kokkalou E., Kapetanidis I., "Flavonoides et acides phenoliques de *Salvia horminum* L. (Lamiaceae)", Pharmaceutica Acta Helvetiae, 63, (1988), 90-92.
122. Shamsudinov S., Dzhumyrko S.F., Simonyan A.V., "Polyphenols and triterpenes from *Salvia limbata*", Chemical Abstracts (91, 35706r), (1995), 95 p.
123. Jiang Y., Luo S., Zheng M., "Active principles of *Salvia plebeia*", Chemical Abstracts (107, 233142r), 18, (1987), 349-351.
124. Ai C.B., Deng Q.H., Song W.Z., Li L.N., "Salvianolic acid J, a depside from *Salvia flava*", Phytochemistry, 37, (1994), 907-908.
125. Ai C.B., Li L.N., "Stereostructure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza*", Journal of Natural Products, 51, (1988), 145-149.
126. Li L.N., Tan R., Chen W.M., "Salvianolic acid A, a new depside from roots of *Salvia miltiorrhiza*", Planta Medica, 50, (1984), 227-228.
127. Ai, C. B., & Li, L. N., "Salvianolic acids D and E: Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*", Planta Medica, (1992), 58(02), 197-199.
128. Ai C.B., Li L.N., "Synthesis of tetramethyl salvianolic acid F and trimethyl przewalskinic acid A", Chinese Chemical Letters, 7, (1996), 427-430.

129. Ai C.B., Li L.N., "Salvianolic acid G, a caffeic acid dimer with a novel tetracyclic skeleton", Chinese Chemical Letters, 2, (1991), 17-18.
130. Tezuka Y., Kasimu R., Li J.X., Basnet P., Tanaka K., Namba T., Kadota S., "Constituents of roots of *Salvia deserta* Schang. (Xinjiang-Danshen)", Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 46, (1998), 107-112.
131. Tanaka, T., Nishimura, A., Kouno, I., Nonaka, G. I., & Young, T. J, "Isolation and characterization of yunnaneic acids a– d, four novel caffeic acid metabolites from *Salvia yunnanensis*", Journal of Natural Products, 59(9), (1996), 843-849.
132. Tanaka, T., Nishimura, A., Kouno, I., Nonaka, G., Yang, C.-R., "Four new caffeic acid metabolites, yunnaneic acids E-H, from *Salvia yunnanensis*", Chemical and Pharmaceutical Bulletin 45, (1997), 1596–1600.
133. Zhang, Z. F., Peng, Z. G., Gao, L., Dong, B., Li, J. R., Li, Z. Y., & Chen, H. S., "Three new derivatives of anti-HIV-1 polyphenols isolated from *Salvia yunnanensis*", Journal of Asian natural products research, 10(5), (2008), 391-396.
134. Ulubelen A., Tuzlaci E., "Flavonoids and triterpenoids from *Salvia euphratica* and *S. longipedicellata*", Fitoterapia, 61, (1990), 185 p.
135. Sagdullaeva N.Z., Khazanovich R.L., "Flavone substances of some *Salvia* species growing in Uzbekistan", Chemical Abstracts (78, 94820c), (1972), 17-19.
136. Smirnova L.P., Glyzin V.I., Patudin A.V., Ban'kovskii A.I., "Flavones from some *Salvia* species", Chemical Abstracts (82, 83016b), 10, (1974), 668-669.
137. Adzet T., Canigueral S., Iglesias J., "A chromatographic survey of polyphenols from *Salvia* species", Biochemical Systematics and Ecology, 16, (1987), 29-32.
138. Tomas-Barberan F.A., Wollenweber E., "Flavonoid aglycons", Phytochemistry, 59, (2002), 117-140.
139. Wollenweber E., "Flavones and flavonoids in exudate of *Salvia glutinosa*", Phytochemistry, 13, (1974), 753 p.
140. Wollenweber E., Dorr M., Rustaiyan A., Roitman J.N., Graven E.H., "Exudate flavonoids of some *Salvia* and a *Trichostema* species", Zeitschrift fur Naturforschung, 47c, (1992), 782-784.
141. El-Missiry M.M., Hussiney H.A., Ismail S.I., Radwan H.M., Rizk A.M., "Constituents of plants growing in Qatar XXIV Phytochemical investigation of *Salvia aegyptiaca* L", Chemical Abstracts (124,337868z), Science Journal, 14, (1994), 249-251.

142. Camarasa J., Canigueral S., Iglesias J., Martin E., "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, (1982), 192-196.
143. Ulubelen A., Miski M., Neuman P., Mabir T.J., "Flavonoids of *Salvia tomentosa* (Labiatae)", *Journal of Natural Products*, 42, (1979), 261-263.
144. Miana G.A., Deep M.S., Hassan A.H., Hassan M.G., "The isolation and characterization of salvigenin, a flavone from *Salvia lanigera*", *Journal of Chemical Society of Pakistan*, 7, (1985), 67-68.
145. Ulubelen A., Ozturk S., Isildatici S., "A new flavone from *Salvia triloba*", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, (1968), 1037-1038.
146. Viola H., Marder M., Wolfman C., Wasowski C., Medina J.H., Paladini A.C., "Central nervous system effects of natural and synthetic flavonoids", *Chemical Abstracts* (130, 218145a), 86, (1998), 229-236.
147. Saleh M.R.I., Sabri N.N., "Phytochemical study of the herb, *Salvia verbenaca*", *Journal of Drug Research*, 12, (1980), 131-137.
148. Rodriguez J., Tello H., Quijano L., "Flavonoids of Mexican plants. Isolation and structure of santin and glucoferide", *Chemical Abstracts* (83, 132746e), 5, (1974), 41-53.
149. Gupta H.C., Ayengar K.N.N., Rangaswami S., "Structure and synthesis of salvitin, a new flavone isolated from *Salvia plebeia*", *Indian Journal of Chemistry*, 13, (1975), 215-217.
150. Chen C.C., Chen H.T., Chen Y.P., Hsu H.Y., Hsieh T.C., "Isolation of the components of *Salviae miltiorrhizae radix* and their coronary dilator activities", *Chemical Abstracts* (107, 211619z), 38, (1986), 226-230.
151. Veitch N.C., Grayer R.J., Irwin J.L., Takeda K., "Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*", *Phytochemistry*, 48, (1998), 389-393.
152. Zhao L., Liang X., Li L., "Two minor phenolic glycoside from *Salvia cavaleried*", *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 6, (1997), 111-112.
153. Asen S., "Anthocyanin's in flowers of *Salvia splendens* cultivar Violet Flame", *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 78, (1961), 586-592.

154. Cornu A., Paynot M., "Heredity and chromatographic analysis of the anthocyanin pigments in the flowers and bracts of *Salvia horminum*", Chemical Abstracts (71,57688a), Ann. Amelior. Plant, 19, (1969), 5-13.
155. Willstatter R., Bolton E.K., "Anthocyan. XI. The anthocyan of red-flowering varieties of *Salvia*", Liebigs Annalen, 412, (1916), 113-136.
156. Kondo T., Yoshikane M., Yoshida K., Goto T., "Structure of anthocyanins in scarlet, purple, and blue flowers of *Salvia*", Tetrahedron Letters, 30, (1989), 6729-6732.
157. Ishikawa T., Kondo T., Kinoshita T., Haruyama H., Inaba S., Takeda K., Grayer R.J., Veitch N.C., "An acetylated anthocyanin from the blue petals of *Salvia uliginosa*", Phytochemistry, 52, (1999), 517-521.
158. Malecky M., "Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins", thèse de Doctorat, Paris, (2005), 9-27.
159. Benaissa O., "Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique", Thèse Doctorat, université Mentouri, Constantine, (2011), 63 p.
160. Belbache H., "Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora Desf*", mémoire de magister, Université Mentouri, Costantine, (2003), 2-16.
161. Ayad R., "recherche et détermination structural des métabolites secondaires de l'espèce *zygophyllum cornutum*", mémoir magister; université Mentounri, Costantine, (2008), 35-47.
162. Ulubelen A., Topcu G., Tuzlac E., "New Diterpenoids from *Salvia divaricata*", J. Nat. Prod, 55, (1992), 1518-1521.
163. Ulubelen A., Topcu G., Sonmez U., Eris C., Ozgen U., "Norsesterterpenes and diterpenes from the aerial parts of *Salvia limbata*", Phytochemistry, 43, (1996), 431-434.
164. Ulubelen A., Tuzlac E., "Terpenoids from *Salvia potentillifolia*", Planta Medica, 53, (1987), 578 p.
165. Ulubelen A., Topcu G., Eris C., Sonmez U., Kartal M., Kurucu S., BozokJohansson C., "Terpenoids from *Salvia sclarea*", Phytochemistry, 36, (1994), 971-974.
166. Topcu G., Kartal M., Ulubelen A., "Terpenoids from *Salvia tchihatcheffi*", Phytochemistry, 44, (1997), 1393-1395.

167. Topcu G., Ulubelen A., Tam T.C.M., Tao-Che C., "Sesterterpenes and other constituents of *Salvia yosgadensis*", *Phytochemistry*, 42, (1996), 1089-1092.
168. Gokdil G., opcu G. T, Sonmez U., Ulubelen A., "Terpenoids and flavonoids from *Salvia cyanescens*", *Phytochemistry*, 46, (1997), 799-800.
169. John T.K., Rao Krishna G.S., "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), (1978), 235-238.
170. Ulubelen A., Tan N., Topcu G., "Terpenoids from *Salvia candidissima* subsp. *Candidissima*", *Phytochemistry*, 45, (1997), 1221-1223.
171. Ulubelen A., Topcu G., Tan N., "Diterpenoids from *Salvia candidissima*", *Tetrahedron Letters*, 33, (1992), 7241-7244.
172. Esquivel B., Vallejo A., Gavino R., Cardenas J., Sanchez A. A., T. P. Ramamoorthy A. A., Rodriguez-Hahn L., "Clerodane diterpenoids from *Salvia melissodora*", *Phyto-chemistry*, 27, (1988), 2903-2905.
173. Maldonado E., Ortega A., "Polystachynes A-E, five cis-neo-clerodane diterpenoids from *Salvia polystachya*", *Phytochemistry*; 53, (2010), 103 p.
174. Fernandez M. D, Esquivel B., Cardenas J., Sanchez A.A., Toscano R.A., Rodriguez-Hahn L., "Clerodane and aromatic seco-clerodane diterpenoids from *salvia rhyaco-phua*", *Tetrahedron*, 47, (1991), 7199-7208.
175. Nieto M., Gallardo V O., Rossomando P. C., Tonn C. E., "8-hydroxysalviarin and 7,8-didehydrorhyacophiline, 2 new diterpenes from *salviareflexa*", *j. nat. prod*, 59, (1996), 880-882.
176. Esquivel B., Dominguez R. M., Ortega S. H., Toscano R. A., Rodriguez- Hahn L., "Salvigenane and isoalvipuberulan diterpenoids from *Salvia leucantha*", *Tetrahedron*, 50, (1994), 593-600.
177. Bisio A., Fontana N., Romussi G., Ciarallo G., De Tommasi N., Pizza C., Mugnoli A., "Clerodane diterpenoids from *Salvia blepharophylla*", *Phytochemistry*; 52, (1999), 1535-1540.
178. Ahmed B., Al-Howiriny T.A., Al-Rehaily A.J., Mossa J.S., "Verbenacine and Salvinine : new diterpenes from *Salvia verbenacer*", *Zeitschrift fur Naturforschung C*, (2004), 9-14.
179. Ulubelen A., Topcu G., Tan N., "Rearranged abietane diterpenes from *Salvia candidissima*", *Phytochemistry*, 31, (1992), 3637-3638.

180. Guajardo Touché. E. M., Gomez Lopez. E., Reyes P. A., Sanchez H., Honcker. F., Achenbach H., "Parrying, a diterpene with a tricyclic 6-7-5-ring system from *Salvia parryi*", *Phytochemistry*, 4, (1997), 387 p.
181. Ulubelen A., Tan N., Topcu G., Sun D., Watson W.H., "terpenoids and flavonoids from the aerial parts of *salvia-candidissima*", *Phytochemistry* 40, (1995), 501-504.
182. Ulubelen A., Topcu G., Tan N., "Diterpenoids from *Salvia heldrichiana*", *Phytochemistry*, 40, (1995), 1473-1475.
183. Esquivel B., Calderon J.S., Sanchez A.A., Ramamoorthy T.P., Flores E.A., R.M., "Dominguez, Rev", *Latinoamer. Quim*, (1996), 24-44.
184. Ulubelen A., Topcu G., Johansson C.B., "Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity", *J. Nat. Prod*, 60, (1997) 75-80.
185. Houdhary M.I., Hussain A., Adhikari A., Marasini B.P., Sattar S.A., Hussain N., Majid Ayatollahi S.A., ahman A. R, "Anticancer and α -chymotrypsin inhibiting diterpenes and triterpenes from *Salvia leriifolia*", *Phytochemistry Letters*, 6, (2013), 139-143.
186. Cioffi G., Bader A., Malafronte A., Piaz F.D., Tommasi N.D., "Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia palaestina* Benth", *Phytochemistry*, 69,(2008), 1005-1012.
187. Jacques A., " Les noms des plantes dans la Rome antique", *Les Belles Lettres*, (2010).
188. Hamidpour M., Hamidpour R., Hamidpour S., Shahlari M., Chemistry, "Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer". *J Tradit Complement Med*, (2014), 4: 82-88.
189. Allon Jenks A., "Systematics and Ethnobotany of *Salvia* Subgenus *Calosphaea* and Origins of the Hallucinogenic Sage, *Salvia divinorum*, Dissertation", University of California, (2009).
190. *Salvia* microphylla,
<https://www.genialvegetal.net/sites/genialvegetal.net/local/cache>
191. Hedge I.C., Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A, "Salvia L. *Flora Europaea*", Eds. Cambridge University Press UK: (1972), 188 p.

192. Šilić C., Korene Z., Mitić V, “Atlas Drveća i Grmlja. Eds. Zavod za Izdavanje Udžbenika”, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, (1973), 174 p.
193. Hans W.K, “1000 plantes aromatiques et médicinales”, Terre édition : 6 et 7, (2010).
194. Salvia officinalis,
<https://www.genialvegetal.net/sites/genialvegetal.net/local/cache>
195. Ulubelen A, "Chemical constituents: Terpenoids in the genus Salvia. In Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles", Kintzios, S.E., Ed., Harwood Academic: Reading, UK, (2000), 14: 55–68.
196. Baba Aissa F, “Encyclopédie des plantes utiles Flore d’Algérie et du Maghreb”, EDAS Librairie moderne Rouïba, (2000), 368 p.
197. Gilly G, “Plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse”, Botanique-Culture-Chimieproduction et marché, Edition L’Harmattan, France, (2005).
198. Özcan B., Birgul E.M., Coleri A., Yolcu H., Caliskan M, “In vitro antimicrobial and antioxidant activities of various extracts of Salvia microstegia (Boiss.) et. Bal”, Antakya, Turkey. Fresenius Environ Bull, (2009), 18: 658–62.
199. Radulescu V., Silvia C., Eliza O, “Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of salvia officinalis”, J Chromatogr A, (2004), 1027: 121-126.
200. Demirci B., Hüsnü K., Baser C., Tümen G, “Composition of the essential oil of Salvia aramiensis Rech”, fil.growing in Turkey, J Flavour Frag, (2005), 17-23.
201. Delamare Longaray A.P.L., Ivete T.M.P., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigary S, “Antibacterial activity of the essential oils of Salvia officinalis L. and Salvia trilobaL”, cultivated in south Brazil. Food Chem, (2007), 100: 603–8.
202. Lima R.K., Gracas Cardoso M.d., Andrade M.A., Guimaraes P.L., Batista L.R., Nelson D.L., “Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from Myristica fragrans Houtt and Salvia microphylla H.B.K”, J Am Oil Chem Soc, 89, (2012), 523-528.
203. Satyal, P., Calderon, C., & Setzer, W. N, “Seasonal variation in the essential oil composition of Salvia microphylla”, American Journal of Essential Oils and Natural Products, 8(4), (2020), 06-10.
204. Chialva, F., Monguzzi, F., & Manitto, P, “Composition of the essential oils of five Salvia species”, Journal of Essential Oil Research, 4(5), (1992), 447-455.

205. Khadhri, A., Aouadhi, C., Masson, E., & Pizzi, A, “Comparison of essential oil composition, phenolic compound and biological activities of *Salvia microphylla* and *Teucrium polium* (Lamiaceae)”, *Journal of renewable materials*, 10(6), (2022), 1607-1621.
206. Marchioni, I., Najar, B., Ruffoni, B., Copetta, A., Pistelli, L., & Pistelli, L, “Bioactive compounds and aroma profile of some Lamiaceae edible flowers”, *Plants*, 9(6), (2020), 691 p.
207. Khedher, M. R. B., Khedher, S. B., Chaieb, I., Tounsi, S., & Hammami, M, “Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia”, *EXCLI journal*, 16, (2017), 160 p.
208. Tundis, R., Leporini, M., Bonesi, M., Rovito, S., & Passalacqua, N.G, “A comparative chemical and biological study of its essential oil in the mediterranean context. *Molecules*”, *Salvia officinalis* L. from Italy, 25(24), (2020), 5826 p.
209. Zerkani, H., Kharchoufa, L., Tagnaout, I., Fakchich, J., Bouhrim, M., Amalich, S & Zair, T, “Chemical Composition and Bioinsecticidal Effects of *Thymus zygis* L., *Salvia officinalis* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. Essential Oils on Medfly *Ceratitis capitata* and Tomato Leaf Miner *Tuta absoluta*” *Plants*, 11(22), (2022), 3084 p.
210. Jažo, Z., Glumac, M., Paštar, V., Bektić, S., Radan, M., & Carev, I, “Chemical Composition and Biological Activity of *Salvia officinalis* L. Essential Oil” *Plants*, 12(9), (2023), 1794 p.
211. Chehade, S., Kobeissy, M., Kanaan, H., & Haddad, M, “Comparison between the Chemical Compositions and the In-Vitro Antidiabetic and Anti-Inflammatory Activities of *Salvia Libanotica*’and *Salvia Officinalis*’ Leaves Essential Oils”, *Eur. J. Pharm. Med. Res*, 93, (2022), 34-43.
212. Mohammadian Yasuj, S.F., Najafian, S & Hosseinfarahi, M., “Comparison monoter-pene and sesquiterpene, herbage yield of *Satureja hortensis*, *Thymus vulgaris*, and *Salvia officinalis* from the Fars province of Iran”, *Natural Product Research*, (2022), 1-5.
213. Ilić, Z. S., Kevrešan, Ž., Šunić, L., Stanojević, L., Milenković, L., Stanojević, J., & Cvetković, D, “Chemical Profiling and Antioxidant Activity of Wild and Cultivated Sage (*Salvia officinalis* L.)” *Essential Oil. Horticulturae*, 9(6), (2023), 624 p.

214. Sharopov, F. S., Satyal, P., Setzer, W. N., & Wink, M., “Chemical compositions of the essential oils of three *Salvia* species cultivated in Germany”, *Am. J. Essent. Oils Nat. Prod*, 3, (2015), 26-29.
215. Oukil, N., Hamri, S., & Bedjou, F, “Antimicrobial Effects of Combinations between Essential Oils, Antibiotics, and Major Components of Essential Oils”, *Phytothérapie*, (2022).
216. Boutebouhart, H., Didaoui, L., Tata, S., & Sabaou, N, “Effect of extraction and drying method on chemical composition, and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from *Salvia officinalis* L”, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(3), (2019), 717-727.
217. Dob, T., Berramdane, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., & Chelghoum, “Chemical composition of the essential oil of *Salvia officinalis* from Algeria”, *Chemistry of Natural Compounds*, 43, (2007), 491-494.
218. Mahdjoubi, H., Bakchiche, B., Gherib, A., Boudjelal, F., & Bardaweel, S.. Essential Oil of *Salvia officinalis* L. from the Algerian Saharan Atlas: Chemical Composition and Biological Evaluation. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2020), 13(4).
219. Harizia, A., Benguerai, A., Elouissi, A., Mahi, T., & Bonal, R. Chemical composition and biological activity of *Salvia officinalis* L. essential oil against *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(6), (2021), 1547-1556.
220. Zatout, A., Djibaoui, R., Flamini, G., Ascrizzi, R., Benbrahim, C., Mazari, H. E., ... & Kassah-Laouar, A. Chemical composition analysis of essential oils of four plants from Aurès region of Algeria and their antibacterial and antibiofilm activities against coagulase-negative staphylococci. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 23(3), (2022), 278-289.
221. Lakhel H., Ghorab H., Chibani S., Kabouche A., Semra Z., Smati F., Abuhamdah S., Kabouche Z., “Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Salvia officinalis* from Batna (Algeria)”, *Der Pharmacia Lettre*, 5 (3), (2013),310-314.
222. Mehalaine, S., Belfadel, O., Menasria, T., & Messaili, A, “Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of three medicinal plants from Algerian semi-arid climatic zone”, *Phytothérapie*, 16(S1), (2018), S155-S163.

223. Ait-Mimoune, N., Kada, F., & Drider, H., “Antimicrobial and Antioxidant activities of Algerian *Juniperus phoenicea* and *Salvia officinalis* Essential Oils”, *Journal of the Mexican Chemical Society*, 67(2), (2023), 122-129.
224. Aydoğmuş Z., Yeşilyurt V., Topcu G., “Constituents of *Salvia microphylla*”, *Natural Product Research*, 20, (2006), 775–781.
225. Lu Y., Foo L.Y., “Polyphenolics of *Salvia*”, A review. *Phytochemistry*, (2002), 59: 117–140.
226. Roby M.H., Sarhan M.A., Selim K.A.H., Khael K.I., “Evaluation of antioxidant activity, total polyphenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts”, *Ind Crops Prod*, (2013), 43: 827–831.
227. Wang M., Kikuzaki H., Zhu N., Sang S., Nakatani N., Ho C.T., “Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (2000), 235-238.
228. Cuvelier M.E., Richard H., Berset C., “Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73, (1996), 645-652.
229. Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E.J., Huang T.C., Ho C.T., “Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, (1998), 4869-4873.
230. Lu Y., Foo L.Y., “Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*”, *Tetrahedron Letters*, 42, (2001), 8223-8225.
231. Lu Y., Foo L.Y., “Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*”, *Phytochemistry*, 55, (2000), 263-267.
232. Brieskorn, C.H., Biechele, W., “Flavones from *Salvia officinalis*. Compounds of *Salvia officinalis*”, *Archiv der Pharmazie (Weinheim)* 304, (1971), 557–561.
233. Brieskorn C.H., Kapadia Z., “Constituents of *Salvia officinalis*. XXIII: 5-Methoxysalvigenin in leaves of *Salvia officinalis*”, *Planta Medica*, 35, (1979), 376-378.
234. Masterova I., Uhrin D., Kettmann V., Suchy V., “Phytochemical study of *Salvia officinalis* L”, *Chemical Abstracts* (112, 731917v), *Chemical Papers*, 43, (1989), 797-803.

235. Jakovljević M., Jokić S., Molnar M., Jašić M., Babić J., Jukić H., Banjari I, "Bioactive Profile of Various *Salvia officinalis* L", Preparations. Plants, (2019), 8: 55.
236. Bautista E., Toscano R.A., Ortega A., "Microphyllandioliide, a New Diterpene with an Unprecedented Skeleton from *Salvia microphylla*", organic letters, 15, (2013), 3210- 3213.
237. Esquivel B., Del Socorro Martinez N., Cardenas J., Ramamoorthy T.P., Rodriguez-Hahn L., "The pimarane-type diterpenoids of *Salvia microphylla* var. *neurepia*", Planta Med, 55, (1989), 62-63.
238. Esquivel B., Cardenas J., Rodriguez-Hahn L., Ramamoorthy T. P., "The Diterpenoid Constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*", J. Nat. Prod, 50, (1987), 738-740.
239. Fellah S., Diouf P.N., Petrissans M., Barth D., Romdahne M., Perrin D., Abderrabba M, "Supercritical CO₂, Hydrodistillation extractions of *Salvia Officinalis* L. Influence of Extraction Process on Antioxidant Properties", In Proceedings of the 10th European Meeting on Supercritical Fluids, Reactions, Materials and Natural Products, Strasbourg/Colmar, France, 12–14/15/2005.
240. Azwanida N.N, "Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation", A Review on the Extraction Methods, J Med Aromat Plants, (2015), 4-196.
241. Jokić S., Molnar M., Jakovljević M., Aladić, K., Jerković I, "Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. leaves targeted on Oxygenated monoterpenes, α - humulene, viridiflorol and manool", J Supercrit Fluids, (2018), 133: 253–262.
242. Farhat M.B., Jordán M.J.; Chaouech-Hamada, R. Landoulsi A., Sotomayor J.A, "Variations in Essential Oil, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Tunisian Cultivated *Salvia officinalis*", J.Agric Food Chem, (2009), 57: 10349–10356.
243. Glisic S., Ivanovic J., Ristic M., Skala D, "Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.)", supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. J Supercrit Fluids, (2010), 52: 62–70.
244. Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T, "Ellagitannins as active constituents of medicinal plants", Planta medica, 55, (1989), 117-122.

245. Pearson, D. A.; Schmitz, H. H.; Lazarus, S. A.; Keen, C. L., "Inhibition of in vitro low- density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas", In *Methods in enzymology*, Elsevier, (2001), Vol. 335, 350-360.
246. Huang D., Ou B., Prior R. L., "The chemistry behind antioxidant capacity assays", *J. Agric & Food Chem.*, 53, (2005), 1841-1856.
247. Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y., "Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Free Radic", *Biol. Med.*, 21, (1996), 895-902.
248. Barati Elbaz et Le Marechal, "Eudesmanolides from *Artemisia herba-alba*", *Phytochemistry*, 43, (2008), 309 - 311.
249. Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., Dommes J., "Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests", *Food Chem.*, 113, (2009), 1226-1233.
250. Degaulejac S. C., Provost N., Vivas N., "Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods, *J. Agric*", & *Food Chem.*, 47, (1999), 425- 431.
251. Hua L., Xiaoyu W., Peihong L., Yong L., Hua W., "Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods", *J. Food & Drug Anal.*, 16 (6), (2008), 67-73.
252. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherston R. M., "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochem Pharmacol*, 7, (1961), 88-95.
253. West IC, *Diabet Med*, 17, (2000), 80-171.
254. Chakrabarti R, & Rajagopalan R, *Current Science*, 12, (2002), 1533-1538.
255. Bhosale, U. P., Hallale, B. V. "Gamma radiation induced mutations in black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper).", *Asian Journal of Plant Science & Research*, (2011), 96 p.
256. Bischcoff H, *Eur J Clin Invest*, 24 (3), (1994), 3-10.
257. Bhat M, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR, Joshi BN, "Evi Based Complement Alternate Med", (2011).
258. Bray GA, Greenway FL, *Endocr Rev*, 20, (1999), 79-805.
259. Berdy J., *J. Antibiot.* "Bioactive microbial metabolites", 58, (2005), 1–26.

260. Runyoro D.K., Matee M.I., Ngassapa O.D., et al., "Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity", *BMC Complement. Altern. Med.* 6, (2006), 11 p.
261. Mabona U., Viljoen A., Shikanga E., et al., "Antimicrobial activity of Southern African medicinal plants with dermatological relevance: from an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound", *J. Ethnopharmacol.* 148, (2013), 45–55.
262. Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., et al., "Effect of essential oils on pathogenic bacteria", *Pharmaceuticals* 6, (2013), 1451–1474.
263. Caillet, S., & Lacroix, M., "Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire", *INRS-Institut Armand-Frappier, RESALA*, 1(8), (2007).
264. Burt, S., "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review", *International journal of food microbiology*, (2004), 94(3), 223-253.
265. CLSI, "Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A", *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
266. Choi, G. W., Jo, H. M., Choi, I. H., Choi, G. W., Jo, H. M., & Choi, I. H. "A Study on Antioxidant and Anti-inflammatory of *Salvia microphylla* Ethanol Extract", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 21(3), (2023), 493-501.
267. Jo, H. M., Choi, I. H., Jo, H. M., & Choi, I. H. "A Study on Antioxidant, Pro-collagen Synthesis and MMP-1 Inhibitory Activities of *Salvia microphylla* Extract", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 21(4), (2023), 665-674.
268. Mathew, J., & Thoppil, J. E. "Investigation of the antimutagenic activity of three *Salvia* extracts", *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 4, (2012), 225-230.
269. Zavala-Sánchez, M. A., Gutiérrez, S. P., Romo-Asunción, D., Cárdenas-Ortega, N. C., & Ramos-López, M. A. "Activity of four *Salvia* species against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae)", *Southwestern Entomologist*, 38(1), (2013), 67-73.
270. Ayoub, I. M., George, M. Y., Menze, E. T., Mahmoud, M., Botros, M., Essam, M., & Labib, R. M. "Insights into the neuroprotective effects of *Salvia officinalis* L. and

- Salvia microphylla Kunth in the memory impairment rat model", *Food & function*, 13(4), (2022), 2253-2268.
271. Villa-Ruano, N., Zurita-Vásquez, G. G., Pacheco-Hernández, Y., Betancourt-Jiménez, M. G., Cruz-Durán, R., & Duque-Bautista, H. "Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México", *Biological Research*, 46(2), (2013), 153-160.
272. Amer, A. A., Kassem, S. H., & Hussein, M. A., "Chemical composition, antioxidant, cytotoxic, antiviral, and lung-protective activities of Salvia officinalis L. ethanol extract herb growing in Sinai", *Egypt. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 13(1), (2024), 39 p.
273. Thi-Thuy-My, N., Phan, T. T. T., Pham, T. P. T., & Ha, H. A. "Chemical Composition and Antioxidant Potential of Sage (Salvia Officinalis L.) Cultivated in Dalat", Vietnam. Vietnam (June 2024).
274. Khiya, Z., Hayani, M., Gamar, A., Kharchouf, S., Amine, S., Berrekhis, F., ... & El Hilali, F., "Valorization of the Salvia officinalis L. of the Morocco bioactive extracts: Phytochemistry, antioxidant activity and corrosion inhibition", *Journal of King Saud University-Science*, 31(3), (2019), 322-335.
275. Pop, A. V., Tofana, M., Socaci, S. A., Varban, D., Nagy, M., & Bors, M., "Evaluation of antioxidant activity and phenolic content in different Salvia officinalis L. extracts", *Bull UASVM Food Sci Technol*, 72(2), (2015), 210-4.
276. Abdelkader, M., AHCEN, B., Rachid, D., & Hakim, H., "Phytochemical study and biological activity of sage (Salvia officinalis L.)", *International journal of bioengineering and life sciences*, 8(11), (2015), 1253-1257.
277. Boufadi, M. Y., Keddari, S., MOULAI-HACENE, F., & Sara, C. H. A. A. "Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of Salvia officinalis extract from Algeria", *Pharmacognosy Journal*, 13(2), (2021).
278. Bouteldja, R., Doucene, R., Aggad, H., Abdi, F. Z., Belkhodja, H., Abdali, M., ... & Abaid, S. (2021). Phytochemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Salvia officinalis (L.) extracts from the Tiaret region. *European Journal of Biological Research*, 11(3), 356-366.
279. Sharma, Y., Fagan, J., & Schaefer, J., "In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant potential in different extracts of sage (Salvia officinalis

- L.), and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)", *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 10(1), (2020), 59-69.
280. Datta, S., & Patil, S., "Evaluation of traditional herb extract *Salvia officinalis* in treatment of Alzheimers disease", *Pharmacognosy Journal*, 12(1), (2020).
281. Kennedy, D. O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E. J., Milne, A., & Scholey, A. B., "Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery", *Neuropsychopharmacology*, 31(4), (2006), 845-852.
282. Mervić, M., Bival Štefan, M., Kindl, M., Blažeković, B., Marijan, M., & Vladimir-Knežević, S., "Comparative antioxidant, anti-acetylcholinesterase and anti- α -glucosidase activities of mediterranean salvia species", *Plants*, 11(5), (2022), 625.
283. Smach, M. A., Hafsa, J., Charfeddine, B., Dridi, H., & Limem, K., "Effects of sage extract on memory performance in mice and acetylcholinesterase activity", In *Annales pharmaceutiques francaises*, Elsevier Masson, (2015, July), (Vol. 73, No. 4, pp. 281-288).
284. Cutillas, A. B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J., "Salvia officinalis L. essential oils from Spain: determination of composition, antioxidant capacity, antienzymatic, and antimicrobial bioactivities", *Chemistry & biodiversity*, 14(8), (2017), e1700102.
285. Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A. D., & Brantner, A. H., "Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family", *Molecules*, (2014), 19(1), 767-782.
286. Mocan, A., Babotă, M., Pop, A., Fizeșan, I., Diuzheva, A., Locatelli, M., ... & Crișan, G., "Chemical constituents and biologic activities of sage species: A comparison between *Salvia officinalis* L., *S. glutinosa* L. and *S. transsylvanica* (schur ex griseb. & schenk) schur. Antioxidants", 9(6), (2020), 480.
287. Mahdi, S., Azzi, R., & Lahfa, F. B. "Evaluation of in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential and hemolytic effect of phenolic enriched fractions of the aerial part of *Salvia officinalis* L", *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), (2020), 689-694.
288. Wayne, PA., National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), New York, M2-A6, (1997).

289. Clinical and laboratory standards institute, Quality Control Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Limits for Broth Microdilution and MIC Interpretive Breakpoints, Supplement M27-S2, 2006.
290. Fernandes, S. R., Ferreira, H. D., Stone, S. L., Borges, L., Tresvenzol, L.M.F., Ferri, P.H., Santos, P. A., Paula, J.R., Fiuza, T.S., "Chemical composition and seasonal variation of the volatile oils from *Trembleya phlogiformis* leaves", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V 27, n° 4, (2017), 419-425.
291. Alsohaili, S., "Seasonal Variation in the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil Extracted from *Achillea fragrantissima* Grown in Northern - Eastern Jordanian Desert", *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, V. 21, n° 1, (2018), 139-145.
292. Da Silva, E.P.B, Soares, M.G., Mariane, B., Vallim, M.A., Pascon, R.C., Sartorelli, P., Lago, J.H.G., "The Seasonal Variation of the Chemical Composition of Essential Oils from *Porcelia macrocarpa* R.E. Fries (Annonaceae) and Their Antimicrobial Activity", *Molecules*, V. 18, n° 11, (2013), 13574-13587.
293. Deschepper, R., "Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie" (Doctoral dissertation), (2017).
294. Joulain, D., & König, W. A. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*, EB-Verlag, Hamburg, Germany, 1998. Google Scholar There is no corresponding record for this reference, 591-594.
295. Van Den Dool, H. A. N. D., & Kratz, P. D., "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography", *Journal of chromatography*, (1963).
296. Bruneton J, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 2ème edition. Paris, France, Édition Tec et Doc.
297. Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V., "Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations", *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), (2010), 992-999.
298. Singleton, V. L., & Rossi, J. A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), (1965), 144-158.

299. Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A., "A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*", *Food Chemistry*, 103(3), (2007), 816-822.
300. Akdeniz, M., "Screening of chemical content specific to *Hypericum* species growing in different parts of Turkey by LC-MS/MS and method validation, investigation of their biological activities and chemometric evaluation [Dessertation]", Dicle University Institute of Science Department of Chemistry, Diyarbakır, (2018).
301. Zubia, M, Fabre, M.S., Klervi Le Lann, V.K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M. et Deslandes, E., "Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts", *Food Chemistry*, V. 116, (2009), 693-701.
302. Osman, A. M., "Multiple pathways of the reaction of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH and the oxidized form of the polyphenol", *Biochemical and biophysical research communications*, 412(3), (2011), 473-478.
303. Passari, A. K., Leo, V. V., Singh, G., Samanta, L., Ram, H., Siddaiah, C. N., & Singh, B. P., "In vivo studies of inoculated plants and in vitro studies utilizing methanolic extracts of endophytic *Streptomyces* sp. strain DBT34 obtained from *Mirabilis jalapa* L. exhibit ROS-scavenging and other bioactive properties", *International journal of molecular sciences*, 21(19), (2020), 7364.
304. Ražná, K., Sawinska, Z., Ivanišová, E., Vukovic, N., Terentjeva, M., Stričík, M., & Kačániová, M., "Properties of *Ginkgo biloba* L.: Antioxidant characterization, antimicrobial activities, and genomic microRNA based marker fingerprints", *International journal of molecular sciences*, 21(9), (2020), 3087.
305. Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K., "Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results", *Food chemistry*, 130(4), (2012), 1036-1043.
306. Lien E. J., Ren S., Bui H. H., Wang R., "Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants", *Free Radic. Biol. Med.*, 26, (1999), 285-294.
307. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C., "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), (1999), 1231-1237.

308. Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E., “Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method” *J. Agric. Food. Chem.*, 52, (2004), 7970–7981.
309. Ozyurek, M., Guclu, K., Apak, R., “The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement”, *Trends in Analytical Chemistry*, V. 30, (2011), 652-664.
310. Karagözler A., Erdag B., Emec Y., et al, “Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*”, *Food chem*, 111, (2008), 400-407.
311. Hazzit, M., Baaliouamer, A., & Douar-Latreche, S., “Effect of heat treatment on the chemical composition and the antioxidant activity of essential oil of *Thymus palle-scens de Noé* from Algeria” *Journal of essential oil research*, 25(4), (2013), 308- 314.
312. Hubert A, J, “Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de Soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine”, Thèse de doctorat de l’institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, (2006), 174 p.
313. Oyaizu, M., “Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine”, *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), (1986.), 307–315.
314. Alam, M.N., Bristi, N.J. et Rafiqzaman, M., “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, V. 21, (2013), 143-152.
315. Miller, H. E., “A simplified method for the evaluation of antioxidants”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48(2), (1971), 91-91.
316. Szydłowska-Czerniaka A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, SzlykE, "Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods", *Talanta*, (2008), 6:899-905.
317. Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Ross, R. P., “The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts”, *Food chemistry*, 141(3), (2013), 2170-2176.

318. Amrani, A., Mecheri, A., Bensouici, C., Boubekri, N., Benaissa, O., Zama, D., & Benayache, S., "Evaluation of antidiabetic, dermatoprotective, neuroprotective and antioxidant activities of *Chrysanthemum fontanesii* flowers and leaves extracts", *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 20, (2019), 101209.
319. Solís, C., Becerra, J., Flores, C., Robledo, J., & Silva, M., "Antibacterial and antifungal terpenes from *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin", *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49(2), (2004), 157-161.
320. PA., "Approved Standard-National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne", 28, M27-A3, (2008).
321. Wayne, PA, "Approved Standard-Tenth Edition", Document M07-A10, Clinical and Laboratory Standards Institute, (2015).
322. Cutillas, A. B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J., "Composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial activities of volatile molecules from Spanish *Salvia lavandulifolia* (Vahl) essential oils", *Molecules*, 22(8), (2017), 1382 p.
323. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K., "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), (2016), 71-79.
324. Martínez-Francés, V., Hahn, E., Ríos, S., Rivera, D., Reich, E., Vila, R., & Cañigueral, S., "Ethnopharmacological and chemical characterization of *Salvia* species used in valencian traditional herbal preparations", *Frontiers in Pharmacology*, 8, (2017), 467 p.
325. Heni, S., " Sélection d'extraits bio-actifs des espèces du genre *Thymus* comme conservateurs antibactériens naturels", Th. Doc. Badji mokhtar–Annaba, (2016).
326. Koutsaviti, A., Antonopoulou, V., Vlassi, A., Antonatos, S., Michaelakis, A., Papachristos, D. P., & Tzakou, O., Chemical composition and fumigant activity of essential oils from six plant families against *Sitophilus oryzae* (Col: Curculionidae). *Journal of pest science*, (2018), 91, 873-886.
327. Souihi, M., Khammassi, M., Amri, I., Kouki, H., Hanana, M., Hamrouni, L., & Mabrouk, Y., "Chemical profiling and potential use of *Salvia officinalis* L. essential oil as biological alternative for weed control". *Vegetos*, (2024), 1-8.
328. Aleksovski S.A, Sovová H., "Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L", *J. of Supercritical Fluids*, (2007), 40, 239–245.

329. Bouaziz M, Yangui T, Sayadi S, Dhouib A, “Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia”, *Food and Chemical Toxicology*, (2009), 47, 2755–2760.
330. Alessandra R, Carmen F, Daniela R, Felice S, Sebastiano D, Venera C, Sergio R, Maurizio B., “Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions”, *Food and Chemical Toxicology*, (2013), 55, 42–47.
331. Rus C. F, Pop G, Alexa E, Șumălan R. M, Copolovici D. M, "Antifungal activity and chemical composition of *Salvia officinalis* L, essential oil", *Research Journal of Agricultural Science*, (2015), 47(2), 186-193.
332. Taleb T.K., "Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur le bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) ” Thèse de doctorat, université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie, (2015).
333. Assaggaf, H. M., Naceiri Mrabti, H., Rajab, B. S., Attar, A. A., Alyamani, R. A., Hamed, M, & Bouyahya, A, “Chemical analysis and investigation of biological effects of *Salvia officinalis* essential oils at three phenological stages”, *Molecules*, 27(16), (2022), 5157 p.
334. Kumari, S., Pundhir, S., Priya, P., et al., "EssOilDB: a database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom", *Database*, 2014: 1-12
335. Khalil, R., and Li, Z. G., "Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria", *Afr J Biotechnol*, 2011, 10 (42): 8397- 8402.
336. Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M., “Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices”, *Food chemistry*, (2007), 103(3), 778-786.
337. Ruberto, G., & Baratta, M. T., “Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems”, *Food chemistry*, (2000), 69(2), 167-174.
338. Loizzo, M. R., Tundis, R., Conforti, F., Menichini, F., Bonesi, M., Nadjafi, F., ... & Menichini, F., “*Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates in vitro antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity”, *Nutrition Research*, (2010), 30(12), 823-830.

339. Fu, Z., Wang, H., Hu, X., Sun, Z., & Han, C., "The pharmacological properties of *Salvia* essential oils", *Journal of applied pharmaceutical science*, (2013), 3(7), 122-127.
340. Temel, H. E., Demirci, B., Demirci, F., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., & Hüsnü Can Başer, K., "Chemical characterization and anticholinesterase effects of essential oils derived from *Salvia* species", *Journal of Essential oil Research*, (2016), 28(4), 322-331.
341. Zarić, D., Rakin, M., Bulatović, M., Krunic, T., Lončarević, I., Pajin, B., & Blaževska, Z., "Influence of added extracts of herbs (*salvia lavandulifolia*, *salvia officinalis*) and fruits (*malpighia glabra*) on rheological, textural, and functional (AChE-inhibitory and antioxidant activity) characteristics of dark chocolate", *Journal of Food Measurement and Characterization*, (2024), 18(1), 772-782.
342. Perry, N. S., Houghton, P. J., Jenner, P., Keith, A., & Perry, E. K., "*Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase in vivo", *Phytomedicine*, (2002), 9(1), 48-51.
343. Savelev, S. U., Okello, E. J., & Perry, E. K., "Butyryl-and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents", *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, (2004), 18(4), 315-324.
344. Duru, M. E., Tel, G., Öztürk, M., & Harmandar, M. "Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Salvia chrysophylla* Staph. Rec", *Nat. Prod*, (2012), 6, 175-179.
345. Albano, S., Lima, A. S., Miguel, M. G., Pedro, L. G., Barroso, J. G., & Figueiredo, A. C. "Antioxidant, anti-5-lipoxygenase and antiacetylcholinesterase activities of essential oils and decoction waters of some aromatic plants", *Records of natural products*, 6(1), (2012), 35-48.
346. Castillo-Morales, R. M., Otero, A. L. C., Mendez-Sanchez, S. C., Da Silva, M. A. N., Stashenko, E. E., & Duque, J. E. "Mitochondrial affectation, DNA damage and AChE inhibition induced by *Salvia officinalis* essential oil on *Aedes aegypti* larvae", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 221, (2019), 29-37.

347. Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., & Şener, B., "Activity of essential oils and individual components against acetyl and butyrylcholinesterase", *Zeitschrift fuer Naturforschung C*, 63(7-8), (2008), 547-553.
348. Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araujo, M. E. M., "The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal", *Journal of ethnopharmacology*, 108(1), (2006), 31-37.
349. Savelev, S., Okello, E., Perry, N. S. L., Wilkins, R. M., & Perry, E. K., "Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, (2003), 75(3), 661-668.
350. Tel, G., Öztürk, M., Duru, M. E., Harmandar, M., & Topçu, G., "Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities", *Food and chemical toxicology*, (2010), 48(11), 3189-3193.
351. Loizzo, M. R., Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Conforti, F., Nadjafi, F., & Menichini, F., "In vitro biological activity of *Salvia leriifolia* Benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease", *Journal of Oleo science*, (2009), 58(8), 443-446.
352. Bonesi, M., Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M. R., Conforti, F., Passalacqua, N. G., & Menichini, F., "Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents", *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 25(5), (2010), 622-628.
353. Bahadori, M. B., Valizadeh, H., Asghari, B., Dinparast, L., Farimani, M. M., & Bahadori, S., "Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L", *Journal of Functional Foods*, (2015), 18, 727-736.
354. Al-Mijalli, S. H., Assaggaf, H., Qasem, A., El-Shemi, A. G., Abdallah, E. M., Mrabti, H. N., & Bouyahya, A. "Antioxidant, antidiabetic, and antibacterial potentials and chemical composition of *Salvia officinalis* and *Mentha suaveolens* grown wild in Morocco", *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2022(1), 284-488.
355. Baricevic, D., Bartol, T., "The Biological/Pharmacological Activity of the *Salvia Genus*", University of Ljubljana: Ljubljana, Slovenia, 2000; pp. 143–184.

356. Kuranov, S.O.; Tsypysheva, I.P.; Khvostov, M.V.; Zainullina, L.F.; Borisevich, S.S.; Vakhitova, Y.V.; Luzina, O.A.; Salakhutdinov, N.F. Synthesis and Evaluation of Camphor and Cytisine-Based Cyanopyrrolidines as DPP-IV Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Bioorganic Med. Chem.* 2018, 26, 4402–4409.
357. Paul, K., Bhattacharjee, P., "Process Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of 1, 8-Cineole from Small Cardamom Seeds by Response Surface Methodology: In Vitro Antioxidant, Antidiabetic and Hypocholesterolemic Activities of Extracts", *J. Essent. Oil Bear. Plants* (2018), 21, 317–329.
358. Alkhateeb, H. Thujone Improves Glucose Homeostasis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats through Activation of Akt/GSK-3 Beta Signaling Pathway. *J. Exp. Integr. Med.* (2015), 5, 30.
359. Suijun, W., Zhen, Y., Ying, G., Yanfang, W., "A Role for Trans-Caryophyllene in the Moderation of Insulin Secretion", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444, (2014), 451–454.
360. Basha, R.H.; Sankaranarayanan, C. β -Caryophyllene, "a Natural Sesquiterpene Lactone Attenuates Hyperglycemia Mediated Oxidative and Inflammatory Stress in Experimental Diabetic Rats.", *Chem.-Biol. Interact.* (2016), 245, 50–58.
361. Shehzad, A., Shahzad, R., & Lee, Y. S., "Curcumin: a potent modulator of multiple enzymes in multiple cancers. In *The Enzymes* (Vol. 36, pp. 149-174)", Academic Press, (2014).
362. Kheyar, N., Meridja, D., & Belhamel, K., "Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*", *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia, (2014).
363. Mourey, A., & Canillac, N. J. F. C., "Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers", *Food control*, (2002), 13(4-5), 289-292.
364. Koroch, A. R., Rodolfo Juliani, H., & Zygadlo, J. A., "Bioactivity of essential oils and their components", *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*, (2007), 87-115.
365. Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., & Coulibaly, A., "Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae)", *Journal of Applied biosciences*, (2012), 58, 4234-4242.

366. Mastelic, J., Politeo, O., Jerkovic, I., & Radosevic, N., "Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions", *Chemistry of natural compounds*, (2005), 41, 35-40.
367. Marino, M., Bersani, C., & Comi, G., "Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae", *International journal of food microbiology*, 67(3), (2001), 187-195.
368. Truong, D. H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., & Nguyen, H. C. "Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*", *Journal of food quality*, (2019), 2019(1), 8178294.
369. Tachakittirungrod, S., Ikegami, F., & Okonogi, S., "Antioxidant active principles isolated from *Psidium guajava* grown in Thailand", *Scientia pharmaceutica*, 75(4), (2007), 179-193.
370. Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y., "Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid", *Arabian journal of chemistry*, 3(1), (2010), 43-53.
371. Martin N., Barros L., Santos-Buelga C., Henriques M., Silva S., Ferreira I. C.F.R., "Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L", *Food Chem*, (2015), 170: 378–385.
372. Herrera A., Garrido-Amador P., Martínez I., Samper M.D., López-Martínez J., Gómez M., Packard T.T., "Novel methodology to isolate microplastics from vegetal-rich samples", *Marine Pollution Bulletin*, (2018), 129: 61–69
373. Nazck M., Shahidi F. "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis", *J Pharm Biomed Anal*, (2006), 41: 1523- 1542.
374. Yap C.F., Ho C.W., Wan Aida W.M., Chan S.W., Lee C.Y., Leong Y. S., "Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolic Compounds from Star Fruit (*Averrhoa carambola* L.)Residues", *Sains Malays*, (2009), 38: 511-520.
375. Karimzadeh S., Farahpour M.R. (2017). Topical application of *Salvia officinalis* hydroethanolic leaf extract improves wound healing process, *Inidan J of Experimental Biology*, 55: 98-106.
376. Duletić-Laušević S., Alimpić A., Pavlović D., Marin P.D., Lakušić D., "*Salvia officinalis* of different origin Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content of extracts", *Agro Food Industry Hi Tech*, (2016), 27: 52-55

377. Duletić-Laušević S., Alimpić Aradski A., Tivković J., Gligorijević N., Šavikin K., Radulović S., Danijela Č., Petar D. Marin., "Evaluation of bioactivities and phenolic composition of extracts of *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) collected in Montenegro", *Botanica Serbica*, (2019), 43: 47-58.
378. Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y., "Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine", *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), (2003), 7292-7295.
379. Mohammedi Z., Atik F., "Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst", *Int J Pharma Bio Sci*, 2: 609-615, (2011).
380. Iloki-Assanga S.B., Lewis-luján L.M., Lara-Espinoza C.L., Gil-Salido A.A., Fernandez-Angulo D., Rubio-Pino J.L., Haines D.D. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceros* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes*, 8 : 1-14.
381. Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R., "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs", *Food chemistry*, 105(3), (2007), 940-949.
382. Launay, A., & Bruneton, J., J. Bruneton, "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales", Ed, 15, 1, (2016).
383. Cavin, A. "Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae)", Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté des sciences, (1999).
384. Kim, J. W., & Hong, J. H., "Antioxidant activity, skin whitening, and anti-wrinkle effects of various *Agastache rugosa* fractions", (2021).
385. Hale, A. L., "Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis", Texas A&M University, (2003).
386. Diallo, D., Paulsen, B. S., Liljebäck, T. H., & Michaelsen, T. E. "Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity", *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), (2001), 159-171.
387. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. "Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus*

- mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases", Food chemistry, 114(4), (2009), 1198-1205.
388. Shon, M.Y., Kim, T.H., Sung, N.J., "Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetales*) extracts", Food Chem, (2003), 82: 593-597.
389. N'guessan J.D., Zirihi G.N., Kra A.K.M., Kouakou K., Djaman A.J., Guede-Guina F., "Free radical scavenging activity, flavonoid and phenolic contents of selected Ivorian plants", IJONAS, (2007), 4: 425-429.
390. Zhi P. R., Liang L. Z., Yi M. L., "Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* Leaves", Molecules, (2008), 13: 2545-56
391. Vermerris, W., & Nicholson, R., "Phenolic compound biochemistry. Ed. Netherlands", SPRINGER, (2006), 1-70.
392. Rankel, E. N., & Meyer, A. S., "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants", Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(13), (2000), 1925-1941.
393. Ianat M., Esmailiziadeh M., Badavi M., Samarbafzadeh A., Naghizadeh B. "Cardiac protective effects of crocin on hemodynamic parameters and infarct size in compare vitamin E after ischemia reperfusion in isolated rat heart", Planta Medica, (2014), 80: 393-398.
394. Ayaz, M., Junaid, M., Ahmed, J., Ullah, F., Sadiq, A., Ahmad, S., & Imran, M. (2014). Phenolic contents, antioxidant and anticholinesterase potentials of crude extract, subsequent fractions and crude saponins from *Polygonum hydropiper* L. BMC complementary and alternative medicine, 14(1), 145.
395. Khacheba I., Boussoussa H., Djeridanea A., Bekhaouab A., Bensayahb N., Yousfia M., "Glucosidase inhibitory effect and antioxidant activity of the extracts of eighteen plants traditionally used in Algeria for diabetes", Current Enzyme Inhibition, (2017), 13: 1- 12.
396. Eidi M., Eidi A., "Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats", Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, (2009), 3: 40-44.
397. Behradmanesh S., Derees F., Rafieian-kopaei M. "Effect of *Salvia officinalis* on diabetic patients", J Ren Inj Prev, (2013), 2: 51-54

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications Internationales

Chouit, H., Touafek, O., Brada, M., Benssouici, C., Fauconnier, M. L., El Hattab, M., “GC-MS analysis and biological activities of Algerian *Salvia microphylla* essential oils.”, Journal of the Mexican Chemical Society, (Août 2021), 582-601.

Communications internationales

1. Chouit, H., Touafek, O., Brada, M., El Hattab, M., Fauconnier, M.L., “Antioxydant and anticholinestérase activity of the ethanolic extract of *Salvia officinalis* from algeria”, VIIème Congrès International de biotechnologie et valorisation des bio-ressources, (20 au 23 Mars), (2020), Tabarka- Tunisie.

2. Chouit, H., Touafek, O., Brada, M., El Hattab, M., Fauconnier, M.L., “Chemical composition, anticholinestérase and Alpha-Glucosidase activities of *Salvia officinalis* essential oil”, Third International Symposium Medicinal Plants and Materials (MPM), (February 25 to 27), (2020), Tebessa.

3. Chouit, H., Touafek, O., Brada, M., Harhour, A., El Hattab, M., “Evaluation de l’activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *Salvia microphylla*”, 1^{er} Symposium International sur la Recherche Antimicrobienne, (02 au 03 Mai), (2018), Khemis Miliana.

Communications nationales

1. Chouit, H., Brada, M., Touafek, O., El Hattab, M., Fauconnier, M.L., “Composition chimique et activité antibactérienne de l’huile essentielle de *Salvia officinalis* d’Algérie“, 1^{ère} journée National sur « Cancer, Environnement et Alimentation », (04 Février 2019). Boumerdès.

2. Chouit, H., Touafek, O., Brada, M., El Hattab, M., Fauconnier, M.L., “Evaluation of antioxydant activity of chloroformic extract of the genus *salvia*“, 1^{er} Symposium National Biomolécules & Biotechnologies, (18 au 19 Décembre), (2019), Blida.

3. Chouit, H., Touafek, O., Brada, M., Fauconnier, M.L., El Hattab, M., “Chemical characterization and antioxydant, anticholinestérase, and alpha- glucosidase activities of algerian *Salvia microphylla* essential Oils“, 1^{er} Séminaire National de Chimie Appliquée (SNCA 2023), (09 au 10 Mai), (2023), Blida.

GC-MS Analysis and Biological Activities of Algerian *Salvia microphylla* Essential Oils

Hafsa Chouit¹, Ouassila Touafek^{1*}, Moussa Brada², Chawki Benssouici³, Marie-Laure Fauconnier⁴, Mohamed El Hattab¹

¹Laboratory of Natural Products Chemistry and Biomolecules, University Blida 1, BP 270 09000, Blida, Algeria.

²Valuation of Natural Substances Laboratory, Djilali Bounaama University of Khemis-Miliana, Road of Theniet El-Had, 44225, Algeria.

³Biotechnology Research Center (CRBT), Ali Mendjli New Town UV 03, BP E73, Constantine, Algeria.

⁴Laboratory of Chemistry of Natural Molecules, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Passage of Deportees 2, B-5030 Gembloux, Belgium.

*Corresponding author: Ouassila Touafek, email: wass_touafek@yahoo.fr

Received May 11th, 2021; Accepted August 26th, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v65i4.1581>

Abstract. *Salvia microphylla* is a known species due to its broad uses in traditional medicine against memory loss and rheumatism. The knowledge regarding the chemical composition and biological activities of the species collected in Algeria, no studies have been reported in the literature. Therefore, the present work focuses on the characterization of the chemical composition of the essential oils (EOs) and the determination of the antioxidant, anticholinesterase, α -glucosidase, and antimicrobial activities of *Salvia microphylla*. The EOs were obtained by hydrodistillation from the aerial parts, leaves and stems and submitted to chemical analysis by GC and GC/MS. The β -Caryophyllene was identified as the main constituent in the aerial parts and leaves essential oils with 16.75 ± 0.02 % and 17.86 ± 0.07 %, respectively. Likewise, the α -Eudesmol was the predominant component in the stems oil with $(21.47 \pm 0.20$ %). The antioxidant activity of EOs was estimated through using four comparative methods: DPPH, ABTS^{•+}, Reducing power and CUPRAC assays. The Stems oil was the most active one in CUPRAC assay, with an IC₅₀ value with 7.72 ± 0.43 μ g/mL. The enzyme inhibitory activity of the essential oils was realized against key enzymes involved in type 2 diabetes (α -glucosidase) using 4-Nitrophenyl- α -d-glucopyranoside as substrate and in neurodegenerative (AChE and BChE) diseases. The highest anticholinesterase activity against acetylcholinesterase was observed in the EO of aerial parts essential (IC₅₀: 23.65 ± 0.73 μ g/mL). The EO isolated from stems (IC₅₀: 37.07 ± 1.44 μ g/mL) exhibited a butyrylcholinesterase activity very close to that of analytical standard galantamine (IC₅₀: 34.75 ± 1.99 μ g/mL). Furthermore, all EOs displayed high inhibitory activity against α -glucosidase, better to that of the standard acarbose. The EOs of *Salvia microphylla* display potential properties against type 2 diabetes. A broth microdilution method was used to evaluate the antimicrobial activity of *Salvia microphylla* EOs, against eleven microbial strains and two yeast. The EOs showed better antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria except for *Pseudomonas aeruginosa*, with the stems essential oil being more efficient. Moreover, significant antifungal activity was observed against *Candida albicans*.

Keywords: *Salvia microphylla*; GC-MS analysis; antioxidant; anticholinesterase; antimicrobial.

Resumen. *Salvia microphylla* es una especie conocida debido a su amplio uso en medicina tradicional, contra la pérdida de memoria y el reumatismo. En el caso de la especie de planta recolectada en Algeria, no hay datos publicados sobre su composición química y sus actividades biológicas. Por ello, el presente trabajo ha sido

enfocado en la caracterización de la composición química de aceites esenciales (EOs) de *Salvia microphylla* y en la determinación de sus actividades antioxidante, anticolinesterasa, α -glucosidasa y antimicrobiano. Los EOs fueron obtenidos mediante hidrodestilación de las partes aéreas, ojas y tallos, y fueron sometidos al análisis por cromatografía de gases con detección por ionización en flama y por espectrometría de masas. Se identificó a β -cariofileno como el componente principal de los aceites de las partes aéreas y de tallos con concentraciones de $16.75 \pm 0.02 \%$ y $17.86 \pm 0.07 \%$, respectivamente. Por su parte, el α -Eudesmol fue encontrado como componente predominante en aceite de tallos ($21.47 \pm 0.20 \%$). La actividad antioxidante de los EOs fue estimada en base a cuatro métodos compartivos: DPPH, ABTS•+, poder reductor y ensayo CUPRAC. El aceite de tallos resultó ser el más activo en ensayo CUPRAC, con el valor IC_{50} de $7.72 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$. La actividad inhibitora de enzimas de los EOs fue evaluada contra principales enzimas involucrados en diabetes tipo 2 (α -glucosidasa), utilizando 4-Nitrofenil- α -d-glucopiranosida como sustrato, y en enfermedades neurodegenerativas (AChE y BChE). La mayor actividad anticolinesterasa y acetilcolinesterasa fue observada en el EO de partes aéreas (IC_{50} : $23.65 \pm 0.73 \mu\text{g/mL}$). El EO aislado de tallos (IC_{50} : $37.07 \pm 1.44 \mu\text{g/mL}$) presentó actividad de butirilcolinesterasa muy similar a la del estándar analítico, galantamina (IC_{50} : $34.75 \pm 1.99 \mu\text{g/mL}$). Aunado a ello, todos EOs presentaron una alta actividad inhibitora contra α -glucosidasa, que era mejor comparando con la del estándar de acarbosa. Los EOs de *Salvia microphylla* presentan potenciales propiedades contra diabetes tipo 2. Para evaluar la actividad antimicrobiana de los EOs de *Salvia microphylla*, se utilizó el método de microdilución en caldo, contra once sepas microbianas y dos de levadura. La mejor actividad se observó contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, excepto *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales presentaron alta resistencia. Los EOs presentaron también importante actividad antifúngica contra *Candida albicans*.

Palabras clave: *Salvia microphylla*; análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas; antioxidantes; anticolinesterasa; antimicrobiano.

Introduction

Essential oils are widely used as an alternative medicine in varied industries such as pharmaceutical, agricultural, cosmetic and food industries due to their antiviral, antibacterial, antifungal, antioxidant, antiparasitic, antidiabetic, anticancer, aromatherapy and perfume properties [1]. Lamiaceae is a family of species which is an important source of a wide range of bioactive compounds, it comprised of 236 genera and 6900-7200 species, distributed all over the world. About 900 species of the genus *Salvia* are represented in five subgenera widespread throughout the world [2]. Nearly, 23 *Salvia* species cultivated in Algeria, among which *S. buechananii*, *S. jaminiana*, *S. verbenaca* subsp., *S. clandestina*, *S. barrilieri*, *S. argentea* subsp. and *S. algeriensis* Desf., were the subject of various studies [3-5]. Several species of *Salvia* have been applied as medicinal plants and used, among others, for enhancing memory functions and treatment of simple brain disorders [6], but also, to treat microbial infections, inflammation, malaria, cancer, and to disinfect homes after sickness [7,8]. The chemical composition of essential oil of *Salvia* species was reported in many review papers [5,9-17]. The most important compounds of this essential oil are monoterpenes such as α -Pinene, β -Pinene, camphor, 1,8-cineole and borneol; and sesquiterpenes like β -Caryophyllene, germacrene D, Caryophyllene oxide. Several investigations on biological activities of various *Salvia* species revealed the possess spasmolytic, oestrogenic, antimicrobial, antifungal, antioxidant, anticholinesterase and antidiabetic activities of EOs [18-24].

Salvia microphylla is native species originated from Mexico [25], used in the treatment gastrointestinal, central nervous system, gynecology, and obstetrics diseases [26]. In Ecuador, Fresh leaves, and flowers of *Salvia microphylla* are used to treat inflammation of the arms, feet, and rheumatism [27]. *Salvia microphylla* is quite easy to grow, it is found in Italy, Spain, Japan, and Turkey. EOs are also valorized for their antimicrobial and antioxidant activities [28]. In addition, the literature has described the insecticidal activity of the n-hexane extracts [29]. In Algeria, this species is used in traditional medicine for some stomach ailments. The literature reports, the principal compounds isolated from *Salvia microphylla* are phenolic esters, eudesmane-type sesquiterpenes, triterpenes [30], abietane-, clerodane-, neo-clerodane-, microphyllan-, pimarane-type diterpenoids [31-34], β -sitosterol, ursolic [32] and oleanolic acid [29]. Several studies have been

carried out on the composition of the essential oil of *Salvia microphylla* and the results have revealed that β -caryophyllene and α -eudesmol are the major compounds [28,35,36]. The chemical composition of the flowers Eos of *Salvia microphylla* collected in Italy have revealed to be completely different compared to the other parts of the plant, the principal compounds identified are Davana ether, carvacrol and thymol [37]. The present study aims to investigate the chemical composition of the essential oils obtained from aerial parts, leaves, and stems of *Salvia microphylla* collected in Algeria and to explore the antioxidant and the antimicrobial activities. Furthermore, we evaluate the anti-diabetic and anticholinesterase activities (anti-Alzheimer's activities) of EOs. To the best of our knowledge, no studies have been reported on *Salvia microphylla* stems and enzyme inhibitory activities (anti-diabetic and anticholinesterase) of the species coming from Algeria.

Experimental

Materials and methods

Solvents and reagents (Chemicals)

All antioxidant, enzymatic and antibacterial activities measurements were carried out on a 96-well microplate reader, PerkinElmer Multimode Plate Reader EnSpire at National Center of Biotechnology Research.

As regards antiradical tests, the reagents: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), butylatedhydroxyanisole (BHA), butylatedhydroxytoluene (BHT), α -tocopherol, ascorbic acid, Tannic acid, 2,2'-azinobis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS⁺) neocuproine, trichloroacetic acid (TCA), potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany). Sodium sulphate (Na₂SO₄), iron(III) chloride (FeCl₃), copper(II) chloride (CuCl₂) and ammonium acetate (AcNH₄) were acquired from Biochem Chemopharma, (France). Regarding enzymatic tests: Acetylthiocholine iodide, S-Butyrylthiocholine iodide, 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Acetylcholinesterase from electric eel (AChE, Type-VI-S, EC 3.1.1.7, 827,84 U/mg, Sigma), butyrylcholinesterase from horse serum (BChE, EC 3.1.1.8, 7,8 U/mg, Sigma), Galantamine, α -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (Type I, ≥ 10 units/mg protein), 4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside ($\geq 99\%$), and Acarbose ($\geq 95\%$) were obtained from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Stern-Heim, Germany). All other chemicals and solvents were of analytical grade.

Microorganism cultures

The antibacterial activity of Essential oils were tested against the following microorganisms: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25843, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella abony* ATCC 14028, *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 23308, *Enterobacter cloacae* ATCC13047, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Micrococcus luteus* ATCC 14110, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 49594, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 14975, *Candida albicans* ATCC 1023 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. The reference strains (ATCC, American type culture collection) were obtained from the Pasteur Institute (Algiers), using conventional methods by The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [38] and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [39].

Plant material

During the flowering stage of July (2018), the aerial parts of *Salvia microphylla* were collected from Blida (Southwest of Algiers, Algeria, latitude: 36°28'12"N; longitude: 2°49'39"E, altitude: 252 m; average temperature: 17.9 °C; average rainfall: 791 mm).

Salvia microphylla was identified at the Hamma Botanical Garden, Algiers. A voucher specimen (SmL5/16) was deposited at the herbarium of the Laboratory of Natural Products Chemistry and Biomolecules, University Blida 1. The samples were air-dried in the shade at room temperature for 10 days until constant weight, and subsequently, they are stored in the appropriate conditions until use.

Essential oils extraction

A sample of each air-dried part (aerial parts, leaves, stems) of *Salvia microphylla* was submitted to conventional hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus, the plant material (100 g) was placed in a 2 L round bottom flask with 2/3 parts (1300 ml) of distilled water, and then extracted for 3h after boiling. The different *Salvia microphylla* EOs obtained were separated from water and stored at 4-5 °C after removing traces of water by using anhydrous sodium sulphate sulfate (Na₂SO₄) until analysis.

Essential oils analysis

The EO was dissolved in hexane at a concentration of 2 mg/mL. The different EOs were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS) and gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) in order to identify the chemical composition and to determine the mean percentage of compounds, respectively.

Gas chromatography–flame ionization analysis (GC-FID)

The analysis was carried out by means of an Agilent technology HP GC 6890 system with a flame ionization detector (FID), using a HP-5 capillary column coated with 5 % phenyl-methylsiloxane (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness Agilent Technologies, Hewlett-Packard, CA, USA). The temperature program was as follows: 40 °C during for 1 min, then raised in a first ramp to 200 °C at 6 °C/min, followed by a second ramp to 280 °C at 30 °C/min, and finally stayed at 280 °C for 2 minutes. The injection was realized in splitless mode at 280 °C with a ratio of 1/90; the volume injected was 1 µL. The detector temperature was fixed at 300 °C, the carrier gas was helium at 1 mL/min.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS)

The analysis was performed using an Agilent 5973 GC-MS coupled to an Agilent 6890 gas chromatograph fitted with a split-splitless injector at 250 °C. An HP-5MS Agilent capillary column (30 m × 0.25 mm, df = 0.25 µm) was used. The analytical conditions were as follows: temperature program: from 40 – 250 °C at 6 °C/min. The carrier gas was helium at 1 mL/min. The mass spectra have been recorded in EI mode at 70 eV, the mass range of m/z: 35 to 500 amu. The source and quadrupole temperatures were fixed at 230 °C and 150 °C, respectively. The identification of the components was performed on the basis of chromatographic linear retention indices (LRI) and by comparison of the recorded spectra with a computed data library (Wiley 275.L). For sesquiterpene hydrocarbons, further confirmations were obtained by comparing the mass spectra with data from the literature [40,41]. The linear retention indices (LRI) calculations were performed according to Van den Dool and Kratzequation [42], a homologous series of n-alkanes (C₇-C₃₀) was injected, under the same chromatographic conditions used for the analysis of the essential oils and used for determining the retention indices of all detected volatile compounds. The Main components have been confirmed by comparison of their retention data with co-injected pure (commercially available) references.

Antioxidant activity

The antioxidant activity was determined using four comparative methods which are DPPH free radical scavenging assay, ABTS⁺ radical scavenging assay, Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay and Reducing power assay.

DPPH free radical scavenging assay

The DPPH radical scavenging was discovered by Goldsmith and Renn in 1922 [43], it was become the most commonly use antioxidant method reported to evaluate the antioxidant capacity of chemical compounds as well as natural products [44,45]. The DPPH radical, which absorb at 517 nm, is reduced to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) by means of connecting a hydrogen atom or an electron to the radical center due to the reaction with antioxidant. The method could be used according to literature [46,47]. with some modifications. Thus, 160 µl of the methanolic solution of DPPH (0.1 mM) was added to 40 µl of the sample solution, dissolved in methanol at various concentrations (EOs and standards). A negative control (Blank solution) was prepared using the methanol in addition to the DPPH reagent. The reaction mixture was incubated at 37°C in darkness for 30 min, absorbance was measured using a 96-well microplate reader at 517 nm. The

decrease in the absorbance indicates the augmentation of free radical scavenging activity. The α -tocopherol, Butyl hydroxyl toluene (BHT) and Butyl hydroxyanisole (BHA) were used as antioxidant standards for comparison. The free radical scavenging activity of each solution was calculated as percent inhibition according to the following equation. The results were given as IC₅₀ value ($\mu\text{g/mL}$) corresponding to the concentration of 50 % inhibition:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

where, A_{control} is the absorbance of the negative control; A_{sample} is the absorbance of the reaction mixture, obtained from the microplate reader.

ABTS⁺ radical scavenging assay

The ABTS⁺ scavenging activity was carried out using the method described by Re [48], with slight modifications. The ABTS⁺ was produced by the reaction between 7 mM ABTS in H₂O and 2.45 mM potassium persulfate, stored in the dark at room temperature for 12h to 16h. The radical cation was stable in this form for more than 2 days when stored in the dark at room temperature. First, the ABTS⁺ solution obtained was diluted in methanol or distilled water to obtain the absorbance of 0.700 ± 0.020 at 734 nm. Then, 160 μl of ABTS⁺ solution was added to 40 μl of the sample solution, dissolved in methanol at various concentrations (EOs and standards). After 10 min at room temperature, the absorbance was measured using a 96-well microplate reader at 734 nm. The BHT and BHA were used as antioxidant standards for comparison. The percentage inhibitions were calculated for each concentration relative to a blank absorbance. The scavenging capability of ABTS⁺ was calculated using the following equation. The results were given as IC₅₀ value ($\mu\text{g/mL}$).

$$\text{ABTS scavenging effect (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

where, A_{Control} is the initial concentration of the ABTS⁺ and A_{Sample} is the absorbance of the remaining concentration of ABTS⁺ in the presence of the sample.

Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay

The cupric reducing antioxidant capacity was performed according to literature [49] with minor changes, using a 96-well microplate. A volume of 50 μl of Cu (II) solution (10mM) was placed in each well, mixed with 50 μl of neocuproine solution (7.5 mM), 60 μl of AcNH₄ buffer (1 M, pH 7.0) and 40 μl of (EOs and standard) at different concentrations levels, as to make the final volume 200 μL . The resulting mixture was incubated for 1 h in darkness at room temperature. Then, the absorbance of the solution was measured at 450 nm against a reagent blank and α -tocopherol, BHT and BHA as standards. The results were given as A_{0.5} ($\mu\text{g/ml}$) corresponding to the concentration indicating 0.50 absorbances.

Reducing power assay

The antioxidant was determined as described previously [50] with some modifications. Thus, 10 μl of the sample solution at various concentrations, 40 μl of phosphate buffer (pH 6.6) and 50 μl of potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) (1 %) were mixed and then, incubated at 50 °C for 20 min. After cooling, the solution was mixed with 50 μl of trichloroacetic acid solution (TCA) (10 %), 40 μl of distilled water and 10 μl of ferric chloride solution (0.1 %). The absorbance was measured at 700 nm using a 96-well microplate reader. Tannic acid, ascorbic acid and α -tocopherol were used as standards. The results were given as A_{0.5} ($\mu\text{g/ml}$). Reducing power activity was calculated as follows:

$$\text{Reducing power activity (\%)} = \left[\left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) - 1 \right] \times 100$$

where, A_{sample} and $A_{control}$ are the absorbance of sample and blank solutions, respectively.

Anticholinesterase activity

The Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activity of essential oils was evaluated by slightly modifying the method described by *Ellman et al* [51], which is based on the reaction of released thiocholine to give a colored product with a chromogenic reagent. *Electrophorus electricus* AChE and equine serum BChE were used, while acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride, respectively, were used as substrates of the reaction. 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and galantamine, respectively, were employed for measurement of the cholinesterase activity and as a positive control (standards). Concisely, 10 μ l of sample solution (EOs and galantamine) dissolved in methanol at different concentrations was mixed with 150 μ l of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.0), 20 μ l AChE (5.32×10^{-3} U) or BChE (6.85×10^{-3} U) solution and incubated at 25 °C for 15 min, afterward, 10 μ l of DTNB (0.5 mM) was added with 10 μ l of acetylthiocholine iodide (0.71 mM) or butyrylthiocholine chloride (0.2 mM). A 96-well microplate reader was used as spectrophotometric monitoring of the hydrolysis of these substrates by the formation of yellow 5-thio-2- nitrobenzoate anion as the result of the reaction of DTNB with thiocholine, released by the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine iodide or butyrylthiocholine chloride, at a wavelength of 412 nm. The results were given as IC_{50} value (μ g/mL) corresponding to the concentration of 50 % inhibition. The percentage of inhibition of AChE or BChE was determined by comparing the reaction rates of the samples relative to a blank sample (ethanol in phosphate buffer pH 8) using the formula:

$$Inhibition (\%) = \left(\frac{E - S}{E} \right) \times 100$$

where, E is the activity of the enzyme without the test sample and S is the activity of the enzyme with the test sample.

In-vitro Yeast α -Glucosidase Inhibition Assay

The enzymatic assay for α -glucosidase was carried out on 96-well microplates according to the method described by Lordan and Amrani [52,53], using p-Nitrophenyl- α -d-glucopyranoside (p-NPG) as a substrate. A volume of 50 μ l of EO solution at different concentrations (1000 μ g/ml –15,625 μ g/ml) in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) was mixed with 50 μ l of 5 mM p-NPG solutions (in phosphate buffer) in a 96-well plate. After incubation at 37 °C for 5 min, 100 μ l of 0.1 U/ml α -glucosidase from Baker's yeast (in phosphate buffer) was then added to each well. The negative control was prepared without EO and Acarbose was used as positive control (standard). Glucosidase activity was given by measuring the release of p-nitrophenol from p-NPG at 405 nm for 30 min using a microplate reader set to 37 °C. The results were expressed as the EO concentration that would exhibit a 50 % inhibition of enzyme activity (IC_{50}). The inhibition percentage was calculated as follows:

$$\% \alpha - Glucosidase \text{ inhibition activity} = \left(\frac{Absorbance \text{ of sample}}{Absorbance \text{ of control}} \right) \times 100$$

Antimicrobial activity assay

Antimicrobial activity of *Salvia microphylla* essential oils was tested against five Gram-negative, six Gram-positive bacteria and two yeast. The broth microdilution method was used for the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) in 96-well microplates [54-56]. The tests were performed in Muller Hinton Broth (MHB) for bacteria and Sabouraud Dextrose Broth (SDB) for yeast. The bacterial strains were cultured overnight at 37 °C in Mueller Hinton Broth (MHB), and the yeasts were cultured overnight at 30 °C in Sabouraud dextrose broth (SDB).

Serial of double-fold dilutions of EOs in broth medium was prepared aseptically, in a microtiter plate (96 wells). Shortly, 50 μ L of MHB for bacteria and SDB for yeast were put in each well, successive dilutions were carried out in order to obtain, from the first to the 9th well, a final concentrations ranging between 0.10-

26.66 $\mu\text{L/mL}$. Then, each well is inoculated with 50 μL of a microbial suspension adjusted to a final optical density (OD) of 0.5 McFarland units (OD at 600 nm between 0.08 to 0.12), corresponding to $1-5 \times 10^6$ cells/mL for yeast strains and approximately at $1-2 \times 10^8$ UFC/mL for bacteria. Negative controls were prepared with the culture medium and microorganisms. It must be noticed that the 11th and the 12th wells were reserved for testing that culture medium was sterile and that DMSO, used for emulsifying the EO, did not show any antimicrobial activity, respectively. The microplate was incubated at 37 °C for 24 hours for bacteria and 26 °C for 48 hours for yeast. The Growth of the organism in microdilution wells was detected by the unaided eye and by measuring optical density at 600 nm using a 96-well microplate reader. The well containing the lowest concentration of essential oil in which the microorganism did not show visible growth was classified as the MIC. Amoxicillin and ketoconazole were used as the antibacterial and antifungal positive control.

The minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of *Salvia microphylla* essential oils were determined after broth microdilution by sub-culturing of 100 μL from wells, yielding a negative microbial growth after incubation on solid medium in Petri dishes with Muller Hinton Agar (MHA) for bacteria and Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for yeasts and incubated at 37 °C for 24 h. The lowest concentration of EO needed to kill 99.9 % of the final inoculum was defined as minimum bactericidal concentration (MBC) or minimum fungicidal concentration (MFC), respectively [57].

Results and discussion

Extraction yield

The yields of essential oils of aerial parts, leaves and stems were 0.63 % (w/w), 0.75 % (w/w) and 0.23 % (w/w) of dry weight, respectively. The oils obtained were yellow liquids characterized by a strong odor. In comparison to other studies, the aerial parts essential oil yield obtained in the present study was lower than those previously reported for the same species from Italy (3.9 %) [35] and Spain (0.8 %) [58].

The yield variation is due to environmental conditions and geographical origin of the species as well as the hydrodistillation, the plant treatment after harvesting and storage conditions.

Chemical composition of the essential oils

The chemical analysis of the three essential oils by GC and GC-MS conduct to the identification of 36, 32, and 47 compounds representing 98.40 %, 98.55 % and 91.38 % of the total composition from the aerial parts, leaves and stems of *Salvia microphylla*, respectively.

The chemical composition of the EOs as well as the calculated linear retention index and the ones reported in literature and percentage content are listed in table 1. The latter reveals that, first, the chemical composition is composed of monoterpenes with about 12-32 % and sesquiterpenes with about 66-78 %, second, the same major compounds are, globally, present in the essential oils of the three parts of *Salvia microphylla*. Thus, as mentioned in table 1, the content of the main compounds presents in EOs of Aerial parts (Fig.1 (A)), Leaves (Fig.1 (B)) and Stems (Fig.1 (C)) are, respectively, the monoterpenes 1,8-cinéole (5.87 %, 7.50 %, 1.98 %), Bornyl acetate (8.14 %, 8.35 %, 5.18 %) and the sesquiterpenes β -Caryophyllene (16.75 %, 17.86 %, 15.65 %), Aromadendrene (5.39%, 5.30 %, 4.90 %), Spathulenol (5.04 %, 4.30 %, 5.12 %), γ -Eudesmol (6.27 %, 5.93 %, 7.43 %), β -Eudesmol (6.04 %, 6.05 %, 0 %), α -Eudesmol (11.41 %, 9.86 %, 21.47 %).

it must be highlighted that Diterpenes (Abietatriene, Ferruginol) was detected only in Stems essential oil with a lower percentage (0.44 %). Whereas sesquiterpenes have the same content in aerial part and leaves EOs with about 65 %, however, their content is around 80 % in the stems. It seems that the stems privileged the biosynthesis of sesquiterpenes probably for their great exposure to the sun.

The main compounds are almost present in all three parts of the plant. Except for β -Eudesmol which is in high proportion in the aerial parts and the leaves while it is completely absent in the stems. β -Caryophyllene and α -Eudesmol are the major sesquiterpenes in the three EOs. However, the content of β -Caryophyllene is high in the three parts of the plant while α -Eudesmol is present in the stems with a content of 21.4 % and relatively low in the aerial parts and leaves. This predominance of α -Eudesmol in the stems EO was qualitatively similar to already published data [36] for the aerial parts of *Salvia microphylla* from Greece with, a high content of α -eudesmol (20.5 %), β -caryophyllene (13.7 %), γ -Eudesmol (8.2 %), Spathulenol (7.0 %).

These differences reported in essential oil compositions are probably due to several parameters such as the origin of the material, the period of harvest, the part of the plant and the isolation method of the essential oil.

Some studies reported in the literature has shown that β -Caryophyllene (10.80 %), bornyl acetate (9.13 %), 1,8-cinéole (8.43 %), α -eudesmol (6.41 %), α -pinene (5.89 %), camphene (5.31 %) and β -eudesmol (5.27 %) were the main components in essential oils isolated from aerial parts of *Salvia microphylla* from Italy [35]. In another study, *Salvia microphylla* grown in Brazil was characterized by the presence of β -caryophyllene (15.35 %), α -eudesmol (14.06 %), β -eudesmol (8.74 %), γ -eudesmol (7.64 %) and Bicyclogermacrene (6.17 %) as the major compounds isolated from leaves [28].

Comparison between the composition of *Salvia microphylla* essential oil, not previously reported from Algeria and the literature data show that the predominance of β -caryophyllene, in our sample was similar to those reported in the literature [28,35]. It therefore seems that biosynthesis within the species promotes the formation of β -Caryophyllene which could be used as a biomarker in chemotaxonomy or to identify the species' chemotype.

Table 1. Chemical composition of the essential oils isolated from aerial parts leaves and stems of *Salvia microphylla*

No.	compounds ^a	Class	LRI _{cal} ^b	LRI _{Lit} ^c	Percent content (%) ^d		
					Aerial parts	Leaves	Stems
1	α -Thujene	mh	927	925	Tr	Tr	-
2	α -Pinene	mh	933	939	4.09 ± 0.01	4.63 ± 0.02	0.91 ± 0.04
3	Camphene	mh	947	951	4.04 ± 0.02	4.48 ± 0.03	0.94 ± 0.14
4	β -Pinene	mh	976	978	2.29 ± 0.01	2.63 ± 0.03	0.76 ± 0.04
5	α -Terpinene	mh	1017	1017	-	-	Tr
6	p-Cymene	mh	1026	1026	Tr	Tr	Tr
7	β -Phellandrene	mh	1028	1045	1.65 ± 0.01	1.99 ± 0.09	0.92 ± 0.07
8	1,8-cinéole	om	1030	1046	5.87 ± 0.02	7.50 ± 0.01	1.98 ± 0.10
9	γ -Terpinene	mh	1058	1060	Tr	Tr	0.39 ± 0.09
10	α -Thujone	om	1105	1105	-	-	Tr
11	Camphor	om	1144	1145	2.61 ± 0.01	2.58 ± 0.18	1.10 ± 0.05
12	Borneol	om	1166	1166	Tr	Tr	0.37 ± 0.02
13	Terpinen-4-ol	om	1178	1177	Tr	-	Tr
14	Pregeijerene B	om	1275	1276	-	-	Tr
15	Bornyl acetate	om	1288	1287	8.14 ± 0.02	8.35 ± 0.05	5.18 ± 0.12
16	α -Cubebene	sh	1351	1351	-	-	Tr
17	Isoledene	sh	1374	1374	-	-	Tr
18	α -Copaene	sh	1378	1376	Tr	Tr	0.37 ± 0.03
19	β -Bourbonene	sh	1387	1384	-	-	Tr
20	β -Cubebene	sh	1392	1388	-	-	Tr
21	α -Gurjunene	sh	1412	1408	1.01 ± 0.01	1.19 ± 0.03	1.08 ± 0.08
22	β-Caryophyllene	sh	1426	1417	16.75 ± 0.02	17.86 ± 0.07	15.65 ± 0.16
23	γ -Maaliene	sh	1432	1430	0.67 ± 0.01	Tr	0.65 ± 0.05
24	Calarene	sh	1436	1433	Tr	Tr	0.41 ± 0.07
25	α -Maaliene	sh	1438	1438	0.69 ± 0.01	Tr	0.65 ± 0.10

26	Aromadendrene	sh	1444	1441	5.39±0.01	5.30±0.05	4.90±0.08
27	Selina-5.11-diene	sh	1447	1445	Tr	-	0.54±0.10
28	α -Humulene	sh	1457	1452	0.92±0.01	0.95±0.05	0.94±0.07
29	9-epi-(E)-Caryophyllene	sh	1462	1464	-	-	0.35±0.04
30	allo-Aromadendrene	sh	1465	1467	2.02±0.01	1.98±0.18	1.63±0.02
31	γ -Muurolene	sh	1479	1474	Tr	Tr	0.63±0.03
32	β -Selinene	sh	1490	1489	Tr	-	0.33±0.05
33	Bicyclgermacrene	sh	1502	1499	3.65±0.01	4.15±0.08	5.02±0.12
34	γ -Cadinene	sh	1518	1511	1.28±0.01	1.22±0.04	1.45±0.04
35	δ -Cadinene	sh	1527	1519	1.98±0.01	2.11±0.02	1.84±0.14
36	Trans Cadi-1.4-diene	sh	1536	1527	-	-	Tr
37	α -Cadinene	sh	1541	1538	-	-	Tr
38	α -Calacorene	sh	1547	1542	-	-	Tr
39	Epiglobulol	os	1565	1554	Tr	-	0.36±0.05
40	Spathulenol	os	1586	1571	5.04±0.02	4.30±0.23	5.12±0.13
41	Caryophyllene oxide	os	1591	1582	3.26±0.01	3.02±0.02	2.94±0.09
42	Viridiflorol	os	1598	1592	Tr	Tr	0.57±0.04
43	Rosifoliol	os	1609	1603	0.65±0.01	Tr	0.82±0.05
44	γ-Eudesmol	os	1640	1630	6.27±0.02	5.93±0.15	7.43±0.04
45	T-Cadinol	os	1647	1645	2.68±0.02	2.47±0.18	3.23±0.15
46	β-Eudesmol	os	1663	1650	6.04±0.24	6.05±0.05	-
47	α-Eudesmol	os	1667	1652	11.41±0.27	9.86±0.24	21.47±0.20
48	Abietatriene	dh	2064	2054	-	-	0.25±0.02
49	Ferruginol	od	2338	2332	-	-	0.19±0.03
Class of compounds					Aerial parts	Leaves	Stems
Monoterpene hydrocarbons (mh)					12.08	13.73	3.93
Oxygenated monoterpenes (om)					16.63	18.43	8.63
Sesquiterpene hydrocarbons (sh)					34.34	34.76	36.44
Oxygenated sesquiterpenes (os)					35.36	31.63	41.94
diterpenes hydrocarbons (dh)					-	-	0.25
Oxygenated diterpenes (od)					-	-	0.19
Total Identified (%)					98.40	98.55	91.38

Tr: traces (< 0.1%).

^aCompounds listed in order of elution from HP-5MS capillary column.

^bRelative retention indices to C₈-C₂₈ n-alkanes on HP-5MS capillary column.

^cLiterature retention indices.

^dValues are mean \pm SD of three injections.

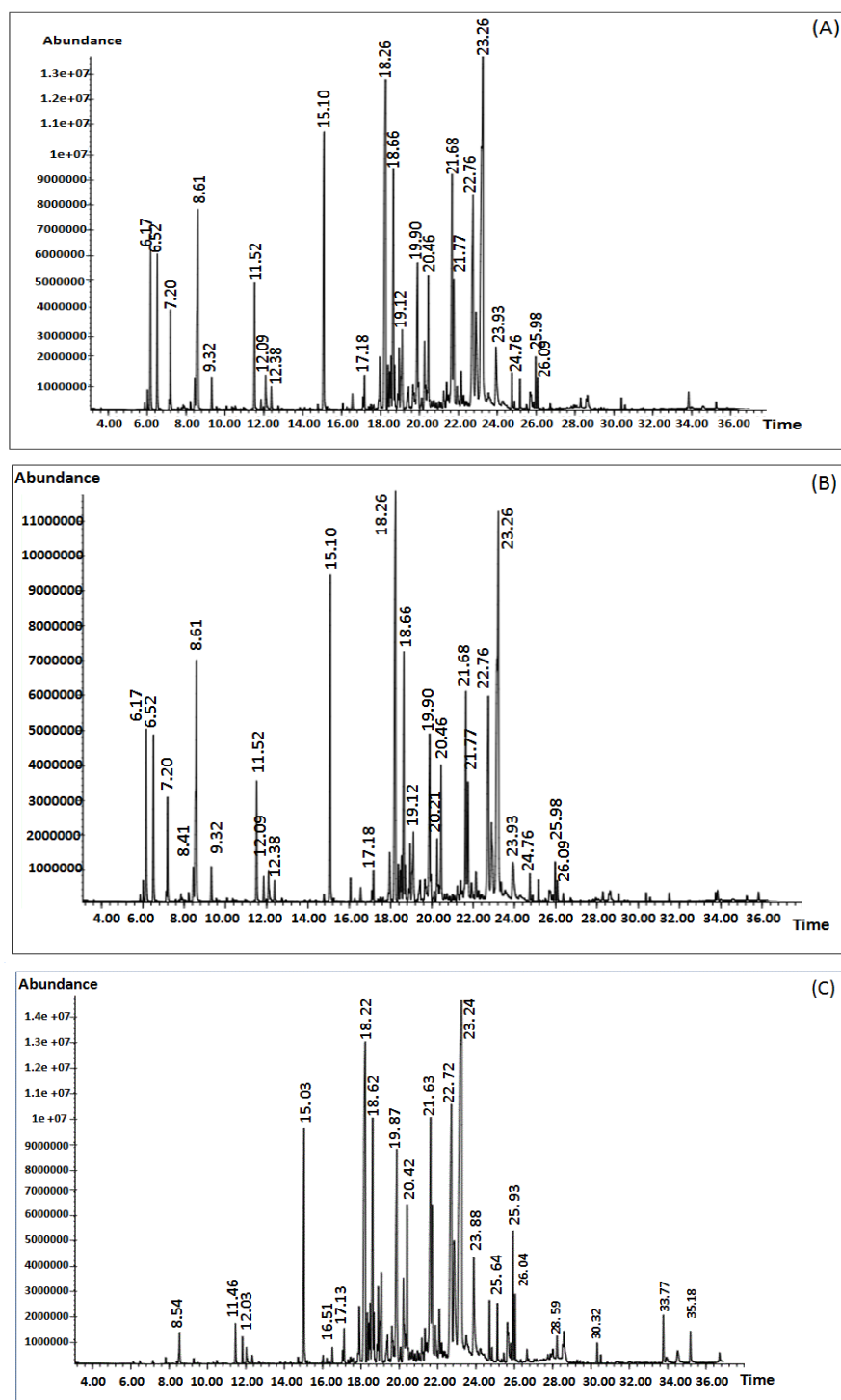


Fig. 1. GC chromatogram of *Salvia microphylla*; Aerial parts essential oil (A), Leaves essential oil (B), Stems essential oil (C).

Antioxidant activity

Antioxidant activity of essential oils extracted by hydrodistillation from aerial parts, leaves and stems of *Salvia microphylla* has been determined by four different test systems, namely, the DPPH scavenging, ABTS cation radical, cupric reducing antioxidant capacity and Reducing power. The results of antioxidant activity are expressed as terms of IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$) and are given in table 2. For the CUPRAC assay, the best IC_{50} was found for the stems essential oil (IC_{50} : $7.72 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$), the recorded activity was very closer to BHA (IC_{50} : $5.35 \pm 0.71 \mu\text{g/mL}$) and better than the one of α -tocopherol and BHT (IC_{50} : $19.92 \pm 1.46 \mu\text{g/mL}$ and $8.97 \pm 3.94 \mu\text{g/mL}$, respectively), it was followed by the aerial parts (IC_{50} : $472.02 \pm 5.18 \mu\text{g/mL}$) and leaves EOs (IC_{50} : $504.80 \pm 6.06 \mu\text{g/mL}$). The activities values obtained was different compared with the one of DPPH assay, ABTS assay and reducing power. According to the results acquired using the DPPH assay, ABTS assay, and reducing power methods, the essential oils of the three parts of *Salvia microphylla* did not exhibit any activity. Our results are in agreement with those of previous works, who reported that the leaves essential oil did not give any activity by DPPH assay [28]. The DPPH scavenging assay is not applicable for the evaluation of the antioxidant activities of essential oils, due to the low solubility of these oils in the DPPH medium [28,59]. The antioxidant activity of aerial parts and stems essential oils of *Salvia microphylla* has not been reported in the literature. The antioxidant activities of sesquiterpenes (major compounds in *Salvia microphylla*), such as Sesquiterpene hydrocarbons β -caryophyllene, aromadendrene, and α -Humulene, as well as the Oxygenated sesquiterpenes α -eudesmol, γ -eudesmol and Caryophyllene oxide were significantly lower than the one of some monocyclic monoterpenes (a minor compound in *Salvia microphylla*). Globally, the cyclic alcohols, including globulol, α -terpineol and terpin-4-ol have lower antioxidant activity than that of acyclic alcohols, such as α -bisabolol, nerol and geraniol [60]. Therefore, this important activity of Stems sample by CUPRAC assay compared to other samples was probably due to the specificity of cupric ion reducing and the positive interactions between both major and minor constituents [13].

Anticholinesterase activity

Previous studies on *Salvia* species showed that essentials oils are used traditionally for various nervous system disorders and have potential therapeutic effects on mood and cognitive functions through cholinesterase inhibition which could be attributed to terpenes [61-63]. The anticholinesterase activity of essential oils from different parts (aerial parts, leaves and stems) of *Salvia microphylla* was tested using a combination of two complementary methods systems acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The results for AChE and BChE inhibition expressed in terms of percentage of inhibition and IC_{50} are shown in table 3 and 4, respectively.

In the AChE inhibition assay, the essential oil of aerial parts of *Salvia microphylla* exhibited the highest inhibitory activity (IC_{50} : $23.65 \pm 0.73 \mu\text{g/mL}$), closer activity to that of standard galantamine (IC_{50} : $6.27 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$), followed by leaves essential oil (IC_{50} : $125.56 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$) and stems essential oil (IC_{50} : $159.28 \pm 2.13 \mu\text{g/mL}$). These results are in good agreement with the results obtained from the essential oil of *Salvia pseudeuphratica*, with (IC_{50} : $26.00 \pm 2.00 \mu\text{g/mL}$) in AChE [15]. Although, this is the first report on the anticholinesterase activity of *Salvia microphylla*. From literature reports, essential oils of other species from the genus *Salvia* also exhibited a notable inhibition of AChE [5,16,17,64-67]. Some studies have demonstrated that AChE enzyme inhibitory effect of essential oil derived from poor camphor containing *Salvia officinalis* was lower than essential oils rich in camphor content [15,65]. Consequently, aerial parts essential oil of *Salvia microphylla* could be ideal for AChE inhibition with a high level of camphor ($2.61 \pm 0.01 \%$) compared to essential oil extracted from stems ($1.10 \pm 0.05 \%$). These findings show that camphor may be responsible for inhibitory effect on the AChE enzyme.

A combination of camphor and 1,8-cineole may result with either synergy or antagonism [15,68]. Our study for leaves essential oil has shown that AChE inhibition is low compared to aerial parts essential oil. Although the essential oils of the aerial parts and leaves have almost the same amount of camphor ($2.61 \pm 0.01 \%$ and $2.58 \pm 0.18 \%$, respectively). The low level of AChE inhibition of leaves essential oil is probably due to antagonistic interactions of these essential oil components.

Table 2. Antioxidant activities of essential oils of *Salvia microphylla* aerial parts, leaves and stems by DPPH• ABTS⁺ CUPRAC and reducing power.

Samples	DPPH• assay		ABTS ⁺ assay		CUPRAC assay		Reducing power assay	
	IP (%)	IC ₅₀ µg/mL	IP (%)	IC ₅₀ µg/mL	IP (%)	A _{0.50} µg/mL	IP (%)	A _{0.50} µg/mL
Aerial parts	16.11±5.34	>800	12.83±1.32	>800	0.72±0.07	472.02±5.18	0.14±0.03	>200
Leaves	16.51±0.26	>800	10.01±0.11	>800	0.69±0.03	504.80±6.06	NA	>200
Stems	26.82±1.15	>800	21.21±1.31	>800	3.25±0.07	7.72 ±0.43	NA	>200
BHA	90.14±0.00	6.14±0.41	95.86±0.10	1.81±0.10	3.92±0.13	5.35±0.71	-	-
BHT	95.02±0.23	12.99±0.41	96.68±0.39	1.29±0.30	3.38±0.13	8.97±3.94	-	-
α-Tocopherol	89.52±0.33	13.02±5.17	-	-	1.85±0.19	19.92±1.46	1.81±0.09	34.93±2.38
Ascorbic acid	-	-	-	-	-	-	1.44±0.21	6.77±1.15
Tannic acid	-	-	-	-	-	-	1.02±0.13	5.39±0.91

IP: Inhibition percentage at a final concentration of 800 µg/mL for DPPH•, ABTS⁺, CUPRAC and 200 µg/mL for Reducing power in the well.

IC₅₀ and A_{0.50} values are defined as the concentration of 50 % inhibition percentages and the concentration at 0.50 absorbance, respectively. IC₅₀ and A_{0.50} were calculated by linear regression analysis and expressed as Mean ± S.D of three parallel measurements.

BHA: butylatedhydroxyanisole.

BHT: butylatedhydroxytoluene.

NA: not absorbance.

Table 3. Acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Salvia microphylla* aerial parts, leaves and stems.

Samples	Acetylcholinesterase inhibitory activity							
	3.125 µg/ml	6.25 µg/ml	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	IC ₅₀ µg/mL
Aerial parts	15.41±2.59	25.78±1.86	37.70±1.29	54.77±2.34	80.38±3.15	NT	NT	23.65±0.73
Leaves	NA	NA	NA	NA	20.93±2.53	36.51±2.10	72.72±2.24	125.56±0.32
Stems	NA	NA	NA	NA	26.77±3.98	47.25±3.29	56.81±1.02	159.28±2.13
Galantamine ^R	35.93±2.28	43.77±0.00	68.50±0.31	80.69±0.41	85.78±1.63 0	91.80±0.2	94.77±0.34	6.27±1.15

IC₅₀ values are defined as the concentration of 50% inhibition percentages and calculated by linear regression analysis and expressed as Mean ± S.D of three parallel measurements.

R: reference compounds. NT: not tested. NA: not absorbance.

Table 4. Butyrylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Salvia microphylla* aerial parts, leaves and stems.

Samples	Butyrylcholinesterase inhibitory activity							
	3.125 µg/ml	6.25 µg/ml	12.5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	IC ₅₀ µg/mL
Aerial parts	9.50±2.88	12.21±2.19	20.40±0.35	27.81±0.81	42.21±1.38	59.41±0.23	65.82±1.50	69.65±0.87
Leaves	8.37±3.95	13.04±3.92	27.93±8.31	35.59±0.25	50.57±0.63	58.85±1.19	66.87±3.61	48.54±0.67
Stems	11.99±5.96	16.81±3.06	23.50±2.31	41.45±1.49	60.23±1.63	70.87±0.75	78.41±0.68	37.07±1.44
Galantamine ^R	3.26± 0.62	6.93± 0.62	24.03±2.94	45.13± 2.60	63.87± 2.85	73.57± 0.77	78.95±0.58	34.75±1.99

The essential oils from stems (IC_{50} : $37.07 \pm 1.44 \mu\text{g/mL}$) showed the highest inhibitory activity against BChE, even similar to galantamine (IC_{50} : $34.75 \pm 1.99 \mu\text{g/mL}$) and followed by essential oils from leaves and aerial parts (IC_{50} : $48.54 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$ and $69.65 \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$, respectively). In comparison to previous studies, the BChE inhibition activity of *Salvia microphylla* was similar to/or higher than other *Salvia* species reported in the literature [5,10,15,66,67]. Some studies reported that 1,8-cineole has an inhibitory on BChE activity (IC_{50} : 0.93 mM). However, camphor did not show an inhibitory effect even at the highest tested concentration (10 mM) [15, 69]. According to literature review and the present result, it appears that 1,8-cineole could have a role in the inhibitory effect of aerial parts ($5.87 \pm 0.02 \%$) and leaves ($7.50 \pm 0.01 \%$) Eos of *Salvia microphylla*. While the 1,8-cineole content in the stems essential oil ($1.98 \pm 0.10 \%$) is lower compared to the other parts. The high level of BChE inhibition of stems essential oil is probably due to synergistic chemical interactions of these essential oil components [15,68]. These results may justify the traditional use of *Salvia* essential oils for failing memory.

α -Glucosidase inhibitory activity

Diabetes, one of the most common diseases in the world. α -glucosidase is a key enzyme responsible for the catabolism of carbohydrates, the inhibition of their activity has a vital role in decreasing the blood glucose level and represents one of the therapeutic approaches to fighting type 2 diabetes. In this work, we investigated the inhibitory effect of *Salvia microphylla* essential oils on α -glucosidase. The α -glucosidase inhibitor effects of essential oils from different parts of *Salvia microphylla* are presented in table 5. All essential oils (aerial parts, leaves and stems) exhibited a higher inhibitory activity on α -Glucosidase, the most active being the stems essential oil (IC_{50} : $19.36 \pm 2.35 \mu\text{g/mL}$), followed by aerial parts essential oil (IC_{50} : $41.34 \pm 1.79 \mu\text{g/mL}$) and leaves essential oil (IC_{50} : $50.25 \pm 1.75 \mu\text{g/mL}$). This biological activity was better than the one of acarbose (IC_{50} : $275.43 \pm 1.59 \mu\text{g/mL}$). This is the first report on the antidiabetic effect of *Salvia microphylla*, but the results obtained for the evaluation of this activity for other species of the genus *Salvia*, showed similar or lower effects to ours [23,24,70].

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal (MBC) or Fungicidal (MFC) Concentrations

A broth microdilution method in 96-well microplates was used to evaluate the antimicrobial activity of *Salvia microphylla* essential oils, against five Gram-negative, six Gram-positive bacteria and two yeast. The essential oils of different parts (aerial parts, leaves and stems) were investigated in concentrations between 0.10 $\mu\text{L/mL}$ and 26.66 $\mu\text{L/mL}$ and the minimum bactericidal concentrations (MBC) and minimum fungicidal concentrations (MFC) were determined for susceptible strains. The MIC, MCB and MCF values of essential oils and standards (positive control) are shown in table 6.

According to the results obtained, all essential oils from different parts (aerial parts, leaves and stems) of *Salvia microphylla* exhibited antibacterial activity against all microorganisms except for *Pseudomonas aeruginosa* who presented total resistance.

This resistance is due to the presence of a very restrictive outer membrane barrier surrounding the Gram-negative bacteria cells [71].

Listeria monocytogenes was sensitive to the essential oils of the aerial parts and leaves, providing a MIC value of 3.33 $\mu\text{L/mL}$, but it was resistant to the essential oil of the stems. These results are consistent with research showing that EOs rich in 1,8-cineole demonstrated activity against *Listeria monocytogenes* [72]. This compound was found in aerial parts and leaves of *Salvia microphylla* with high concentrations (4.49 and 7.50 %, respectively), compared with stems essential oil (1.98 % and MIC value of 26.66 $\mu\text{L/mL}$). The essential oil isolated from stems showed strong antibacterial activity against all other bacteria with MIC values between 0.20-3.33 $\mu\text{L/mL}$. Particularly, *Enterobacter cloacae* was the most sensitive to the stem essential oils with MIC of 0.20 $\mu\text{L/mL}$, followed by *Bacillus cereus*, *Salmonella abony* with MIC of 0.83 $\mu\text{L/mL}$ and *Agrobacterium tumefaciens*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* with MIC of 1.66 $\mu\text{L/mL}$. As well as, the lowest activity was recorded for *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis* with MIC of 3.33 $\mu\text{L/mL}$.

However, the essential oils isolated from aerial parts and leaves showed high antibacterial activity against *Bacillus subtilis* with MIC of 0.41 $\mu\text{L/mL}$ and 0.83 $\mu\text{L/mL}$, respectively. while the lowest MIC value was 13.33 $\mu\text{L/mL}$ for *Salmonella abony*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*.

Table 5. α -glucosidase inhibitory assay of essential oils of *Salvia microphylla* aerial parts, leaves and stems.

Samples	α -glucosidase inhibitory assay							
	1.953 μ g/ml	3.906 μ g/ml	7.812 μ g/ml	15.625 μ g/ml	31.25 μ g/ml	62.5 μ g/ml	125 μ g/ml	IC ₅₀ μ g/mL
Aerial parts	NA	NA	NA	16.63 \pm 3.83	28.21 \pm 3.07	83.49 \pm 2.24	97.54 \pm 1.01	41.34\pm1.79
Leaves	NA	NA	NA	4.10 \pm 1.22	28.18 \pm 3.10	64.88 \pm 2.08	87.85 \pm 0.35	50.25\pm1.75
Stems	NA	23.48 \pm 2.36	29.28 \pm 2.52	47.29 \pm 4.26	68.29 \pm 1.65	87.58 \pm 0.06	97.86 \pm 1.76	19.36\pm2.35
Acarbose ^R	78.125 μ g/ml	156.25 μ g/ml	312.5 μ g/ml	625 μ g/ml	1250 μ g/ml	2500 μ g/ml	5000 μ g/ml	
	27.43 \pm 2.18	38.91 \pm 3.20	54.86 \pm 1.79	67.29 \pm 2.63	80.19 \pm 1.66	85.54 \pm 0.45	91.05 \pm 0.72	275.43\pm1.59

IC₅₀ values are defined as the concentration of 50% inhibition percentages and calculated by linear regression analysis and expressed as Mean \pm S.D of three parallel measurements.

R: reference compounds.

NT: not tested.

NA: not absorbance.

In this study, the antibacterial activity of the essential oil isolated from stems against all tested microorganisms was greater than that of the other parts (aerial parts and leaves). It should be noted that some previous reports have described that the high activity might be attributed to the presence of α -Eudesmol, β -Caryophyllene, γ -Eudesmol, Bicyclogermacrene, and the diterpenes (Abietatriene, Ferruginol) which are present in small amounts only in the stems essential oil [73]. The aerial parts essential oil showed bactericidal effects (MBC/MIC<4), for *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Besides, the leaves essential oil bactericidal effects were marked to all Gram-positive bacteria except for *Listeria monocytogenes* and *Micrococcus luteus*. However, the stems essential oil showed bacteriostatic effects for *Bacillus subtilis* and *Salmonella abony* because the MBC/MIC was higher than 4 [22, 74]. The strongest antifungal activity was observed against *Candida albicans* using the essential oil from *Salvia microphylla* aerial parts and leaves, with MIC values of 3.33 μ L/ml. Subsequent studies have confirmed that bicyclic monoterpenes α -pinene and β -pinene showed considerable antifungal activity. These compounds were found in *Salvia microphylla* aerial parts and leaves at concentrations of 4.07-4.63 % and 2.29-2.63 %, respectively [73].

In general, the majority of compounds are often responsible for antibacterial activity. However, there are some studies where the whole combination of the major isolated components has a lower antibacterial activity than the essential oils. This can be explained by the presence of the synergistic effect between the various minority compounds of essential oils [71,75].

In comparison with a study carried out on the leaves essential oil of *Salvia microphylla* growing in Brazil, and collected in February 2007 [28], we observed that this essential oil exhibited an interesting antibacterial activity against *Listeria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Salmonella choleraesui*, except for *Escherichia coli* which was resistant. This significant difference is probably due to the time of harvest, the collection region and the environmental factors. The antimicrobial activity of aerial parts and stems essential oils from *Salvia microphylla* has not been reported elsewhere. According to our results, *Salvia microphylla* essential oil can be suggested in the treatment of human diseases and may be an interesting alternative to synthetic drugs.

Table 6. Antimicrobial activity of *Salvia microphylla* essential oils assayed using the broth microdilution method All tests were performed in duplicate and repeated twice.

Microorganisms	Aerial parts		Leaves		Stems		Standard	
	MIC	MCB/MFC	MIC	MCB/MFC	MIC	MCB/MFC	MIC *	MIC**
Gam-positive bacteria								
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.41	0.83	0.83	1.66	3.33	26 .66	11.25	NT
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14975	13.33	>26 .66	13.33	13.33	0.83	>26 .66	22.50	NT
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 14110	13.33	26.66	6.66	>26 .66	3.33	13.33	11.25	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	13.33	13.33	13.33	13.33	1.66	>26 .66	22.50	NT
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 49594	3.33	>26 .66	3.33	>26 .66	>26 .66	>26 .66	22.50	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	6.66	13.33	6.66	13.33	1.66	>26 .66	11.25	NT
Gam-negative bacteria								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3.33	6.66	3.33	>26 .66	3.33	>26 .66	22.50	NT
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 23308	3.33	>26 .66	1.66	>26 .66	1.66	>26 .66	11.25	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25843	NI	NI	NI	NI	NI	NI	45.00	NT

<i>Salmonella abony</i> ATCC 14028	13.33	>26 .66	13.33	>26 .66	0.83	26 .66	11.25	NT
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	13.33	>26 .66	13.33	>26 .66	0.20	>26 .66	11.25	NT
Yeast								
<i>Candida albicans</i> ATCC 1023	3.33	>26 .66	3.33	>26 .66	6.66	>26 .66	NT	2.81
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	13.33	>26 .66	13.33	>26 .66	13.33	>26 .66	NT	11,25

MIC: minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{L}/\text{ml}$).

MCB, MFC: Minimum Bactericidal Concentration and Minimum Fungicidal Concentration ($\mu\text{L}/\text{ml}$).

Positive control: *Amoxicillin ($\mu\text{g}/\text{mL}$); **Ketoconazole ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

NI: no inhibition has been symbolized.

NT: not tested.

Conclusion

The results of this study showed that the chemical composition and biological activities (antioxidant, anticholinesterase, α -glucosidase and antimicrobial activity) of essential oils of *Salvia microphylla*, varied significantly depending on the different parts of the plant extracted. Therefore, it may be concluded that essential oils of *Salvia microphylla* particular stems oil can be an important source of natural antioxidant compounds and may be used for neurodegenerative and antidiabetic chronic diseases. The antibacterial activity revealed that the inhibitory effect of the stems oil was very high as compared to the other parts against all the tested microorganisms, especially against *Enterobacter cloacae*. As well as the strongest antifungal activity was observed against *Candida albicans* by essential oils of aerial parts and leaves. Further studies are needed to evaluate this species for food, cosmetic and medical applications.

References

- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar M. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 446-475. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Hedge, I.C. *Advances in Labiatae science.* **1992**, 7-17.
- Kabouche, A.; Kabouche, Z. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2008**, 753-833. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80017-8](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80017-8)
- Medjahed, F.; Merouane, A.; Saadi, A.; Bader, A.; Cioni, P.L.; Flamini, G. *Chilean J. Agric. Res.* **2016**, 76, 195-200. DOI : <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392016000200009>
- Beladjila, K.A.; Berrehal, D.; Al-Aboudi, A.; Semra, Z.; Al-Jaber, H.; Bachari, K.; Kabouche, Z. *Chem. Nat. Compd.* **2018**, 54, 581-583. DOI : <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2414-z>
- Şenol, F.S.; Orhan, I.; Celep, F.; Kahraman, A.; Doğan, M.; Yılmaz, G.; Şener, B. *Food Chem.* **2010**, 120, 34-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.066>
- Kamatou, G.P.P.; Makunga, N.P.; Ramogola, W.P.N.; Viljoen, A.M. *J. Ethnopharmacol.* **2008a**, 119, 664-672. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.030>
- Kamatou, G.P.; Van Zyl, R.; Davids, H.; Van Heerden, F.; Lourens, A.; Viljoen, A.M. *S. Afr. J. Bot.* **2008b**, 74, 238-243. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2007.08.001>
- Kivrak, İ.; Duru, M.E.; Öztürk, M.; Mercan, N.; Harmandar, M.; Topçu, G. *Food chem.* **2009**, 116, 470-479. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.069>

10. Tel, G.; Öztürk, M.; Duru, M.E.; Harmandar, M.; Topçu, G. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3189-3193. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.020>
11. Al-Jaber, H.I.; Al-Qudah, M.A.; Barhoumi, L.M.; Abaza, I.F.; Afifi, F.U. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 1179-1187. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.543901>
12. Coisin, M.; Burzo, I.; Stefan, M.; Rosenhech, E.; Zamfirache, M.M. *An. Stiint. Univ. Al. I. Cuza Iasi, Sect. II a. Biol. veget.* **2012**, *58*, 51-58.
13. Marchev, A.; Ivanov, I.; Denev, P.; Nikolova, M.; Gochev, V.; Stoyanova, A.; Pavlov, A.; Georgiev, V. *Journal of BioScience & Biotechnology.* **2015**, *4*.
14. Russo, A.; Formisano, C.; Rigano, D.; Cardile, V.; Arnold, N.A.; Senatore, F. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *83*, 492-499. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.080>
15. Temel, H.E.; Demirci, B.; Demirci, F.; Celep, F.; Kahraman, A.; Doğan, M.; Hüsnü Can Başer, K. *J. Essent. Oil Res.* **2016**, *28*, 322-331. DOI :<https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1159257>
16. El Euch, S.K.; Hassine, D.; Cazaux, S.; Bouzouita, N.; Bouajila, J. *S. Afr. J. Bot.* **2019**, *120*, 253-260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.010>
17. Süzgeç-Selçuk, S.; Özek, T.; Özek, G.; Yur, S.; Göger, F.; Gürdal, M.B.; Toplan, G.G.; Meriçli, A.H.; Başer, K.H.C. *Rec. Nat. Prod.* **2021**, *15*, 10-24. DOI: <http://doi.org/10.25135/rnp.185.20.03.1579>
18. Crespo, M.E.; Jimenez, J.; Navarro, C.; Zarzuelo, A. *Planta Med.* **1986**, *52*, 367-369. DOI: [10.1055/s-2007-969187](https://doi.org/10.1055/s-2007-969187)
19. Perry, N.S.L.; Houghton, P.J.; Sampson, J.; Theobald, A.E.; Hart, S.; Lis-Balchin, M.; Hoult, J.R.S.; Evans, P.; Jenner, P.; Milligan, S.; Perry, E.K. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 1347-1356. DOI: <https://doi.org/10.1211/0022357011777846>
20. Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Denkova, Z.; Slavchev, A.; Stoyanova, A.; Schmidt, E. *Nutrition-Vienna.* **2006**, *30*, 152.
21. Nikolić, M.; Jovanović, K.K.; Marković, T.; Marković, D.; Gligorijević, N.; Radulović, S.; Soković, M. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *61*, 225-232. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.011>
22. Adrar, N.; Oukil, N.; Bedjou, F. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *88*, 112-119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.007>
23. Bahadori, M.B.; Dinparast, L.; Zengin, G.; Sarikurkcü, C.; Bahadori, S.; Asghari, B.; Movahhedini, N. *Int. J. Food Prop.* **2017a**, *20*, 1761-1772. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1218893>
24. Bahadori, M.B.; Salehi, P.; Sonboli, A. *Int. J. Food Prop.* **2017b**, *20*, 2974-2981. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1263862>
25. Valdés, B.; Martín, M.; Díaz, Z. *Bot. Macaron.* **1995**, *21*, 107-120.
26. Jenks, A.A.; Kim, S.-C. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *146*, 214-224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.035>
27. Béjar, E.; Bussmann, R.; Roa, C.; Sharon, D. *Latin Herbal Press, San Diego.* **2001**.
28. Lima, R.K.; dasGraças Cardoso, M.; Andrade, M.A.; Guimarães, P.L.; Batista, L.R.; Nelson, D.L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 523-528. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1938-1>
29. Romo-Asunción, D.; Ávila-Calderón, M.A.; Ramos-López, M.A.; Barranco-Florido, J.E.; Rodríguez-Navarro, S.; Romero-Gomez, S.; Aldeco-Pérez, E.J.; Pacheco-Aguilar, J.R.; Rico-Rodríguez, M.A. *Fla. Entomol.* **2016**, 345-351. DOI: <https://www.jstor.org/stable/24891070>
30. Aydoğmuş, Z.; Yeşilyurt, V.; Topcu, G. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 775-781. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786410500462843>
31. Esquivel, B.; Cardenas, J.; Rodriguez-Hahn, L.; Ramamoorthy, T. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 738-740. DOI: <https://doi.org/10.1021/np50052a029>
32. Esquivel, B.; del Socorro Martínez, N.; Cárdenas, J.; Ramamoorthy, T.; Rodríguez-Hahn, L. *Planta Med.* **1989**, *55*, 62-63. DOI: [10.1055/s-2006-961827](https://doi.org/10.1055/s-2006-961827)

33. Bautista, E.; Toscano, R.A.; Ortega, A. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3210-3213. DOI: <https://doi.org/10.1021/ol401022c>
34. Bautista, E.; Toscano, R.n.A.; Ortega, A. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1088-1092. DOI: <https://doi.org/10.1021/np4009893>
35. Chialva, F.; Monguzzi, F.; Manitto, P. *J. Essent. Oil Res.* **1992**, *4*, 447-455. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.1992.9698108>
36. Koutsaviti, A.; Antonopoulou, V.; Vlassi, A.; Antonatos, S.; Michaelakis, A.; Papachristos, D.P.; Tzakou, O. *Journal of pest science.* **2018**, *91*, 873-886. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0934-0>
37. Marchioni, I.; Najar, B.; Ruffoni, B.; Copetta, A.; Pistelli, L.; Pistelli, L. *Plants.* **2020**, *9*, 691. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9060691>
38. *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, Wayne, PA. *New York.* M2-A6. **1997**.
39. *Clinical and laboratory standards institute.* Quality Control Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Limits for Broth Microdilution and MIC Interpretive Breakpoints. Supplement M27-S2. **2006**.
40. Joulain, D.; König, W. *Verlag: EB-Verlag, Hamburg, Germany.* **1998**.
41. Adams, R.P. *Quadruple mass spectroscopy.* Allured Publishing Corporation, Carol. Stream, IL, USA, **2001**, 456.
42. Van Den Dool, H.; Kratz, P. D. A. *J. Chromatogr. A.* **1963**, *11*, 463-471.
43. Goldschmidt, S.; Renn, K. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. A. B.* **1922**, *55*, 628-643. DOI: <https://doi.org/10.1002/cber.19220550308>
44. Osman, A.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *412*, 473-478. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.123>
45. Passari, A. K.; Leo, V. V.; Singh, G.; Samanta, L.; Ram, H.; Siddaiah, C. N.; Hashem, A.; Al-Arjani, A.-B. F.; Alqarawi, A. A.; Fathi Abd_Allah, E. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7364. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21197364>
46. Ražná, K.; Sawinska, Z.; Ivanišová, E.; Vukovic, N.; Terentjeva, M.; Stričík, M.; Kowalczewski, P. Ł.; Hlavačková, L.; Rovná, K.; Žiarovská, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3087. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21093087>
47. Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N.K. *Food Chem.* **2012**, *130*, 1036-1043. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
48. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radicals Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
49. Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; Karademir, S.E. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7970-7981. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
50. Oyaizu, M. *Jpn. J. Nutr. Diet.* **1986**, *44*, 307-315. DOI: <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
51. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres Jr, V.; Featherstone, R.M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
52. Lordan, S.; Smyth, T.J.; Soler-Vila, A.; Stanton, C.; Ross, R.P. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2170-2176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.123>
53. Amrani, A.; Mecheri, A.; Bensouici, C.; Boubekri, N.; Benaissa, O.; Zama, D.; Benayache, F.; Benayache, S. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *20*, 101209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101209>
54. *Approved Standard-National Committee for Clinical Laboratory Standards* Wayne, PA. **2008**, 28, M27-A3.

55. *Approved Standard-Tenth Edition; Document M07-A10; Clinical and Laboratory Standards Institute*: Wayne, PA. **2015**.
56. Cutillas, A.B.; Carrasco, A.; Martínez-Gutierrez, R.; Tomas, V.; Tudela, J. *Mol.* **2017**, *22*, 1382. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22081382>
57. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
58. Martínez-Francés, V.; Hahn, E.; Ríos, S.; Rivera, D.; Reich, E.; Vila, R.; Cañigüeral, S. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 467. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00467>
59. Mata, A.; Proença, C.; Ferreira, A.; Serralheiro, M.; Nogueira, J.; Araújo, M. *Food Chem.* **2007**, *103*, 778-786. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.017>
60. Ruberto, G.; Baratta, M.T. *Food Chem.* **2000**, *69*, 167-174. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00247-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00247-2)
61. Loizzo, M.R.; Tundis, R.; Conforti, F.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Nadjafi, F.; Frega, N.G.; Menichini, F. *Nutr. Res.* **2010**, *30*, 823-830. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.09.016>
62. Fu, Z.; Wang, H.; Hu, X.; Sun, Z.; Han, C. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, *3*, 122-127. DOI: [10.7324/JAPS.2013.3723](https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3723)
63. Vladimir-Knezevic, S.; Blazekovic, B.; Kindl, M.; Vladic, J.; Lower-Nedza, A.D.; Brantner, A.H. *Mol.* **2014**, *19*, 767-782. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules19010767>
64. Perry, N.S.; Houghton, P.J.; Jenner, P.; Keith, A.; Perry, E.K. *Phytomedicine.* **2002**, *9*, 48-51. DOI: <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00082>
65. Savelev, S.U.; Okello, E.J.; Perry, E.K. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 315-324. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1451>
66. Duru, M.E.; Tel, G.; Öztürk, M.; Harmandar, M. *Rec. Nat. Prod.* **2012**, *6*, 175-179.
67. Salinas, M.; Bec, N.; Calva, J.; Ramírez, J.; Andrade, J.M.; Larroque, C.; Vidari, G.; Armijos, C. *Rec. Nat. Prod.* **2020**, *14*, 276-285. DOI: [http://doi.org/10.25135/rnp.164.19.07.1342](https://doi.org/10.25135/rnp.164.19.07.1342)
68. Savelev, S.; Okello, E.; Perry, N.S.; Wilkins, R.M.; Perry, E.K. *Pharmacol., Biochem. Behav.* **2003**, *75*, 661-668. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(03\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(03)00125-4)
69. Loizzo, M.R.; Menichini, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Conforti, F.; Nadjafi, F.; Statti, G.A.; Frega, N.G.; Menichini, F. *J. Oleo Sci.* **2009**, *58*, 443-446. DOI: <https://doi.org/10.5650/jos.58.443>
70. Bahadori, M.B.; Valizadeh, H.; Asghari, B.; Dinparast, L.; MoridiFarimani, M.; Bahadori, S. *J. Funct. Foods.* **2015**, *18*, 727-736. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.011>
71. Burt, S. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223-253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
72. Mourey, A.; Canillac, N. *Food Control.* **2002**, *13*, 289-292. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00026-9](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00026-9)
73. Koroch, A. R.; Juliani, H. R.; Zygadlo, J. A. *Flavours Fragrances.* **2007**, 87-115. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_5
74. Traoré, Y.; Ouattara, K.; Yéo, D.; Doumbia, I.; Coulibaly, A. *J. Appl. Biosci.* **2012**, *58*, 4234-4242.
75. Mastelic, J.; Politeo, O.; Jerkovic, I.; Radosevic, N. *Chem. Nat. Compd.* **2005**, *41*, 35-40. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10600-005-0069-z>