

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
SIDI BEL ABBES

THESE
DE DOCTORAT DE TROISIEME CYCLE

Présentée par :

M^{elle} TEHAMI Wafâa

Spécialité :

Sciences biologiques

Option :

Immunochimie alimentaire et santé

Intitulé

**Caractérisation phytochimique et évaluation
du potentiel antioxydant, antimicrobien et
anti-inflammatoire de *Salvia argentea***

Soutenue en : 2017

Devant le jury composé de :

Président :

Pr ABBOUNI Bouziane

Université de Sidi Bel-Abbès

Examineurs :

Pr RIAZI Ali

Université de Mostaganem

Dr BENABDERRAHMANE Mokhtar

Université de Sidi Bel Abbès

Dr MEZIANI Samira

Université de Sidi Bel Abbès

Rapporteur :

Pr BENALI Mohammed

Université de Sidi Bel Abbès

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents que j'adore, pour leurs soutiens, leurs amours et leurs encouragements tout au long de mon cursus. « je ne trouverai jamais les mots pour vous remercier du dévouement accomplie pour mon instruction, mon bien être et les valeurs que vous m'avez inculqué : c'est à vous que je dois mon assurance et ma témérité».

A ma sœur Asmâa et son mari Lamine..

A mes frères : Mohamed et Kacem.

A tous mes proches et mes ami(e)s.

A tous ceux qui m'aiment et qui me sont chers.

TEHAMI Wafâa

Remerciements

Avant tout je remercie Dieu le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail.

*Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur **BENALI Mohammed** qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de mon travail, pour avoir orienté ma thèse avec ses conseils utiles, pertinents et constructifs et pour la grande autonomie qu'il m'a accordé.*

*Je remercie également Monsieur **ABBOUNI Bouziane** Professeur à l'Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès pour avoir accepté de présider le jury.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur **RIAZI Ali**, Professeur à l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, qui m'a fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteur.*

*J'exprime mes remerciements à Madame **MEZIANI Samira**, Maître de conférence à l'Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès qui a bien voulu examiner ce travail.*

*Je remercie également Monsieur **BENABDERRAHMANE Mokhtar**, Maître de conférence à l'Université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès, qui a bien voulu faire partie du jury.*

*J'exprime ma vive reconnaissance à Monsieur **LATRECHE Ali**, Professeur au département de l'environnement, pour m'avoir apporté un appui constant au cours de ce travail. Je le remercie pour ses qualités humaines.*

Je tiens à remercier, enfin, les personnes de différents laboratoires, qui m'ont aidé au cours des expérimentations.

Résumés

Résumé

Le présent travail contribue à la valorisation des feuilles et des racines de la sauge argentée (*Salvia argentea*) de la région de Sidi Bel Abbès et ce par un screening phytochimique, la détermination des métabolites primaires et secondaires, l'évaluation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire.

Les analyses physico-chimiques effectuées ont révélé des teneurs appréciables en métabolites primaires. Cette plante renferme respectivement pour les feuilles et les racines, une humidité de $9,50 \pm 0,01\%$ et $8,63 \pm 0,16\%$, un taux de cendres de $14,68 \pm 0,10\%$ et $9,03 \pm 0,04\%$ et un taux de matière de $2,92 \pm 0,11\%$ et $3,94 \pm 0,05\%$. Les parties aériennes ainsi que souterraines de *S. argentea*, possèdent respectivement des teneurs de $10,73 \pm 0,18\%$ et $5,23 \pm 0,32\%$ en protéines. En revanche une pauvreté en sucres au niveau des racines a été constatée ($0,15 \pm 0,12\%$) par rapport aux feuilles ($4,13 \pm 0,04\%$).

Le screening préliminaire des métabolites secondaires des deux parties étudiées a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques. Ces derniers ont été quantifiés et les analyses ont concerné les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins condensés. Les teneurs moyennes en polyphénols des feuilles et des racines dans les extraits méthanolique et aqueux sont respectivement de $87,13 \pm 0,32 - 55,64 \pm 0,35$ mg équivalent acide gallique (EAG)/g et $71,80 \pm 0,79 - 48,20 \pm 0,79$ mg EAG/g. Pour les flavonoïdes les teneurs sont aussi respectivement de $59,97 \pm 0,21 - 31,22 \pm 0,49$ mg équivalent catéchine (EC)/g et $44,16 \pm 0,60 - 18,12 \pm 0,54$ mg EC/g et pour les tanins de $3,70 \pm 0,09 - 5,58 \pm 0,13$ mg EC/g et $4,01 \pm 0,16 - 5,83 \pm 0,09$ mg EC/g.

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de réduction du fer FRAP et la méthode de piégeage de radicaux libres DPPH. Les extraits testés présentent des activités antioxydantes appréciables et fonction du contenu en principes actifs. Les IC_{50} varient de $45,42 \pm 0,46$ à $416,12 \pm 0,26$ $\mu\text{g/ml}$.

Par ailleurs l'activité antimicrobienne des extraits méthanolique et aqueux vis-à-vis de sept souches bactériennes et une levure s'est révélée modérée en fonction de l'organe considéré, du type d'extraction, de la concentration et de la souche utilisée. Dans notre cas tous les extraits se sont révélés inactifs vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosae*.

L'effet anti-inflammatoire, a montré des atténuations des œdèmes induit par la carragénine (1%) chez les rats Wistar traités avec les extraits méthanoliques de feuilles et de racines de *S. argentea*.

Cet effet est comparé à celui du Diclofenac avec des analyses de paramètres de l'inflammation aigue dont les leucocytes, les plaquettes, la CRP et l'albumine. Ces derniers confirment l'état inflammatoire engendré par la carragénine et son atténuation par l'administration des extraits de la plante. En définitive, *S. argentea* peut constituer une source potentielle en antioxydants utilisés à des fins thérapeutiques.

Mots clés : Feuilles, Racines, *Salvia argentea*, Métabolites primaires, Métabolites secondaires, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, Activité anti-inflammatoire.

Abstract

The present work contributes to the biological evaluation of the leaves and roots of the silver sage (*Salvia argentea*) of the region of Sidi Bel Abbès, realizing; Phytochemical screening, determination of primary and secondary metabolites, and assessment of antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity.

Physico-chemical analyzes revealed significant levels of primary metabolites. This plant contains for the leaves and roots, respectively, a moisture content of $9,50 \pm 0,01\%$ and $8,63 \pm 0,16\%$, an ash content of $14,68 \pm 0,10\%$ and $9,03 \pm 0,04\%$ and a material ratio of $2,92 \pm 0,11\%$ and $3,94 \pm 0,05\%$. The aerial and subterranean parts of *S. argentea*, respectively, have contents of $10,73 \pm 0,18\%$ and $5,23 \pm 0,32\%$ of proteins. On the other hand, poverty in sugars in the roots was observed ($0,15 \pm 0,12\%$) compared to leaves ($4,13 \pm 0,04\%$).

Preliminary sampling of the secondary metabolites of the two student groups revealed the presence of some chemical groups. The latter were quantified and analyzed on polyphenols, flavonoids and condensed tannins. The mean polyphenol content of leaves and roots in methanolic and aqueous extracts was $87,13 \pm 0,32 - 55,64 \pm 0,35$ mg gallic acid equivalent (EAG) / g and $71,80 \pm 0,79 - 48,20 \pm 0,79$ mg EAG/g. For flavonoids, the contents were also $59,97 \pm 0,21 - 31,22 \pm 0,49$ mg equivalent catechin (EC)/g and $44,16 \pm 0,60 - 18,12 \pm 0,54$ mg EC/g and for tannins of $3,70 \pm 0,09 - 5,58 \pm 0,13$ mg EC/g and $4,01 \pm 0,16 - 5,83 \pm 0,09$ mg EC / g.

The antioxidant activity was evaluated by the method of reduction of the FRAP and the method of correction of free radicals DPPH. The extracts tested exhibit appreciable antioxidant activities and depend on the content of active ingredients. The IC50s range from $45,42 \pm 0,46$ to $416,12 \pm 0,26$ µg/ml.

Moreover, the antimicrobial activity of the methanolic and aqueous extracts with respect to seven bacterial strains and a yeast revealed a moderate activity according to the organ considered, the type of extraction, the concentration and the strain used. In our case, all extracts were found to be inactive against the strain *Pseudomonas aeruginosa*.

The anti-inflammatory effect showed attenuations of carrageenan-induced edema (1%) in Wistar rats treated with methanolic extracts of leaves and roots of *S. argentea*. This effect is compared with that of Diclofenac with analyzes of parameters of acute inflammation including leukocytes, platelets, CRP and albumin. The latter confirm the inflammatory state generated by the carrageenan and its attenuation by the administration of the extracts of the plant. Ultimately, *S. argentea* may be a potential source of antioxidants used for therapeutic purposes.

Key words: Leaves, Roots, *Salvia argentea*, Primary metabolites, Secondary metabolites, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Anti-inflammatory activity.

الملخص

الدراسة الحالية تتمثل في التثمين البيولوجي لأوراق وجذور نبتة الصوجا الفضية في منطقة سيدي بلعباس وذلك بالقيام بالفحوص كاشفه للمركبات الكيميائية مع تحديد النواتج الاولية والثانوية للايض وكذا تقييم النشاط المضاد للاكسده، المضاد للجراثيم والمضاد للالتهاب.

التحليلات الفيزيوكيميائية كشفت عن وجود مستويات عالية من المركبات الاولية للايض، بحيث تحتوي أوراق و جذور هذه النبتة على التوالي بالنسبة للرطوبة $9.50 \pm 0.01\%$ و $9.03 \pm 0.04\%$ ، نسبة الرماد قدرت ب $14.68 \pm 0.10\%$ و $8.63 \pm 0.16\%$ ، اما الأجزاء الهوائية و الارضية لهذه النبتة، *S. argentea* تملكان على التوالي نسبة معتبرة من البروتينات قدرت ب $10.73 \pm 0.18\%$ و $5.23 \pm 0.32\%$ ونسبة ضئيلة من السكريات قدرت ب $12.0 \pm 0.15\%$ بالنسبة للجذور و $4.13 \pm 0.04\%$ بالنسبة للأوراق . الفحوص الكاشفة لمكونات الايض الثانوية لجزئي النبتة المدروسة، مكن من تحديد نوع بعض المركبات الكيميائية ، والتي حددت كميتها ، وهي البوليفينولات ، الفلافونويدات و التانات الكثيفة . النسبة المتوسطة للبوليفينولات في الأوراق والجذور في المستخلص الميثانولي و المائي كانت على التوالي 87.13 ± 0.32 \ 55.64 ± 0.35 مغ مكافئ حمض غاليك بالنسبة لواحد غرام و 71.80 ± 0.79 / 0.79 ± 48.20 بالنسبة للفلافونويدات النسب ايضا كانت على التوالي 0.21 ± 59.97 / 0.49 ± 31.22 مغ مكافئ كاتشين و 0.60 ± 44.16 / 18.12 مغ مكافئ كاتشين بالنسبة لواحد غرام. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقة إرجاع الحديد FRAP و طريقة حصر الجذور الحرة DPPH، المستخلصات المدروسة اظهرت نشاط عالي وذلك لاحتوائها على المركبات الفعالة ، باعتبار ان ال IC_{50} تتراوح بين 0.46 ± 45.42 الى 0.26 ± 416.12 ميكروغرام /مل.

كما ان النشاط المضاد للميكروبات للمستخلص الميثانولي و المائي، اظهر قدرة تثبيط متوسطة ضد سبع انواع من البكتيريا و نوع من الخمائر، وذلك حيب الجزء المستعمل من النبتة ، وطريقة الاستخلاص و كذا تركيز المستخلص، في دراستنا الحالية استنتجنا ان كل مستخلصاتنا مهما كان نوع الجزء المستعمل لم تظهر اي قدرة تثبيط ضد *Pseudomona aeruginosa* النشاط المضاد للالتهاب اظهر اضمحلال انتفاخ رجل الجرذ الناتج عن حقن الكاراجين بتركيز واحد بالمئة، لدى الجرذان ويستار المعالجة بالمستخلصات الميثانولية والمائية لهذه النبتة ، والتي تمت مقارنتها بالعلاج المرجعي للدكلوفيناك، اكدت هذه النتائج بتحليل دموية لمعايير التفاعل الالتهابي كالكريات البيضاء، الصفائح الدموية و كذا الالبومين و CRP. في الاخير تعتبر نبتة *S. argentea* مصدر بيولوجي هام لاحتوائها على مضادات اكسدة طبيعية ذات استعمالات علاجية .

الكلمات المفتاحية : الأوراق، الجذور، مركبات الايض الاولي، مركبات الايض الثانوي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد للالتهاب

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

ATCC : American Type Culture Collection.

CAT : Catalase.

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane.

COX-2 : Cyclooxygénase.

CRP : C-Réactive-Protéine.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DO : Densité Optique.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

EAF : Extrait Aqueux Feuille.

EAG: Equivalent Acide Gallique.

EAR : Extrait Aqueux Racine.

EC : Equivalent Catéchine.

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique.

EMF : Extrait Méthanolique Feuille.

EMR : Extrait Méthanolique Racine.

ERO / ROS: Espèces Réactives de l'Oxygénées.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants).

FeCl₃ : Chlorure de fer.

GPx : Glutathion peroxydase.

HCl : Acide chlorhydrique.

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50 % du radical DPPH.

IL-1 : Interleukine-1.

IL-6 : Interleukine-6.

kDa : kilo dalton.

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

MeOH : Méthanol.

MH : Mueller Hinton.

NaCl : Chlorure de sodium.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NaNO₂ : Nitrite de sodium.

NFS : Numération Formule Sanguine.

nm : Nanomètre.

NO• : Monoxyde d'azote.

O₂^{•-} : Anion superoxyde.

OH• : Radical hydroxyle.

ONAB : Office Nationale de l'Alimentation de Bétails.

PGs : Prostaglandines.

PNN : neutrophiles polymorphonucléaires.

p / v : Rapport poids / Volume.

RO₂[•] : Peroxydes lipidiques.

ROO• : Radical peroxyde.

ROOH : Hydroperoxyde.

SAB : sérumalbumine bovine.

SOD : superoxyde dismutase.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor.

UV : Ultra Violet.

UFC :Unité Formant Colonie.

v/v : Rapport volume / volume.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques	23
Tableau 02 : Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens	26
Tableau 03 : Principaux glucocorticoïdes	27
Tableau 04 : Caractéristiques des souches microbiennes testées	37
Tableau 05 : Screening phytochimique des différents extraits des feuilles et racines de <i>S. argentea</i>	51
Tableau 06 : Teneurs en métabolites secondaires	53
Tableau 07 : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de <i>Salvia argentea</i>	58
Tableau 09 : Catégorisation des extraits de feuilles de <i>S. argentea</i> selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités	61
Tableau 10 : Catégorisation des extraits de racines de <i>S. argentea</i> selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités	62

Liste des figures

Figure 01 : <i>Salvia argentea</i> (A) et fleurs de <i>S. argentea</i> (B)	6
Figure 02 : Répartition de <i>Salvia argentea</i> dans le monde	6
Figure 03 : <i>Salvia argentea</i>	7
Figure 04 : Les grandes voies de synthèse des métabolites secondaires et relations avec le métabolisme primaire	11
Figure 05 : Classification des composés polyphénoliques	12
Figure 06 : Structure de base des acides benzoïque et cinnamique	12
Figure 07 : Structure générale des flavonoïdes	13
Figure 08 : Les principales classes de flavonoïdes	14
Figure 09 : Structures de quelques acides phénols	15
Figure 10 : Squelette moléculaire d'un flavan-3-ol	16
Figure 11 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	17
Figure 12 : Schéma du mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification enzymatique	20
Figure 13 : La réaction inflammatoire schématisée	24
Figure 14 : Les phases de l'inflammation aiguë	25
Figure 15 : Carte de situation de la zone d'étude	29
Figure 16 : Séchage des feuilles et racines de <i>Salvia argentea</i>	30
Figure 17 : Principe de piégeage du radical DPPH	35
Figure 18 : Les rats Wistar en cage	39
Figure 19 : Conditions de l'injection intraveineuse	40
Figure 20 : Injection de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte du rat	40
Figure 21 : Mesure de l'œdème	41
Figure 22 : Prélèvement sanguin à partir de l'aorte abdominal du rat	42
Figure 23 : Protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire	44

Figure 24 : Pourcentage de connaissance de la sauge argentée par la population enquêtée	46
Figure 25 : Taux d'utilisation par la population des parties de la plante	47
Figure 26 : Répartition des maladies traitées par la sauge argentée (<i>S. argentea</i>)	47
Figure 27 : Mode de préparation de la sauge argentée	48
Figure 28 : Teneurs en métabolites primaires des feuilles et des racines de <i>S. argentea</i>	49
Figure 29 : Rendements des extraits de <i>S. argentea</i>	49
Figure 30 : Pouvoir anti radicalaire des extraits de <i>S. argentea</i>	54
Figure 31 : Concentration d'inhibition médiane des extraits de feuilles et de racines de <i>S. argentea</i>	55
Figure 32 : Activité anti radicalaire des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles et des racines de <i>S. argentea</i>	57
Figure 33 : Activité antimicrobienne de <i>Salvia argentea</i>	59
Figure 34 : A Catégorisation des extraits de feuilles de <i>S. argentea</i> selon leurs effets antibactérien et antifongique et B sensibilités des souches microbiennes vis-à-vis de ces extraits	63
Figure 35 : A Catégorisation des extraits de racines de <i>S. argentea</i> selon leurs effets antibactérien et antifongique et B sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis de ces extraits	64
Figure 36 : Effet des EMF et EMR sur l'œdème induit par la carragénine chez les rats Wistar	65
Figure 37 : Taux d'inhibition des œdèmes	66
Figure 38 : Taux de globules blancs chez les rats Wistar	68
Figure 39 : Taux de plaquettes chez les rats Wistar	69
Figure 40 : Taux de la CRP chez les rats Wistar	70
Figure 41 : Taux d'albumine chez les rats Wistar	71

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Etude bibliographique.	
I. Les plantes médicinales	3
I.1. La famille des Lamiaceae	4
I.1.1. Le genre <i>Salvia</i>	4
I.2. Noms vernaculaires de <i>Salvia argentea</i>	5
I.3. Taxonomie	5
I.4. Répartition géographique et description morphologique de <i>Salvia argentea</i>	6
I.5. Les propriétés thérapeutiques des sauges	8
I.6. Constitutions chimiques des espèces de <i>Salvia</i>	8
I.7. Les principes actifs	9
II. Les métabolites secondaires	10
II.1. Classification de métabolites secondaires	10
II.2. Les composés phénoliques	11
- Acides phénoliques	12
- Flavonoïdes	13
- Tanins	14
Tanins hydrolysables	15
Tanins condensés	15
III. Rôles et propriétés biologiques des polyphénols	16
III.1. Propriété antioxydante	16
III.1.1. Radicaux libres	16
III.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène	16
III.1.3. Stress oxydant	17
a. Les causes d'un stress oxydant	17
b. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif	18
III.1.4. Les antioxydants	18
III.1.4.1. Les antioxydants enzymatiques	19
- La superoxyde dismutase (DOS)	19
- La catalase (CAT)	19
- La glutathion peroxydase (GPx)	20

III.1.4.2. Les antioxydants non enzymatiques	20
a. Les vitamines	20
b. La vitamine E	20
c. L vitamine C	21
III.1.4.3. Antioxydants d'origine végétale	21
III.2. Propriété antimicrobienne	21
III.3. Propriété anti-inflammatoire	22
IV. L'inflammation	23
IV.1. Les anti-inflammatoires	26
a. Anti-inflammatoires non stéroïdiens	26
b. Anti-inflammatoires stéroïdiens	26
c. Anti-inflammatoires d'origine végétale	27

Chapitre II : Matériels & méthodes.

I. Enquête ethnobotanique	29
II. Matériel végétal	29
II.1. Analyses physico-chimiques	30
II.1.1. Teneur en eau	30
II.1.2. Teneur en cendre	30
II.1.3. Teneur en matière grasse	31
II.1.4. Teneur en sucres totaux	31
II.1.5. Dosage des protéines hydrosolubles	32
II.1.5.1. Mode d'extraction des protéines pour le dosage	32
II.1.5.2. Dosage de protéines	32
II.2. Préparation des extraits bruts	32
II.2.1. Extraction par macération	32
II.2.1. Extraction sous reflux	33
II.3. Screening des métabolites secondaires	33
II.3.1. Les alcaloïdes	33
II.3.2. Terpénoïdes	33
II.3.3. Les tanins	33
II.3.4. Les flavonoïdes	33

II.3.5. Les saponosides	33
II.3.6. Stérols et triterpènes	34
II.3.7. Les polyphénols	34
II.4. Dosage quantitatif des métabolites secondaires	34
II.4.1. Détermination de la teneur en phénols totaux dans les extraits	34
II.4.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes dans les extraits	34
II.5.3. Détermination des tanins condensés dans les extraits	34
II.5. Evaluation de l'activité antioxydante	35
II.5.1. Piégeage du radical 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	35
II.5.2. Le pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP)	35
III. Evaluation de l'activité antimicrobienne	36
III.1. Préparation des extraits	36
III.2. Préparation des suspensions bactériennes	37
III.3. Mise en test	38
VI. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> des extraits méthanolique <i>S. argentea</i>	38
VI.1. Animaux	38
VI.2. Œdème de la patte induit par la carragénine chez les rats Wistar	39
VI.3. Mesures des œdèmes	40
VI.4. Sacrifice et prélèvement du sang	41
VI.5. Analyse des marqueurs de l'inflammation	42
- C-Protéines Réactive (CRP)	42
- Albumine	42
- Numération Formule Sanguine (NFS)	42
Analyses statistiques	45

Chapitre III : Résultats et discussions.

III.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique	46
III.1.1. Connaissance de la sauge argentée	46
III.1.2. Parties utilisées	46
III.1.3. Maladies traitées par la plante	47
III.1.4. Mode d'utilisation	48

III.2. Détermination de métabolites primaires	48
III.3. Rendement	49
III.4. Screening phytochimique des extraits des feuilles et des racines de <i>Salvia argentea</i>	50
III.5. Détermination des métabolites secondaires	51
III.5.1. Teneurs en polyphénols totaux	51
III.5.2. Teneurs en flavonoïdes	52
III.5.3. Teneurs en tanins	53
III.6. Activités biologiques	54
III.6.1. Activité antioxydante	54
III.6.1.1. Test au DPPH	54
III.6.1.2. Pouvoir de réduction du fer (FRAP)	56
III.6.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>S. argentea</i>	57
- Catégorisation du potentiel antimicrobien des feuilles et des racines de <i>S. argentea</i>	61
III.6.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> de <i>S. argentea</i>	64
III.6.3.1. Mesure des œdèmes et les pourcentages d'inhibition	64
III.6.3.2. Variation des marqueurs de l'inflammation chez les rats Wistar	67
- Taux sérique en globules blancs	67
- Taux de plaquettes (thrombocytes)	69
- Concentration sérique en C-Réactive Protéine (CRP)	70
- Concentration sérique en albumine	71
Conclusion	73
Références bibliographiques	75

Introduction

Introduction

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux (Baba-Aissa, 2000).

La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne (Sévenet et Tortora, 1994).

Il existe une grande variété d'herbes qui sont utilisées à des fins culinaires dans le monde entier et qui sont également reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé et ont donc été utilisées en médecine traditionnelle. En plus de leur valeur nutritive, les herbes contiennent de nombreux composants phytochimiques avec des effets bioactifs, améliorant ainsi la santé humaine (Guiné et Gonçalves, 2016).

Beaucoup de plantes sont particulièrement riches en composés phénoliques, qui constituent une classe importante d'antioxydants (Yoo et al., 2010 ; Oancea et al., 2012). Les propriétés physiologiques attribuées aux composés phénoliques comprennent les effets antidiabétiques, antiallergiques, antifongiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, antimicrobiens, cardioprotecteurs et vasodilatateurs (Del Baño et al., 2003 ; Cao et al., 2015).

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé. À l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles représentent près de 60% des médicaments, dont nous disposons (O.M.S, 2000). Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nées de la synthèse chimique de molécules ou parties de molécules naturelles prises comme tête de séries (Fouché et al., 2000).

Ce projet de recherche vise à élargir les connaissances sur la plante méditerranéenne *Salvia argentea* appartenant à la famille des Lamiaceae et poussant à l'état spontanée dans la région de l'Ouest Algérien.

Les recherches actuelles ont ressorti que l'espèce *Salvia argentea* originaire de la Hongrie, renferme l'acide oléanolique et l'acide ursolique qui présentent des propriétés antitumorales et antivirales (Janicsák et al., 2006). Une variété de diterpénoïds se retrouvent également dans les racines de la sauge argentée (Kabouche et Kabouche, 2008). D'autre part, le viridiflorol a été

reporté comme la principale composante de l'huile de fleurs, constituant majeur dans les huiles essentielles obtenues à partir de deux populations de *S. argentea* (Ben Farhat et al., 2013b).

Notre étude porte sur deux aspects. Le premier consiste en :

- ✓ Une enquête ethnobotanique dans le but de valoriser l'utilisation de cette sauge qui est peu étudiée.
- ✓ Une détermination qui concerne la composition en métabolites primaires des feuilles et des racines.
- ✓ Des analyses phytochimiques basées principalement sur l'extraction et l'analyse qualitative et quantitative des métabolites secondaires.

Le second aspect porte sur :

- ✓ Une évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits méthanoliques et aqueux issus des feuilles et des racines de *Salvia argentea* par les tests du pouvoir de réduction du fer (FRAP) et celui utilisant un radical le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).
- ✓ Un essai antimicrobien réalisé afin de déterminer l'efficacité des principes actifs contre une gamme de souches pathogènes.
- ✓ Une évaluation *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire des feuilles et des racines testées sur des rats Wistar par la mesure de l'œdème et la détermination immunochimique et biochimique des paramètres inflammatoires.

CHAPITRE I :

Etude bibliographique

I. Les plantes médicinales :

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens pour guérir certaines pathologies souvent mortelles sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Actuellement, l'ethnopharmacologie s'emploie à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs (Pelt, 2001). Jusqu'à présent, sur les 300000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2002), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

La gamme des applications traditionnelles de l'herbe dans la médecine domestique semble être infinie, il a été utilisé comme un médicament contre la transpiration et la fièvre, comme carminative, spasmolytique, antiseptique / bactéricide, astringent, comme gargarisme contre l'inflammation de la bouche, agent cicatrisant, pour les soins de la peau et des cheveux et contre le rhumatisme et la débilité sexuelle dans le traitement des troubles mentaux et nerveux ainsi que d'un insecticide (Kintzios, 2000).

Les produits naturels constituent une banque de molécules caractérisées par des structures riches, complexes et fort variées que les chimistes auraient bien du mal à synthétiser dans leur laboratoire (Graham et Depovere, 2002). Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des acides nucléiques et des hydrates de carbones, qui servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent. De plus, les plantes contiennent une grande variété de composés secondaires conduisant à une grande biodiversité moléculaire dont la fonction est loin de faire l'unanimité (Small et Catling, 2000).

De nombreux métabolites secondaires sont des « antibiotiques » au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes (Wichtl et Anton, 1999 ; Cardon et Chatenet, 1990).

Les herboristes utilisent la plante entière pour préparer des remèdes qui offrent une guérison lente mais plus sereine et plus sûre que les médicaments puissants, fabriqués à partir d'agents isolés, qui provoquent plus d'effets secondaires (Bremness, 1998).

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale: méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeables (15%) d'espèces endémiques (Ozenda, 1977).

I.1. La famille des Lamiaceae

Les Lamiacées constituent une famille très diversifiée avec environ 230 genres et environ 7100 espèces dans le monde (Harley et al., 2004). Elle est aussi bien répandue dans les zones tropicales que dans les zones tempérées du monde. La plus grande diversité est rencontrée selon cet ordre: le bassin méditerranéen, l'Asie centrale, le continent Américain, les Iles du pacifique, l'Afrique équatoriale et la Chine.

Un des traits les plus caractéristiques de cette famille réside dans le fait que plusieurs genres renferment des terpènes qui sont responsables de l'odeur aromatique de ces plantes et qui sont utilisés dans la médecine traditionnelle et dans les plats de cuisine (Ramamoorthy et al., 1993).

Du point de vue chimique, cette famille a fait l'objet d'intenses investigations dans le but d'isoler différents types de composés. Parmi les genres qui sont en cause, on cite : *Ajuga*, *Rhabdosia*, *Teucrium*, *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Leonurus*, *Ballota*, *Coleus*, *Thymus*, *Phlomis*. Ces études ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les stérols, flavonoides, iridoides, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes (Hanson, 1995 ; Ulubelen et al., 2001).

I.1.1. Le genre *Salvia*

La *Salvia* est un genre de plante fascinant. Le mot *salvia* vient du latin « *salvare* » qui signifie “ sauver et guérir”. Ce nom a été traduit en (sauge) en français et en (sawge) en ancien anglais (Grieve, 1980) puis en (sage) aujourd’hui. Ce genre est l’un des plus répandus de la famille Lamiaceae, il est largement distribué dans diverses régions, y compris les zones tempérées et chaudes du monde comme la Méditerranée, où elle est représentée par 36 espèces (Hedge, 1972), l’Asie centrale, les îles du Pacifique, l'Afrique tropicale et l'Amérique (Wu et al., 2012).

Presque 1000 espèces de *Salvia* ont été utilisées dans de nombreuses façons : les huiles essentielles utilisées en parfumerie, les fleurs utilisées comme rouge, les feuilles utilisées pour les varices, l'huile de graines comme émollient, les racines comme un tranquillisant (Kintzios, 2000).

Il a été trouvé que la sauge est un ingrédient actif dans les préparations de plantes combinées pour le traitement de la bronchite aiguë et chronique (Newall et al., 1996).

Les études phytochimiques du genre *Salvia* ont permis d'établir un profil chimique pour ce genre. On rencontre fréquemment les stérols tels que le β -sitostérol et le stigmastérol et les

flavonoïdes dans les parties aériennes. Les triterpènes dérivant du squelette de base de l'oléanane, dammarane, ursane ainsi que des composés phénoliques ont été isolés de ce genre. Les diterpènes du type labdane, clérodane, pimarane, abiétane, isolés de ce genre, sont utilisés comme des marqueurs taxonomiques à différents niveaux (Patudin et al., 1974).

En méditerranée, la *Salvia* est utilisée pour ses propriétés antispasmodique, antibactérienne, antifongique, diurétique, régulatrice des désordres du cycle menstruel, antihémorragique (utérus) et antiulcéreuse (Achenbach et al., 1992). Elle a été employée dans l'ancienne Egypte pour augmenter la fertilité des femmes (Schauenberg et Paris, 1990).

L'Algérie compte 23 espèces du genre *Salvia* (Quezel et Santa., 1963), dont *Salvia argentea*, objet de notre étude.

I.2. Noms vernaculaires de *Salvia argentea* :

Arabe: Ferrache en neda

Français : La sauge argentée

Anglais : Silver sage (Figure 01).

I.3. Taxonomie :

Selon (Quezel et Santa, 1963) l'espèce *Salvia argentea* appartient à la classification suivante:

Règne : Plantea

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia argentea*

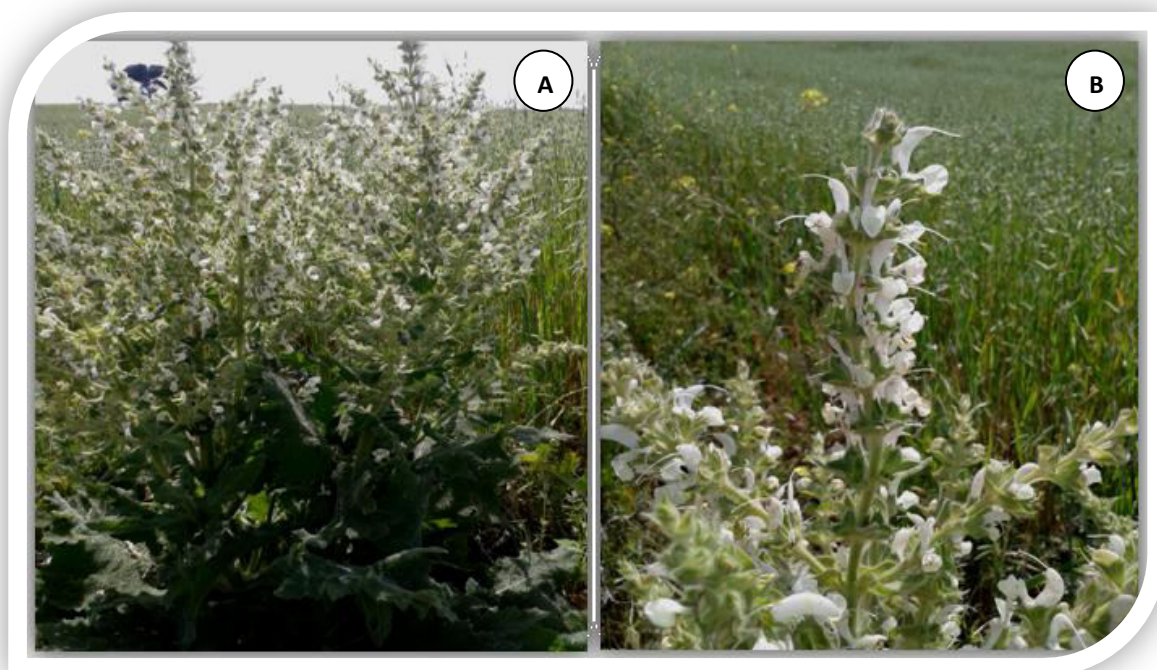


Figure 01 : *Salvia argentea* (A) et fleurs de *S. argentea* (B)
(Prises de vues personnelles).

I.4. Répartition géographique et description morphologique de *Salvia argentea*

S. argentea est une plante herbacée vivace originaire de la région méditerranéenne, au nord-ouest de l'Afrique (Maroc, nord de l'Algérie, Tunisie), le sud de l'Europe (Espagne, Portugal, Italie, Sicile, Malte, Albanie, Bulgarie, Slovénie, Croatie, Bosnie, Kosovo, Monténégro, Serbie, Macédoine et Grèce) et à l'extrême ouest de l'Asie (Turquie). (Riccobono et al., 2015). (Figure 02).

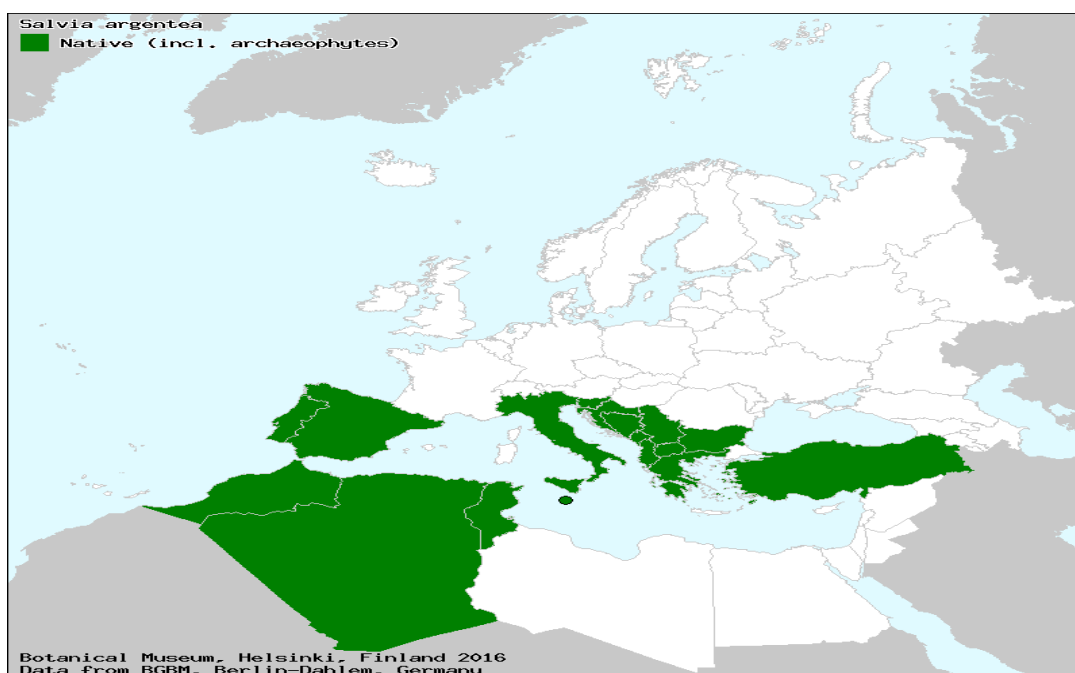


Figure 02 : Répartition de *Salvia argentea* dans le monde (Riccobono et al., 2015).

C'est une plante bisannuelle, se trouve principalement sur les prairies pierreuses, le basalte, les sols volcaniques et les falaises rocheuses (Riccobono et al., 2015), à tiges et inflorescences visqueuses, verticillastres supérieurs stériles, constitués seulement par des bractées. *S. argentea* a une grande zone basique de feuilles qui mesurent 1m de large et 30 - 60 centimètres de haut (Figure 03). Les différentes feuilles sont de 20 - 30 centimètres de long et de 15 centimètres de large. Les deux surfaces de feuille sont fortement couvertes de poils soyeux qui lui donnent un aspect laineux. Les feuilles sont doux au contact, émergeant d'abord en tant que blanc argenté distinctif et en se tournant alors vers gris-vert après la fleuraison. Le temps frais en automne fait virer la couleur des feuilles en argentée. En début d'été, lorsqu'elle atteint environ 1m de hauteur, elle développe des fleurs blanches-rosées à corolle 3 fois plus longue que le calice Pâturages rocailleux et arides (Quézel et Santa, 1963 ; Clebsch et Barner, 2003).

En Italie, les jeunes feuilles de *S. argentea* ont été topiquement utilisées comme hémostatiques (Pieroni et al., 2004), tandis que les feuilles basales, pelées et cuites à la vapeur, ont été consommées comme nourriture en Espagne (Tardio et al., 2006).



Figure 03 : *Salvia argentea* (Prise de vue personnelle).

I.5. Les propriétés thérapeutiques des sauges

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des produits bioactives. La plupart des espèces de *Salvia* sont intrinsèquement liées aux systèmes de médecine traditionnelle locaux dans leur pays d'origine (Codd, 1985).

Des études ethnobotaniques, phytochimiques et pharmacologiques ont montré que les espèces de *Salvia* sont considérées comme des plantes de type «cure-all» (Foster ., 1999 ; Harley et al., 1998).

Des huiles essentielles de *Salvia* ont été utilisées dans le traitement d'un large éventail de maladies Comme ceux du système nerveux, du cœur et de la circulation sanguine, du système respiratoire, du système digestif et des maladies métaboliques et endocriniennes (Hamidpour et al., 2014 ; Eidi et al., 2005). On outre, ce genre possède un certain nombre d'activités biologiques, y compris antiseptiques, antibactériennes (Abd-Elmageed et al., 2008 ; Yang et al., 2001), astringentes, anti inflammatoires (Cadirci et al., 2012 ; Baricevic et al., 2001), antioxydantes (Esmaeili et Sonboli, 2010) , antivirale et cytotoxique (Smidling et al., 2008 ; Tada et al., 1994 ; ZareShahneh et al., 2013 ; Babak Bahadori et al., 2015 Ryu et al., 1997), spasmolytiques, anticonvulsivantes (Coelho de Souza et al., 1998), antimycobactériennes (Aşkun et al., 2010), carminatives (Lawrence, 2005) et antitumorales (Russo et al., 2013 Fiore et al., 2006).

Pour usage externe, la sauge est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies (Djerroumi et Nacef., 2004).

Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux (Raulescu et al., 2004). Cette herbe aromatique est employée dans la cuisine, pour son goût puissant, légèrement amer et camphré (Duling et al., 2007).

I.6. Constituants chimiques des espèces de *Salvia*

Un grand nombre de métabolites secondaires bénéfiques, appartenant à divers groupes chimiques, tels que les huiles essentielles, les composés terpénoïdes et phénoliques, ont été isolés dans ce genre, qui figure en bonne place dans les pharmacopées de nombreux pays à travers le monde (Banthorpe et al., 1989 ; Nagy et al., 1999).

L'huile essentielle de *Salvia argentea*, recueillies dans le sud-est de la Serbie, a été analysé par GC-MS. Quarante-sept constituants ont été identifiés. L'huile a été caractérisée par une teneur

élevée en sesquiterpènes. Les principaux constituants étaient le viridiflorol (32,4%), le manol (14,6%) et l' α -humulene (10,7%) (Couladis et al., 2001).

Des études phytochimiques antérieures sur la plante ont indiqué la présence des diterpénoïdes abiétanes dans les racines (Michavila et al. 1986; Yang et al. 1996), tandis que plusieurs flavones, provenant des exsudats de *S. argentea* collectées en Bulgarie (Nikolova et al. 2006), et de l'extrait d'acétone de plantes cultivées en Pologne (Sajewicz et al. 2012), les dérivés d'oléanane et d'ursane (Bruno et al. 1987; Janicsàk et al. 2006) ont été identifiés au niveau des parties aériennes. En outre, plusieurs triterpénoïdes d'ursane avec un nouveau modèle de distribution de groupes fonctionnels ont été isolés de *S. argentea* recueillies en Algérie (Lakhal et al. 2014) suggérant des différences chimiotaxonomiques avec d'autres variations de *S. argentea*.

Certaines études ont été publiées sur la composition de l'huile essentielle de *S. argentea* poussant au Maroc (Holeman et al. 1984), Serbia (Couladis et al. 2001), Macédoine (Veličković et al. 2014) et en Tunisie (Ben Farhat et al. 2013a).

Plusieurs propriétés biologiques ont été reportées pour cette espèce. En effet, une bonne activité antioxydante a été mise en évidence à partir des extraits aqueux et méthanoliques (Stagos et al., 2012) et de l'extrait méthanolique (Salah et al., 2006 ; Ben Farhat et al., 2013a ; Ben Farhat et al., 2013b). En outre, une bonne acétylcholinestérase (AChE) et Butyrylcholinestérase (BChE) activité inhibitrice pour le CH_2Cl_2 et les extraits méthanoliques (Orhan et al., 2013). Activité antibactérienne sur *S. aureus* et *S. epidermidis* pour l'extrait éthanolique (Sarac et Ugur., 2007) et l'activité larvicide, contre le moustique *Culex pipiens* (Şeref Gün et al., 2011) ont été déterminées pour l'extrait d'hexane.

I.7. Les principes actifs

Le principe actif c'est une molécule contenu dans une drogue végétale ou dans une préparation à base de drogue végétale et utilisé pour la fabrication des médicaments (Pelt., 1980). Cette molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animale, elle est issue de plantes fraîches ou des séchées, nous pouvons citer comme des parties utilisées: les racines, écorces, sommités fleuries, feuilles, fleurs, fruits, ou encore les graines (Benghanou, 2012). Les plantes contiennent des métabolites secondaires peuvent être considérées comme des substances indirectement essentiels à la vie des plantes par contre aux métabolites primaires qu'ils sont les principales dans le développement et la croissance de la plante, les métabolites secondaires participent à l'adaptation de la plante avec l'environnement, ainsi à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température...) (Sarni-Manchado et Cheynier,

2006). Ils sont des éléments essentiels de la coévolution des êtres vivants ce qui explique leur très grande diversité et leur intérêt particulier pour la recherche de nouveaux médicaments.

II. Les métabolites secondaires

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques. Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Dont plus de 200.000 structures ont été définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

II.1. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires peuvent être classés en plusieurs grands groupes (Figure), dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues sont les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins...), les composés terpéniques et les composés azotés dont les alcaloïdes (Figure 04). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003 ; Amas, 1997).

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix et al., 2005). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

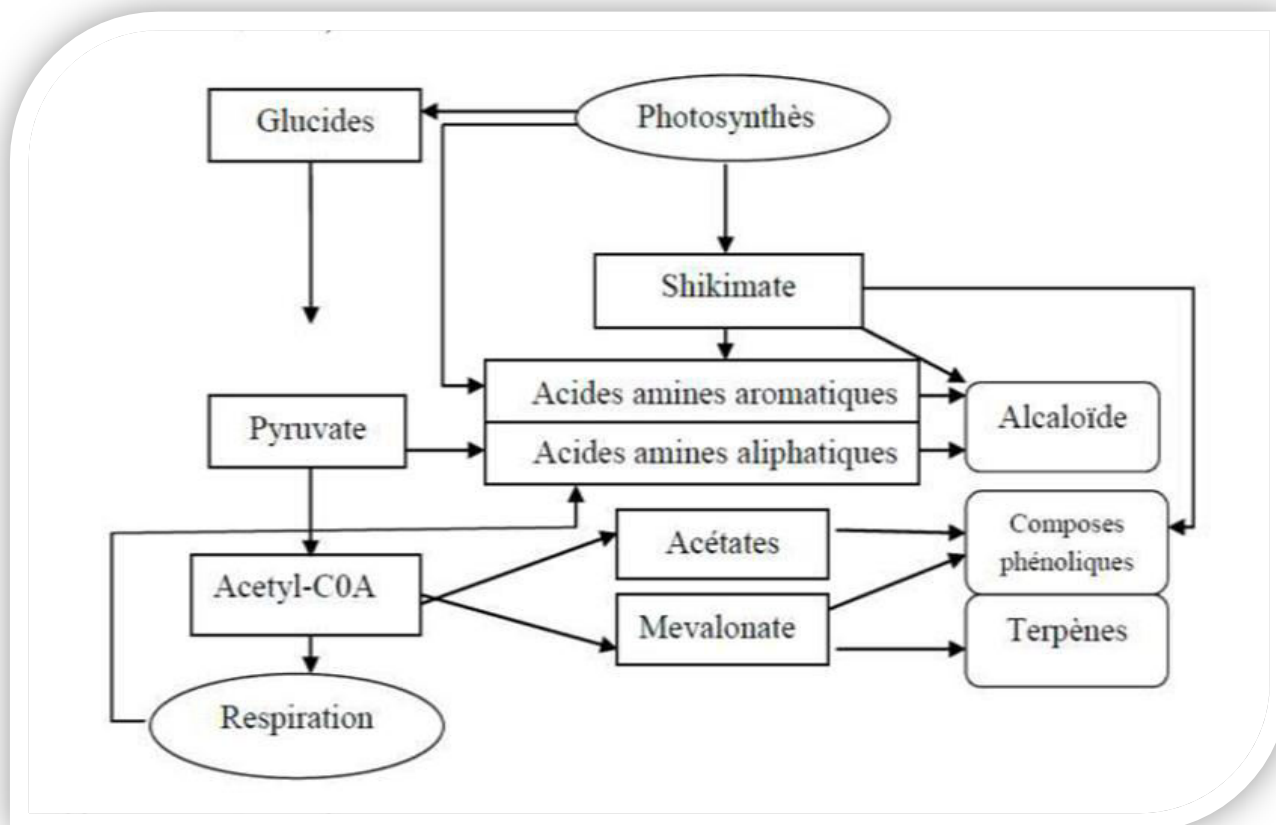


Figure 04 : Les grandes voies de synthèse des métabolites secondaires et relations avec le métabolisme primaire (Renault-Roger, 2008)

II.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (Yusuf, 2006 ; Fleuriet, 1982).

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulière (Nkhili, 2009).

Ils subdivisent en sous classe principales; les acides phénols, les flavonoïdes, les lignines, les tanins... (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006) (Figure 05).

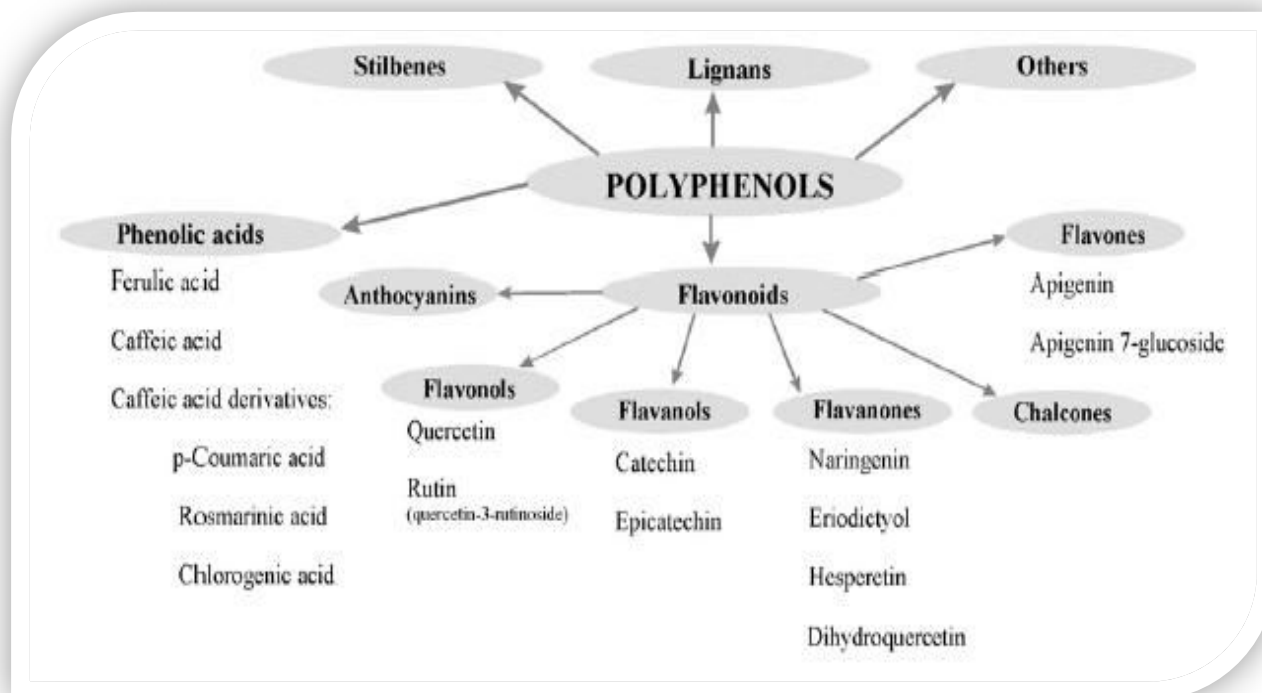
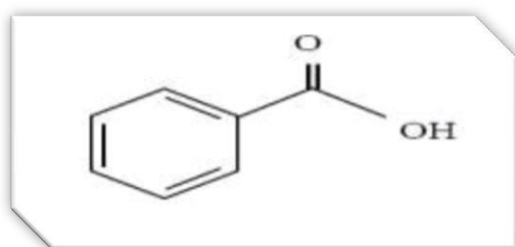


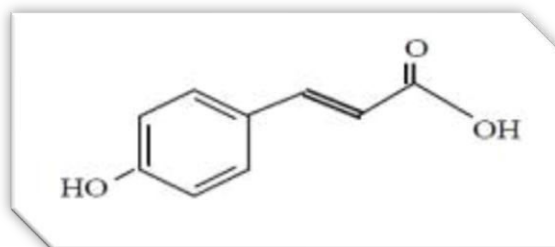
Figure 05 : Classification des composés polyphénoliques (Boros et al.,2010).

➤ Acides phénoliques

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Wichtl et Anton., 2009) (Figure 06).



Acide benzoïque



Acide cinnamique

Figure 06 : Structures de base des acides benzoïque et cinnamique (Bruneton, 2009).

➤ Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et al., 2006), ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem et al., 2001; Bruneton, 1999). Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures regroupées en sous-classes ont été identifiées (Harborne et Williams., 2000 ; Markham, 2006). La structure de base commune à ce groupe de polyphénols est diphenylpropane : c'est la présence de deux cycles aromatiques (A et B) liés par une chaîne de 3 carbones, formant un hétérocycle oxygéné (C) (Yao et al., 2004 ; Macheix et al., 2006 ; Yao et al., 2010) (Figure 07). Il reste des milliers d'autres composés à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényle (Beecher, 2003 ; Gresele et al., 2011).

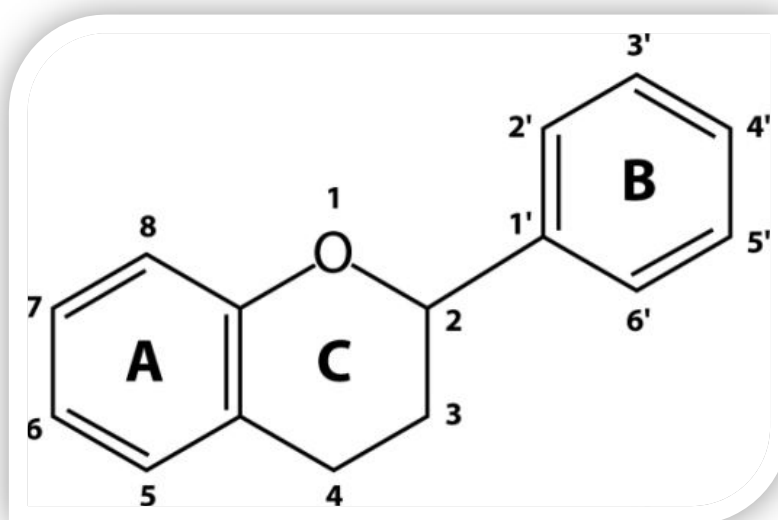


Figure 07 : Structure générale des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont subdivisés en sous-classe selon les variations autour du squelette chimique de base en C_{15} portant principalement sur trois points :

- Le degré d'hydroxylation des différents cycles.
- Le niveau de méthylation (groupement $O-CH_3$ à la place des seules fonctions phénoliques.
- Le niveau de glycosylation. En dehors, de quelques exceptions comme le groupe des flavanes, les flavonoïdes des végétaux sont liés à des sucres. D'une manière générale, l'ose lié à la

On distingue alors (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols, les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Havsteen. 2002 ; Beecher. 2003 ; Edenharder et Grunhage, 2003 ; Crozier et al., 2009) (Figure 08).



Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelquefois combinés aux protéines et aux alcaloïdes (Catier et Roux, 2007).

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénique :

Tanins hydrolysables : ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acides-phénol (Figure 09). Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des *tanins galliques*, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphénique = DHHDP ; acide chébulique) dans le cas des tanins classiquement dénommés *tanins ellagiques* (Bruneton, 2009).

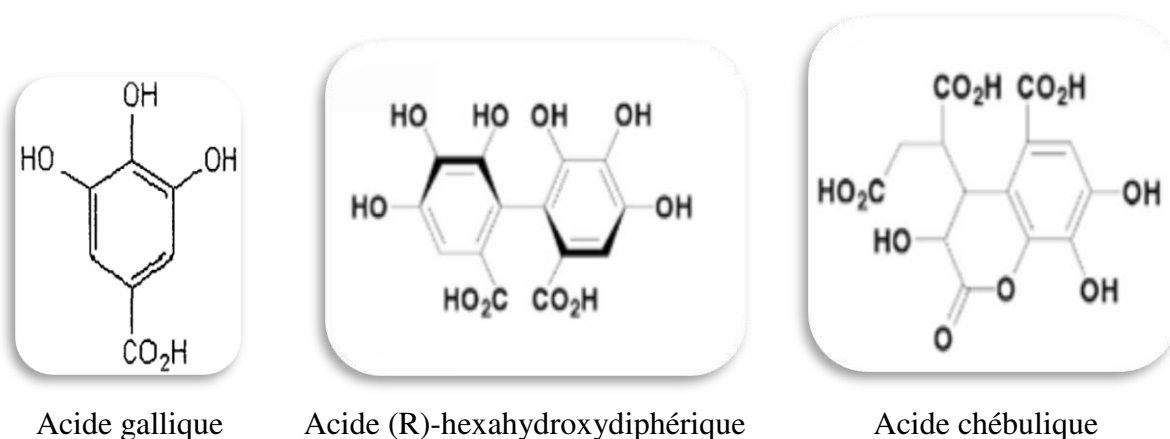


Figure 09: Structures de quelques acides phénols (Bruneton, 2009).

Tanins condensés ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols : ce sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols (Figure 10) liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent 4 → 8 ou 4 → 6, résultante du couplage entre le C-4 électrophile d'un flavanyle issu d'un flava-4-ol ou d'un flavan-3,4-diol et une position nucléophile (C-8, plus rarement C-6) d'une autre unité, généralement un flavan-3-ol (Bruneton, 2009).

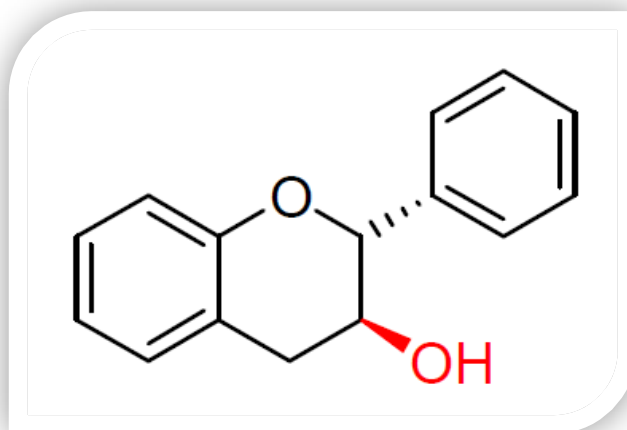


Figure 10 : Squelette moléculaire d'un flavan-3-ol.

III Rôles et propriétés biologiques des polyphénols :

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques (Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007).

III.1. Propriété antioxydante :

Cette action est attribuée à l'effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Pulido et al., 2000 ; Nijveldt et al., 2001).

III.1.1. Radicaux libres :

Un radical libre est définie comme toute molécule chimique possédant un ou plusieurs électrons célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules (Milane, 2004). Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

III.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène par addition d'un électron, les principales espèces réactives de l'oxygène sont [anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) , radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$), le radical peroxyde ($ROO^{\bullet}$)], et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroperoxyde ($ROOH$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Jacques et André., 2004 ; Gutteridge, 1993).

III.1.3. Stress oxydant :

Le stress oxydatif apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes est rompu en faveur des pro-oxydants.

Dans les systèmes vivants, une production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces espèces réactives est possible. Les défenses antioxydantes, dont une partie est dépendante de l'alimentation, peuvent être insuffisantes pour empêcher les dégâts cellulaires que peuvent causer les radicaux libres de l'oxygène (Valko et al., 2007). (Figure 11).

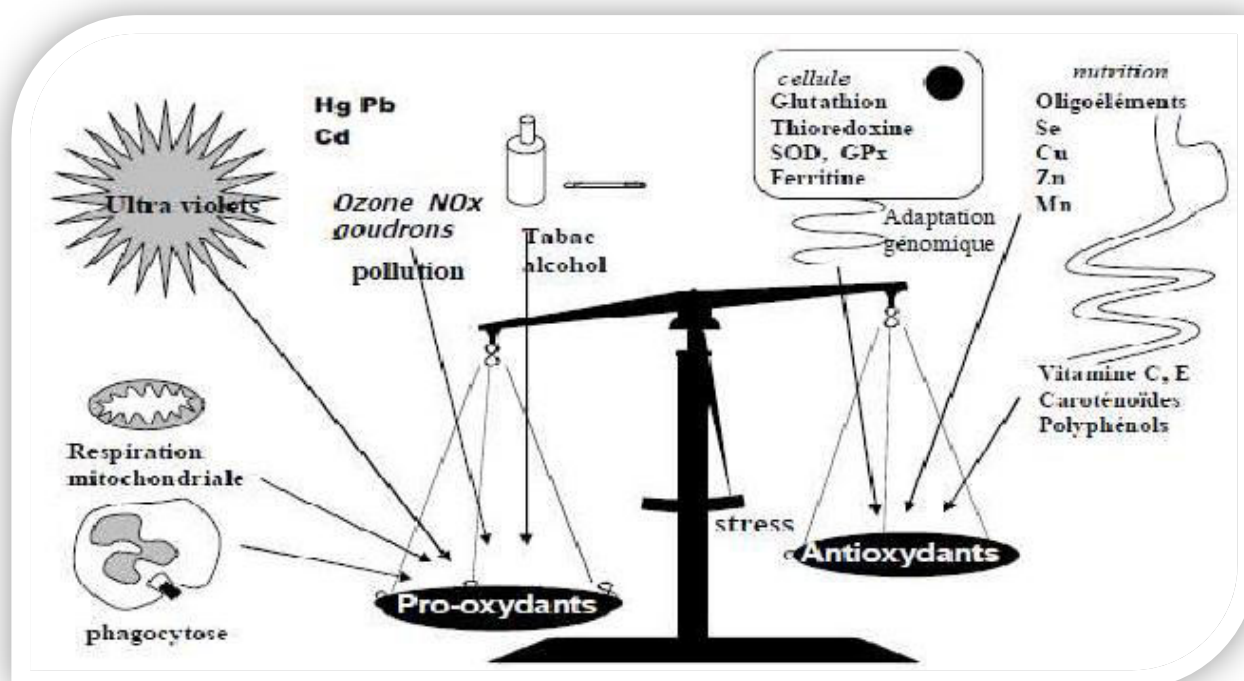


Figure 11 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

a. Les causes d'un stress oxydant

Diverses conditions peuvent entraîner un stress oxydant. Parmi les causes d'un stress abiotique, on peut notamment citer les UV. En effet, ils sont connus pour induire des dommages directs de l'ADN comme des dimères de pyrimidine pouvant mener à des mutations délétères (Brash et al., 1991), les UV sont également responsables de la production de ROS dans divers compartiments cellulaires (Black, 1987). En ce qui concerne la température, il a été montré que des chocs thermiques aussi bien vers des températures élevées (Davidson et al., 1996) que des températures faibles (Prasad et al., 1994) étaient à l'origine d'une surproduction de ROS (Flanagan et al., 1998). Dans les deux cas, cela serait lié directement à la chaîne respiratoire mitochondriale. Comme les mitochondries sont la principale source de ROS dans la cellule, une augmentation de

leur activité entraîne une augmentation de la production de ROS. Dans le cas d'une exposition à des faibles températures, la diminution de l'activité de certaines enzymes de la chaîne respiratoire entraînerait une augmentation de la fuite d'électrons à l'origine de la production de ROS.

b. Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

Il est important d'évoquer alors le paradoxe de l'O₂ : il est indispensable au fonctionnement cellulaire mais il est aussi la source des ERO qui peuvent provoquer des dommages aux macromolécules biologiques (ADN, protéines, phospholipides membranaire) (Droge, 2002). Les ERO sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée en agissant comme second messager (Thannickal et Fanburg, 2000 ; Droge, 2002).

Les ERO peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (Parke et Parke, 1995).

Parmi ces pathologies, les maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies respiratoires, les diabètes, les maladies digestives et les affections cutanées constituent de plus en plus un problème mondial de santé publique. Ces pathologies chroniques peuvent s'accompagner de processus inflammatoire qui est souvent un des signes d'alerte vers les complications.

III.1.4. Les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003). L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes : 1) Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. 2) Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (Ribeiro et al., 2001).

L'oxydation des lipides représente un problème important pour certaines industries, puisqu'elle est responsable de la baisse de qualité et de la diminution de la durée de conservation des produits cosmétiques (Yepez et al., 2002) et alimentaires (Yepez et al., 2002 ; Kosar et al., 2003). Ce phénomène conduit à l'odeur rance des nourritures en putréfaction. L'addition des antioxydants est une solution pour protéger de tels produits de l'oxydation (Kosar et al., 2003).

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne qui ont une action néfaste sur les cellules de notre corps, en les abîmant et en accélérant le processus de vieillissement. Normalement, le corps humain maintient l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres en produisant simultanément les deux types de substances

dans le processus métabolique. Le déséquilibre entre ces deux types de composés conduit à un phénomène appelé *stress oxydatif* (Yepez et al., 2002).

Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (Haton, 2005).

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule :

III.1.4.1. Les antioxydants enzymatiques

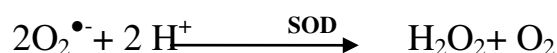
L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Avisar et al., 1989).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Marfak, 2003).

➤ *La superoxyde dismutase (DOS)*

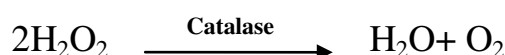
La superoxyde dismutase (SOD), est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène.

Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre (Cu-SOD) et de zinc (Zn-SOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (Mn-SOD) (Jacques et André., 2004).



➤ *La catalase (CAT)*

La catalase présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).



➤ **La glutathion peroxydase (GPx)**

La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (Ganther, 1999).

La glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries, elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants: le glutathion réduit et le sélénium. En présence de deux molécules de glutathion sous forme réduites, la glutathion peroxydase catalyse la transformation de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'eau (Figure 12). Au fur et à mesure de sa consommation par la glutathion peroxydase, le glutathion doit être régénéré, cela est rendu possible par une glutathion réductase qui consomme une molécule de NADPH fourni par la voie des pentoses phosphates (Jacques et André., 2004).

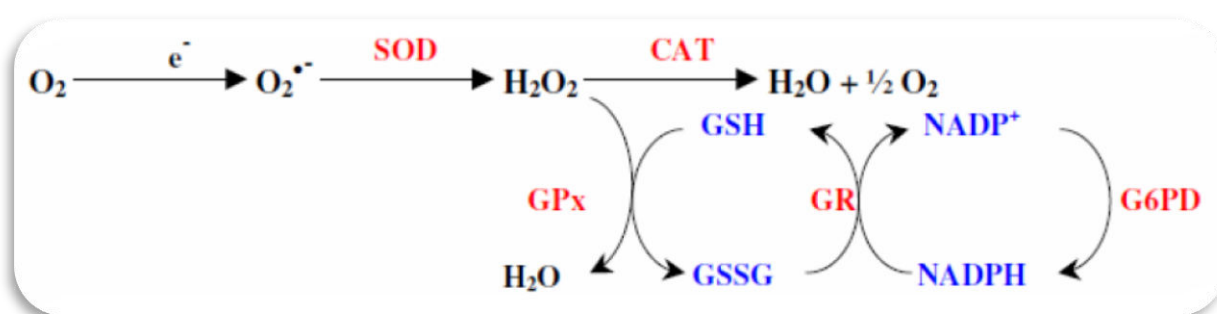


Figure 12 : Schéma du mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification enzymatique (Piquet et Hebuterne, 2007).

III.1.4.2. Les antioxydants non enzymatiques

De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines, nutriments, composés naturels,...etc. sont considérés comme des antioxydants. Notons à titre d'exemples, les plus courants:

a. Les vitamines

❖ La Vitamine E :

La vitamine E est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines. Elle représente une famille de composés chimiquement apparentés qui est subdivisée en deux sous-groupes appelés tocophérols et tocotriénols. De plus, les tocophérols et les tocotriénols ont les formes α , β , γ et δ (Paloza et al., 2008 ; Masaki, 2010).

Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques $RO_2^\bullet$ qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice. Celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (Gardès-Albert et al., 2003).

❖ La vitamine C

La vit C ou l'acide ascorbique est un important et puissant antioxydant hydrosoluble qui ainsi fonctionne dans les milieux aqueux de l'organisme (Sugiyama 1992 ; Deaton et Marlin, 2003). Une vaste gamme de ROS (hydroxyles, radicaux peroxydes, anions superoxydes, acides hypochloreux), les espèces réactives du nitrogène (peroxynitrite) et les radicaux dérivés des antioxydants (radicaux α -tocophéroxyl et l'urate) sont éliminés par l'acide ascorbique (Deaton et Marlin, 2003). Ses principaux antioxydants partenaires sont la vitamine E et les caroténoïdes. La vit C peut également contribuer avec les enzymes antioxydantes (Rahman, 2007).

III.1.4.3. Antioxydants d'origine végétale :

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot OH$ et peroxydes $RO_2^\bullet$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet 1O_2 , ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardès-Albert et al., 2003).

III.2. Propriété antimicrobienne:

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* sont focalisées pour l'évaluation des propriétés antibactériennes, et antifongiques des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales.

L'action inhibitrice des flavonoïdes sur la croissance bactérienne était étudiée par (Katarzyna et al., 2007) qui ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*...) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*...).

Moroh et al., 2008 ont démontré l'effet antibactérien des extraits acétiques riches en alcaloïdes et en flavonoïdes de *Morinda morindoides*, sur 8 souches d'*Escherichia coli*, germes de la flore intestinale. Des flavonoïdes, une flavone et une flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montrés comme possédant l'activité

contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Valsaraj et al., 1997 ; Wachter 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldei* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus* une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs. Dans une autre étude (Belhattab et al., 2004) ont démontré un effet antifongique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur des dermatophytes.

Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Récemment, des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Mahmood et al., 1993).

Le mécanisme d'action des polyphénols sur ces agents pathogènes n'est pas bien connu, les études exploitées par (Domenico et al., 2005) ont mené à conclure que l'effet antimicrobien des produits polyphénoliques est dû partiellement à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physicochimiques des composés polyphénoliques (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien.

III.3. Propriété anti-inflammatoire

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Khiati, 1998). Les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes.

Par ailleurs, l'acide arachidonique peut être métabolisé par la voie de la lipoxygénase pour aboutir à la formation de leucotriènes et par la voie de la cyclooxygénase pour produire des thromboxanes et des prostaglandines, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoire (Madigan et al., 1997).

Plusieurs flavonoïdes (le crisiliol et la baicaléine) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase et donc la production des leucotriènes. D'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysine agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (Madigan et al., 1997).

D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéoline, l'apigénine, catéchine sur la cyclo-oxygénase enzyme synthétisant des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire (Girotti 2006).

Le (Tableau 01) récapitule les effets biologiques des polyphénols rapportés par la littérature.

Tableau 01: Activités biologiques de quelques composés phénoliques selon Bruneton., 1999 ; Gresele et al., 2011.

Composés phénoliques	Activités biologiques
Acides phénols	Antifongique, antioxydante, antibactérienne.
Tanins	Effets stabilisant sur le collagène, antioxydant, antidiarrhéique, effet antiseptique effet vasoconstricteur.
Flavonoïdes	Antitumorale, anticarcinogène, anti-inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur, diurétique.
Coumarines	Anticoagulante, antioxydante, protectrice vasculaire et antioedémateuse.
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, antioxydant.
Proanthocyanes	Effets stabilisant sur le collagène, antioxydants, antitumoraux, antifongiques et anti-inflammatoires.
Tanins galliques et caté chiques	Antioxydante.
Lignanes	Anti-inflammatoire, analgésique

VI. L'inflammation

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire.

Ce mécanisme est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases (ou NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (Sahnoun et al., 1998).

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse (Ndiaye et al., 2006). (Figure 13).

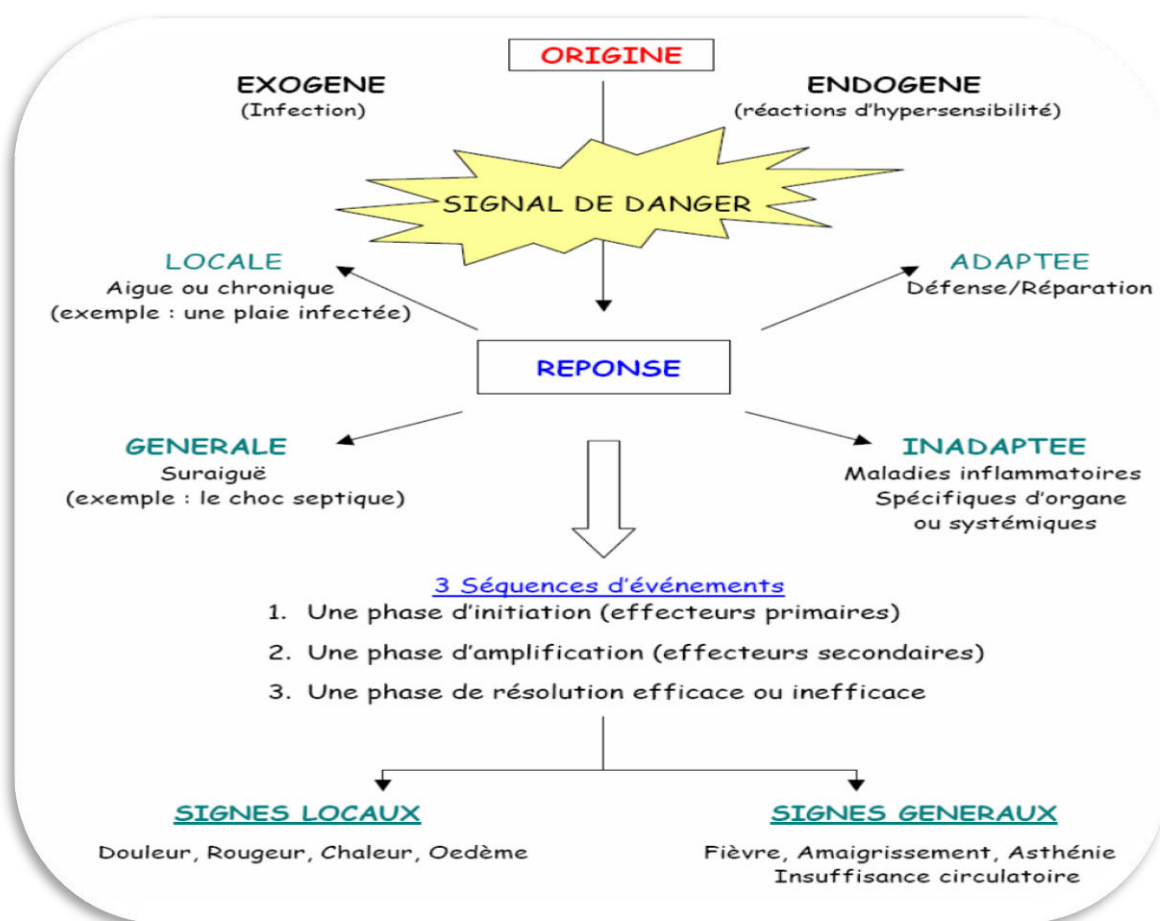


Figure 13 : La réaction inflammatoire schématisée (Prin et al., 2009).

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et représentent les agents exogènes. Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- Infection : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons).
- Agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, radiations.
- Agents chimiques : caustiques, toxines, venins.
- Corps étrangers : exogènes ou endogènes.

Il existe deux types d'inflammations : aigue et chronique

L'inflammation aigüe qui dure de quelques jours à quelques semaines est caractérisée par les quatre signes typiques de l'inflammation qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Botting et Botting, 2000). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Charles et al., 2010). L'inflammation aigue peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire

immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (Figure 14) (Weill et al., 2003).

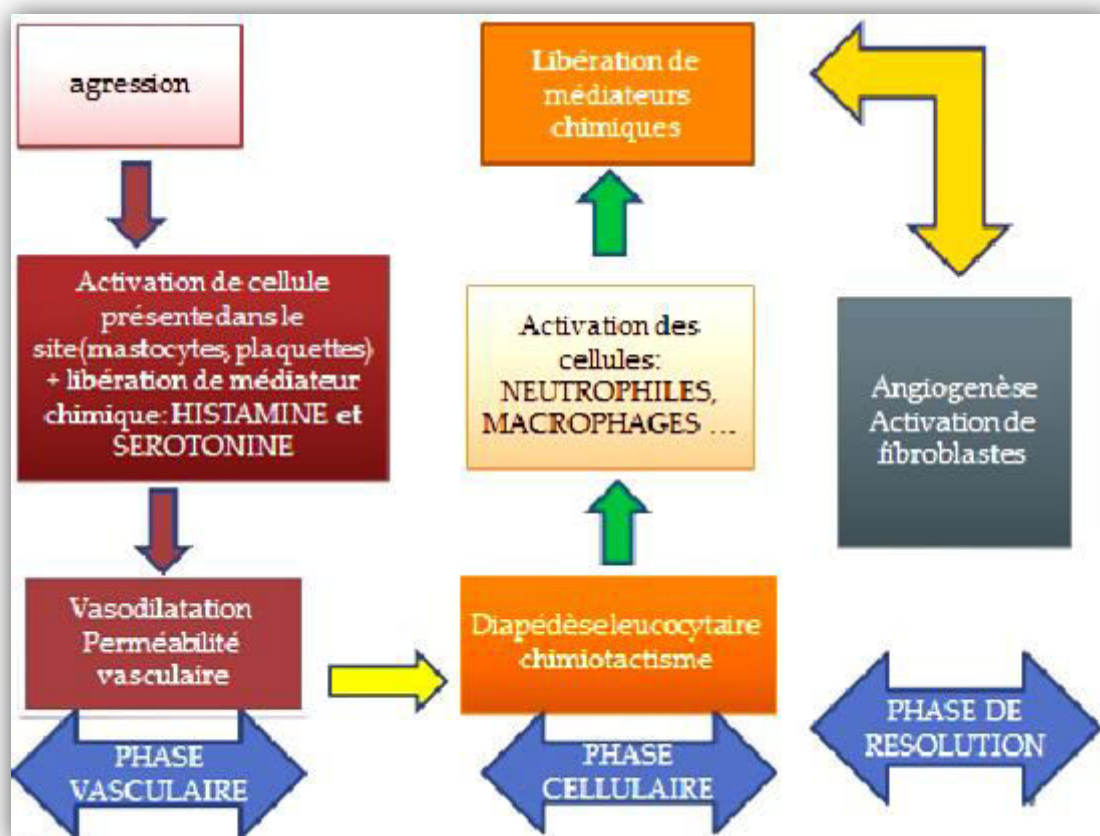


Figure 14 : Les phases de l'inflammation aiguë.

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé (Rankin, 2004). Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années. Elle peut même se prolonger tout au long de la vie de l'individu (Fauve et Hevin, 1998). À la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentatives de réparation sont également présents (Weill et al., 2003). Les cellules mononuclées et particulièrement les macrophages constituent l'essentiel de l'infiltrat cellulaire vers le site inflammatoire (Fauve et Hevin, 1998 ; Weill et al., 2003). La présence de lymphocytes dans

l'infiltrat est habituelle. Tandis que la présence des polynucléaires éosinophiles est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires (Dombrowicz et Capron, 2001).

VI. 1. Les anti-inflammatoires

a. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur, la fièvre et l'inflammation depuis plus de 3000 ans et ils sont toujours utilisés quotidiennement par des millions de patients à travers le monde. Ce sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique (Tableau 02) mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (Bidaut-Russel, 2008).

Tableau 02 : Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. (Wallace et Staats, 2004).

Classe structurale	Nom scientifique	Nom commercial
Salicylates	Acétylsalicylique Diflusal	Aspirine Dolobid
Dérivés d'acide propionique	Ibuprofène Fénopropène calcium Flurbiprofène Ketoprofène	Ibuprofène
Dérivés d'acide acétique	Diclofénac	Voltarene
Indoles	Indométacine Tolmétine Sulindac	Indocine Tolectine Clinoril

b. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol (Tableau 03). Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immunes (Payne et Adcock, 2001). Leur mécanisme d'action est le même que celui des glucocorticoïdes endogènes. Ils exercent leurs effets sur la phospholipase A2, inhibant ainsi la libération de l'acide arachidonique et par conséquent la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes (Russo-Marie et al., 1998).

Tableau 03 : Principaux glucocorticoïdes (Henzen, 2003).

Glucocorticoïde	Nom commercial
Cortisol (Hydrocortisone)	Hydrocortone, Solu-Cortef
Cortisone	Cortison CIBA
Prednisone	Prednison Streuli
Prednisolone	Spiricort, Ultracorten
Methylprednisolone	Urbason, Solu-Medrol
Bétaméthasone	Celestene, Diprostene

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie. Divers troubles peuvent être observés. Ces troubles peuvent être aigus tel que l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'euphorie avec insomnie allant jusqu'à une psychose aiguë et l'apparition d'ulcères gastro-duodénaux. Des troubles chroniques peuvent aussi se manifester tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003).

Pour limiter ou éviter les effets nocifs de ces molécules, les populations des pays riches et pauvres utilisent respectivement la médecine complémentaire, alternative et non conventionnelle et la médecine traditionnelle pour leurs besoins en santé. La médecine traditionnelle représente une composante de système de santé pour les populations indigentes (OMS, 2002).

c. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes médicinales sont très utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde pour le soulagement des maladies inflammatoires tel que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, la bronchite, l'eczéma, l'arthrose, la goutte, la rhinite allergique, les ulcères gastriques et duodénaux (Setty et Sigal, 2005 ; Wiart, 2006).

Les molécules dotées d'un effet anti-inflammatoire dans les plantes sont principalement les polyphénols, les stérols et les terpènes (Adedapo et al., 2008).

L'étude de Landolfi et al., (1984) a montré que certains polyphénols comme substance anti-inflammatoire, sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants : à de fortes

concentrations, ils inhibent la cycloxygénase et la lipoxygénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la lipoxygénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysine agissent principalement sur l'activité de la cycloxygénase.

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production leucotriènes (Di Carlo et al., 1999).

CHAPITRE II : ***Matériels & méthodes***

I. Enquête ethnobotanique

L'enquête a été effectuée au niveau de la wilaya de Sidi Bel Abbès, durant les mois de Janvier et Février 2015 et a porté sur la connaissance, l'utilisation, le mode d'emploi et les maladies traitées par cette plante. L'échantillonnage est aléatoire. Au total 100 personnes de sexes différents ont été enquêtées. L'enquête ethnobotanique est destinée à rassembler les différentes informations recherchées auprès de la population.

II. Matériel végétal

Les feuilles et les racines de *Salvia argentea* ont été récoltées au mois d'avril 2015 dans la région de Tenira sise dans la wilaya de Sidi Bel-Abbès Algérie et dont les coordonnées géographiques sont comme suit : l'altitude : 726m ; latitude : 35°26 ' 22.3" N ; longitude : 0°38 ' 34.38" W (Sidi Bel Abbès, Algérie) (Figure 15). La confirmation de l'identification de cette plante a été faite au laboratoire de botanique de l'Université de Sidi Bel Abbès et a été conservée sous le N° *S. argentea*/04.2015 au laboratoire de Biotoxicologie.

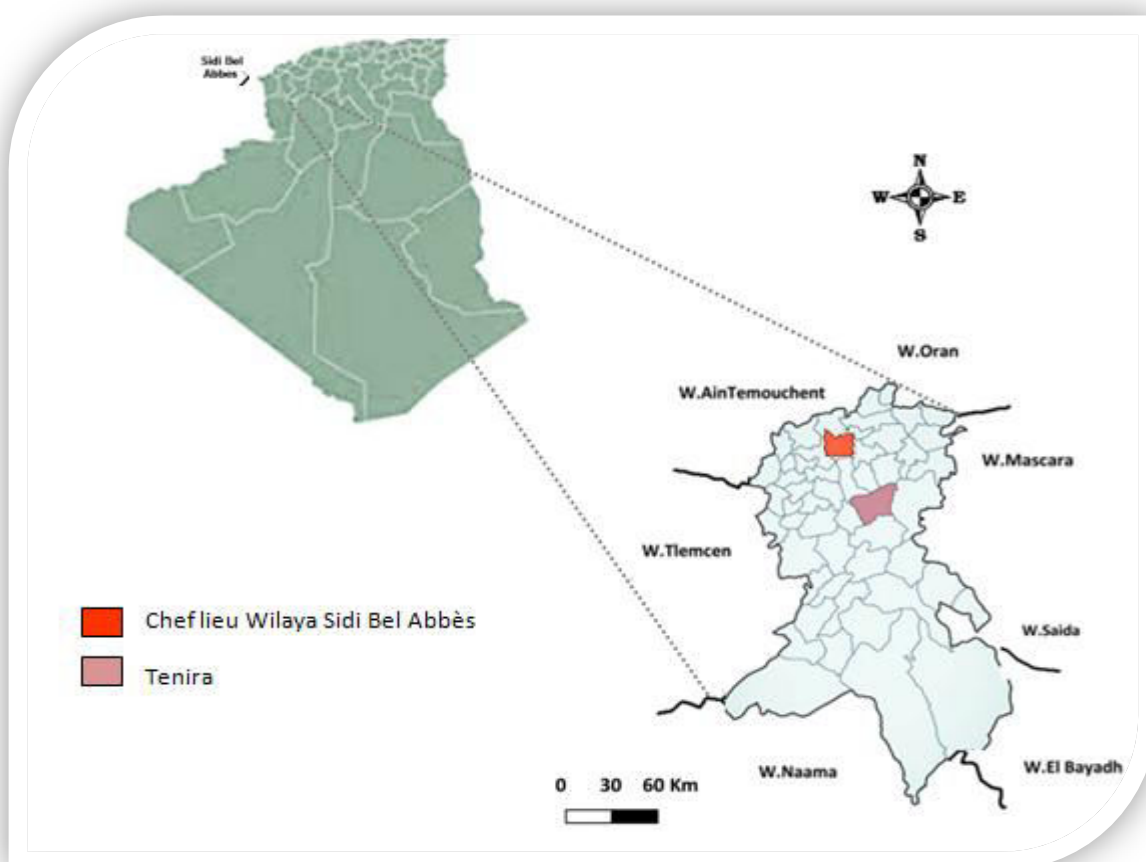


Figure 15 : Carte de situation de la zone d'étude.

Le matériel végétal collecté a été lavé puis séché à une température ambiante et à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil (Figure 16) ensuite réduit en poudre à l'aide d'un broyeur et conservé dans des flacons bruns jusqu'à utilisation.



Figure 16 : Séchage des feuilles et racines de *Salvia argentea* (Prise de vue personnelle).

II.1. Analyses physico-chimiques

II.1.1. Teneur en eau

La teneur en eau est la différence entre le poids de l'échantillon avant et après la dessiccation jusqu'à poids constant (Audigie et al., 1984). On procède à une dessiccation des feuilles et les racines de *S. argentea* dans une étuve (Memmert UF 110) aux températures de 100°C à 105°C, sous la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante.

Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{M1 - M2}{P} \times 100$$

H(%) : Teneur en eau ou taux d'humidité.

M1 : Masse en g de la capsule avec l'échantillon avant dessiccation.

M2 : Masse en g de la capsule avec l'échantillon après dessiccation.

P : Masse en g de la prise d'essai.

II.1.2. Taux de cendre

Le principe consiste en une incinération du matériel biologique dans un four à moufle, utilisant un creuset en porcelaine, à une température de 900°C pendant 90 minutes.

L'opération n'est terminée que lorsque la couleur des résidus devienne blanche grisâtre et qui se transforme en une couleur blanche après refroidissement (AOAC, 1990).

Le taux de cendre est calculé par la formule suivante :

$$MO (\%) = \frac{M1-M2}{P} \times 100$$

MO (%) : Taux de la matière organique.

M1 : Masse en g du creuset et la matière sèche avant l'incinération.

M2 : Masse en g du creuset avec les cendres.

P : Masse en g de la prise d'essai.

La teneur en cendre (C%) est déterminée comme suite : $C\% = 100 - MO\%$

II.1.3. Teneur en matière grasse

Les échantillons (feuilles et racines) ont été extraits en discontinu par l'éther de pétrole à ébullition qui dissout graduellement la matière grasse en utilisant un appareil de type Soxhlet (ISO 659, 1998).

Le taux de la matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$MG (\%) = \frac{P1-P2}{ME} \times 100$$

MG (%) : Taux de la matière grasse.

P1 : Poids du ballon après évaporation.

P2 : Poids du ballon vide.

ME : Masse de la prise d'essai.

II.1.4. Teneur en sucres totaux

L'échantillon en poudre (1g) est dispersé dans 10 ml de DMSO à 25% (v/v) dans l'eau. Le mélange est incubé au bain marie bouillant pendant 15 min. 0.1 ml de ce mélange est dilué dans 9.9 ml d'eau. A 0.5 ml de ce dernier, sont ajoutés 0.5 ml de phénol (5%). Après homogénéisation, on ajoute 2 ml de H₂SO₄ (75%). Ce mélange est incubé pendant 15min au bain Marie bouillant ensuite

15 min à l'obscurité avant d'effectuer la lecture au spectrophotomètre (Shimadzu Scientific Instruments) à 492 nm. Le glucose est utilisé comme standard de la gamme d'étalonnage (Fox et Robyt, 1991).

II.1.5. Dosage des protéines hydrosolubles

Les protéines hydrosolubles sont dosées par la méthode de (Lowry et al., 1951) utilisant le réactif de Folin Ciocalteus. Les protéines réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteus (un mélange de phosphotungstate et de phosphomolybdate) pour donner des complexes colorés. La couleur bleue ainsi formée est due à la réaction du phosphomolybdate avec la tyrosine et le tryptophane. L'intensité de la coloration dépend donc de la quantité d'acides aminés aromatiques présents et varie selon les protéines. Cette méthode permet de doser des concentrations de protéines qui varient de 5 à 100 µg/ ml (Pelmont., 1995).

II.1.5.1. Mode d'extraction des protéines pour dosage

L'extrait protéique est obtenu en ajoutant 0,226 g de sulfate d'ammonium à 1ml de l'extrait aqueux de l'échantillon. Après une incubation à froid pendant 12 h, la solution est centrifugée à 13 400 g pendant 20 min. Le surnageant obtenu est éliminé et le culot repris dans du tampon phosphate salin pH 7,4 ensuite conservé à -20°C jusqu'au dosage (Englard et al., 1990).

II.1.5.2. Dosage des protéines

Dans un tube à essai 1ml de l'extrait est ajouté à 1ml de réactif de Lowry. Après agitation et incubation pendant au moins 10 minutes à température ambiante, 0,5ml de réactif de Folin Ciocalteus à 0,2N est ajouté au mélange en agitant immédiatement le tube. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, la lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm.

L'étalonnage s'effectue avec la sérumalbumine bovine (SAB) utilisant une gamme de concentration allant de 0 à 0,025 mg/ml.

II.2. Préparation des extraits bruts

II.2.1. Extraction par macération

Les feuilles et les racines de *S. argentea* (10 g) en poudre ont été extraites avec 100 ml de méthanol 80% avec agitation pendant 24h à température ambiante (Majhenic et al., 2007). Le

mélange est filtré et concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidolph instruments) afin d'obtenir l'extrait méthanolique des feuilles (EMF) et des racines (EMR).

II.2.2. Extraction sous reflux

La matière végétale en poudre est mise en contact avec de l'eau et le mélange est porté à ébullition sous reflux pendant trois heures (Bekkara et al., 1998). Les extraits obtenus sont filtrés sous vide et les différents filtrats sont concentrés à sec par évaporation. Les extraits aqueux des feuilles (EAF) et des racines (EAR) obtenus sont conservés à 4°C.

II.3. Screening des métabolites secondaires

II.3.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été testés en utilisant 0,5ml de HCl (1%) ajouté à 1,5 ml de chaque extrait puis on ajoute 3 gouttes du réactif de Wagner (annexe 01). Un précipité crème indique la présence des alcaloïdes (Maria John et al., 2015).

II.3.2. Les terpénoïdes

2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à 5ml de chaque extrait. La formation d'un anneau marron-rouge indique la présence des terpénoïdes (Khan et al., 2011).

II.3.3. Les tanins

A 1ml de chaque extrait est ajouté 200µl de FeCl₃ (1%). La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noire (Karumi et al., 2004).

II.3.4. Les flavonoïdes

Réaction à la cyanidine.

1ml de chaque extrait est ajouté à 100µl de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition de la couleur rouge ou orange (Karumi et al., 2004).

II.3.5. Les saponosides

10ml de chaque extrait est agité pendant 15 secondes dans un tube à essai puis laissé au repos pendant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieur à 1cm indique la présence de saponosides (N' Guessan et al, 2009).

II.3.6. Les stérols et triterpènes

Réaction de Lieberman-Burchardt

5ml de chaque extrait est évaporé. Le résidu est dissout dans 1ml d'anhydride acétique et 0,5ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert indique leur présence (Edeoga et al, 2005).

II.3.7. Polyphénols

Deux millilitres de chaque extrait est mélangé avec quelques gouttes d'une solution à 2% de FeCl₃. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée est le signe de la présence de polyphénols (Bidie et al., 2011).

II.4. Dosage quantitatif des métabolites secondaires

II.4.1. Détermination de la teneur en phénols totaux dans les extraits

Le taux des phénols totaux des feuilles et des racines ont été déterminé selon la méthode décrite par (Qusti et al., 2010). 0.2 ml de chaque extrait dilué ou de l'acide gallique (standard) a été mélangé avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10^{ème} avec de l'eau distillée) et 0.8 ml de Na₂CO₃ à 7.5 %. Après 30 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 765 nm. La courbe standard a été réalisée en utilisant une gamme de concentrations d'acide gallique allant de 0 à 100 mg/L. les taux de polyphénols ont été exprimés en milligrammes équivalent acide gallique par gramme de résidu sec.

II.4.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes dans les extraits

La méthode colorimétrique de chlorure d'aluminium est utilisée pour la détermination des flavonoïdes (Zhishen et al., 1999). 0.5 ml de chaque extrait dilué avec 1.5 ml d'eau distillée est mélangé avec 0.3 ml de NaNO₂ à 5 % . 3 ml de AlCl₃ 10% sont ajoutés 5 min plus tard. Après 6 min, 1 ml de NaOH à 4 % est additionné. La solution est bien mélangée et l'absorbance est mesurée à 510 nm. La catéchine est utilisée comme standard pour la courbe d'étalonnage. Les teneurs en flavonoïdes totaux sont exprimées en mg équivalent catéchine/g de résidu sec.

II.4.3. Détermination des tanins condensés dans les extraits

0.1-0.5 ml des extraits sont mis dans des tubes puis 3 ml de vanilline 4% (p /v) dans du méthanol sont ajoutés. Après agitation vigoureuse on ajoute immédiatement 1.5 ml d'HCl concentré puis on agite de nouveau. L'absorbance est mesurée à 500 nm après 20 min d'incubation (Julkunen-

Titto, 1985). La courbe d'étalonnage est préparée dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme standard et les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine/g de résidu sec.

II.5. Evaluation de l'activité antioxydante

II.5.1. Piégeage du radical, 2-diphényl-1- picrylhydrazyl (DPPH)

Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune le diphényl-picrylhydrazine (Figure 17) dont l'intensité de couleur est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante dans le milieu réactionnel (Sanchez-Moreno., 2002) .

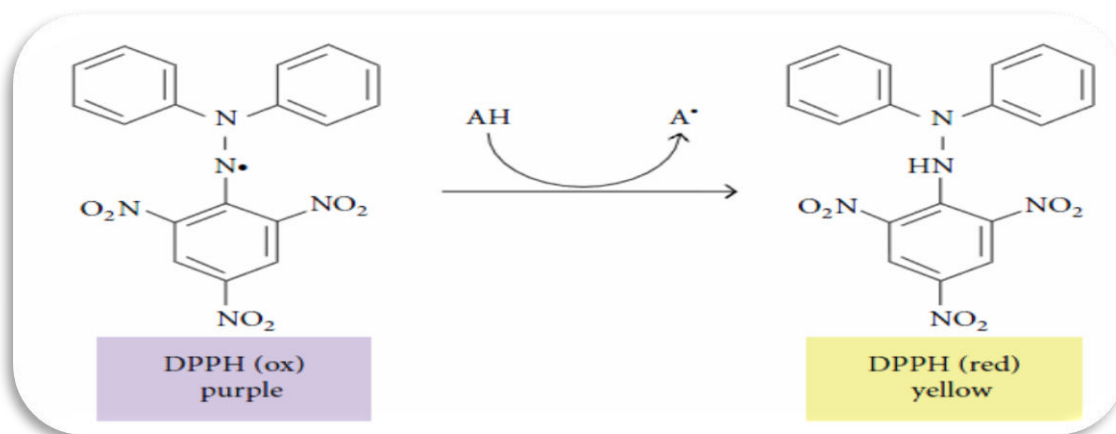


Figure 17 : Principe de piégeage du radical DPPH (Teixeira et al., 2013).

L'activité de piégeage des radicaux libres des feuilles et des racines de *S. argentea* est déterminée selon Benhammou et al., 2009 avec une légère modification. Une solution méthanolique (50 μ l) de chaque extrait à différentes concentrations est ajoutée à 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH à 25 mg/l. L'absorbance est mesurée à 515 nm après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à 37°C. Le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé selon l'équation suivante:

$$PI\% = [Abs\ contrôle - Abs\ extrait] / Abs\ contrôle \times 100$$

II.5.2. Le pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP)

La méthode FRAP est basée sur la réaction de réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) par un antioxydant, la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) à la couleur bleue-vert du fer ferreux (Fe^{2+}). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Chung et al.; 2002).

En d'autre terme, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination «semi quantitative» des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox (Amarowicz et al., 2004).

Pour le test de FRAP, nous avons adopté la technique de Oyaizu et al., 1986 qui consiste à prélever 0,5 ml de chaque extrait à différentes concentrations et les mélanger avec 1.25 ml d'une solution tampon phosphate à 0,2M (pH= 6,6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. 1,25 ml du surnageant sont ajoutés à 1,25 ml d'eau distillée et 250 μl d'une solution de chlorure de fer (FeCl_3) à 0,1%. La lecture des absorbances se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 700nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

III. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'émergence de microorganismes pathogènes, pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant. En effet, la résistance des germes aux antibiotiques rend quelquefois le traitement thérapeutique inefficace et impose la recherche de nouveaux agents antimicrobiens. Le recours aux plantes médicinales constitue alors une des plus intéressantes pistes à explorer (Benkherara et al., 2011).

Ceci nous a mené à évaluer l'activité antimicrobienne des extraits des deux parties (feuilles et racines) de *S. argentea* en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide (Bolou et al., 2011 ; Celiktaş et al., 2007). Les souches microbiennes retenues pour cette étude sont responsables d'infections (Tableau 04) et comportent sept souches bactériennes (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Bordetella bronchiseptica* ATCC 9617 , *Escherichia coli* ATCC 8739 , *Micrococcus luteus* ATCC 10240 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 , *Salmonella abony* ATCC 9027) et une souche de levure (*Candida albicans* ATCC 10231) issues toutes du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques d'Alger.

III.1. Préparation des extraits

Quatre extraits ont été testés dans cette partie, EMF, EMR, EAF, EAR.

Les méthodes d'extraction sont présentées précédemment et les solutions des extraits sont préparées dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO).

L'activité antimicrobienne a été effectuée avec trois concentrations pour chaque extrait (1g/5ml, 1g/10ml, 1g/20ml).

III.2. Préparation des suspensions bactériennes

Les colonies qui ont été bien isolées à partir des cultures jeunes sur milieu gélose nutritive incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures sont transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile (0,9% NaCl), afin de préparer des suspensions ayant une turbidité équivalente au standard McFarland 0.5 (annexe.02) ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (D.O = 0.08 à 0.1 / $\lambda = 625\text{nm}$) et $1-5 \times 10^6$ UFC/ml pour la levure *C. albicans* (D.O = 0.12 à 0.15 / $\lambda = 530 \text{ nm}$) (NCCLS, 2001) et ce en ajoutant soit de la suspension bactérienne si le milieu est trop clair soit de l'eau physiologique s'il est trop opaque. L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

Tableau.04 : Caractéristiques des souches microbiennes testées

Souche	N° ATCC	Gram	Famille	Principales infections causées
<i>Salmonella abony</i>	9027	-	<u>Enterobacteriaceae</u>	- Intoxications alimentaires.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	<i>Pseudomonadaceae</i>	- Voies aériennes inférieures - Septicémie. - Crampes abdominales. - Troubles digestifs.
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	9617	-	<u>Alcaligenaceae</u>	- Voies respiratoires.
<i>Escherichia coli</i>	8739	-	<i>Enterobacteriaceae</i>	- Infections nosocomiales. - Gastro-entérite. - Infections respiratoires.
<i>Micrococcus luteus</i>	10240	+	<i>Micrococcaceae</i>	Infections occasionnelles : - Pneumonie, infections des voies urinaires.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	<i>Micrococcaceae</i>	- Gastro-entérite. - Infections urinaires. - L'ostéomyélite et l'arthrite.
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	+	<u>Bacillaceae</u>	- Intoxications alimentaires spontanément résolutive (24-48 heures).
<i>Candida albicans</i>	10231	/	<u>Cryptococcaceae</u>	- Candidoses superficielles. - Infections œsophagiennes. - Infections génitales.

III.3. Mise en test

La suspension a été coulée sur gélose Mueller Hinton (MH) pour les souches bactériennes et sur milieu Sabouraud pour la levure, les tests ont été répétés 3 fois.

Les disques stériles imprégnés à l'aide d'une pince stérile dans des concentrations croissantes d'extraits repris avec le DMSO à raison de 10 µl par disque (2mg, 1mg et 0,5mg par disque), ont été déposés sur la surface du milieu approprié. Chaque boîte a reçu 6 disques déposés avec une identification apposée sur la face inférieure de la boîte. Les boîtes ont été laissées à température ambiante pendant une demi-heure puis l'ensemble est incubé 24 h pour les espèces bactériennes et 48 h pour la levure.

➤ Lecture des résultats

Après l'incubation, l'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition des zones ou des halos clairs autour des disques si l'extrait inhibe la croissance microbienne. Le résultat de cette activité est exprimé par la mesure du diamètre des zones d'inhibition. Il existe un seuil de diamètre de 10 mm.

IV. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits de *S. argentea*

L'étude *in vivo* a été effectuée conformément aux lignes directrices actuelles pour les soins des animaux de laboratoire et les directives éthiques pour l'enquête de la douleur expérimentale chez des animaux conscients (Zimmermann, 1983).

IV.1. Animaux

Vingt quatre rats Wistar mâles pesant 160 - 210 g ont été utilisés lors de l'étude *in vivo*. Ces animaux (Figure 18) ont été fournis par l'Institut Pasteur (Alger - Algérie). Les animaux ont été randomisés par groupe de six rats par cage en polypropylène où ils ont accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux ont bénéficié d'une période d'adaptation de 7 jours avant l'expérimentation. L'aliment standard sous forme de bâtonnets nous a été fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'Alger. Il est composé de maïs, de tourteaux de soja, d'issus de meunerie et d'un complexe minéralo-vitaminique. La composition chimique est de 55% de glucides, 18% de protéines brutes, 3,4% de matière grasse brute, 3% de cellulose brute, 4,9% de cendre brute, 14% d'humidité et 1,7% vitamines.



Figure 18 : Les rats Wistar en cage.

La température de l'animalerie est comprise entre 20 et 25 °C et une photopériode (12h de lumière /12h d'obscurité). La litière (sciure) est renouvelée trois fois par semaine pour garantir aux rats une bonne hygiène.

IV.2. Œdème de la patte induit par la carragénine chez les rats Wistar

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en mesurant l'œdème induit par la carragénine selon la technique inspirée de celles décrites par (Winter et al., 1962 ; Adeyemi et al., 2002).

Les rats répartis en 4 lots de 6 ont été mis à jeun pendant 16 heures avant l'expérimentation.

Pour les deux lots de rats essai, ont été traités par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale par les extraits méthanolique des feuilles et des racines de *S. argentea* à 400 mg/kg (après concentration à l'évaporateur rotatif, le résidu est repris dans l'eau distillée) . Le lot de référence a reçu le Diclofenac à la dose de 5 mg/kg tandis que le lot témoin n'a reçu qu'une solution de NaCl 9 % (Figure 19).

Selon le protocole de Machholz et al., 2012, pour une injection dans la veine caudale, il faut retenir l'animal dans un dispositif de retenue ou decapicone plastique.

Tenir la queue de l'animal par la pointe avec la main non dominante.

Désinfecter la queue avec l'éthanol peut permettre une meilleure visualisation de la veine.

Approche de la queue de l'aiguille à un angle de 15-20 °. Commencer à la partie distale de la queue.

Injecter la solution. Une injection de succès se traduira par le blanchiment de la veine de la queue pendant la durée de l'injection



Figure 19 : Conditions de l'injection intraveineuse.

Trente minutes après, l'inflammation chimique a été provoquée par l'injection de 0,1 ml de carragénine à 1% dans une solution saline isotonique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat (Figure 20).



Figure 20 : Injection de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte du rat.

IV.3. Mesures des œdèmes

L'activité anti-inflammatoire des extraits de *S. argentea* et son évolution, ont été estimées par l'enregistrement du diamètre de l'œdème de la patte injectée en utilisant un pied à coulisse, initialement à temps 0 (V_0), 3 et 6 heures après l'injection de la carragénine (V_t) (Figure 21). Les

résultats ont été exprimés en pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème (PI), selon la formule suivante (Bouriche et al, 2016):

$$\% \text{ PI} = \frac{[(V_t - V_0) \text{ témoin} - (V_t - V_0) \text{ traité}]}{(V_t - V_0) \text{ témoin}} \times 100$$

- V_0 : représente le volume de la patte à $T=0$ (avant injection de la carragénine).
- V_t : représente le volume de la patte à trois heures et six heures

Une réduction du volume de l'œdème par rapport au lot témoin a été considérée comme effet anti-inflammatoire des extraits testés.



Figure 21 : Mesure de l'œdème.

IV.4. Sacrifice et prélèvement du sang

Après 6 heures d'expérimentation, les rats sont anesthésiés au chloroforme puis sont sacrifiés, le sang total est récupéré par ponction au niveau l'aorte abdominale (Figure 22) dans des tubes EDTA pour analyses hématologiques et tubes secs pour les analyses immunochimiques. Ce type de prélèvement est adopté pour la possibilité de collecter du sang stérile et la capacité à réaliser une exsanguination complète (Weiss et al., 2000 ; Kraus. 1980).



Figure 22 : prélèvement sanguin à partir de l'aorte abdominal du rat.

IV.5. Analyse des marqueurs de l'inflammation

❖ C-Protéine Réactive (CRP)

La Protéine C-Réactive (CRP) est un pentamère cyclique de 115 kDa (Van Herck et al., 1998). La protéine C-réactive était la première protéine à phase aiguë à être reconnue (Pepys, 1981). La protéine positive de la phase aiguë (CRP) exerce de nombreuses fonctions biologiques dont l'élimination des tissus endommagés, la régulation de la réponse inflammatoire, l'activation du complément, le contrôle de la phagocytose et la production de cytokines anti-inflammatoires (Fablet et Madec, 2009 ; Mold et al., 2002 ; Zouki et al., 1997).

❖ Albumine

L'albumine est une protéine, représentant environ 60 % des protéines plasmatiques. Elle est synthétisée et sécrétée principalement par les hépatocytes et fait partie des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. L'albumine est une protéine négative e la phase aiguë non glycosylée de 583 acides aminés avec un poids moléculaire de 66.4 kDa (Nakajou et al., 2003). Elle contrôle la pression osmotique, module l'inflammation et influence les dommages liés au stress oxydatif (Tamion, 2010).

❖ Numération Formule Sanguine (NFS)

Par définition la NFS ou l'hémogramme est l'étude cytologique quantitative et qualitative du sang circulant. Il s'agit donc d'un diagramme sanguin qui analyse le nombre, la proportion, la morphologie et les variations des éléments figurés du sang (Scipioni et al., 1997 ; Wright et al., 1983). Il comprend les numérations absolues érythrocytaire, leucocytaire et plaquettaire.

Ces paramètres ont été mesurés par des Méthodes immunoturbidimétrique quantitative et spectrophotométriques réalisées au niveau d'un Laboratoire d'analyses privé, en utilisant un analyseur automate d'hématologie (mindray BC-3000 Plus Auto Hematology Analyzer) et un analyseur de biochimie (mindray BS-200).

Le protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire est illustré par la **Figure 23**.

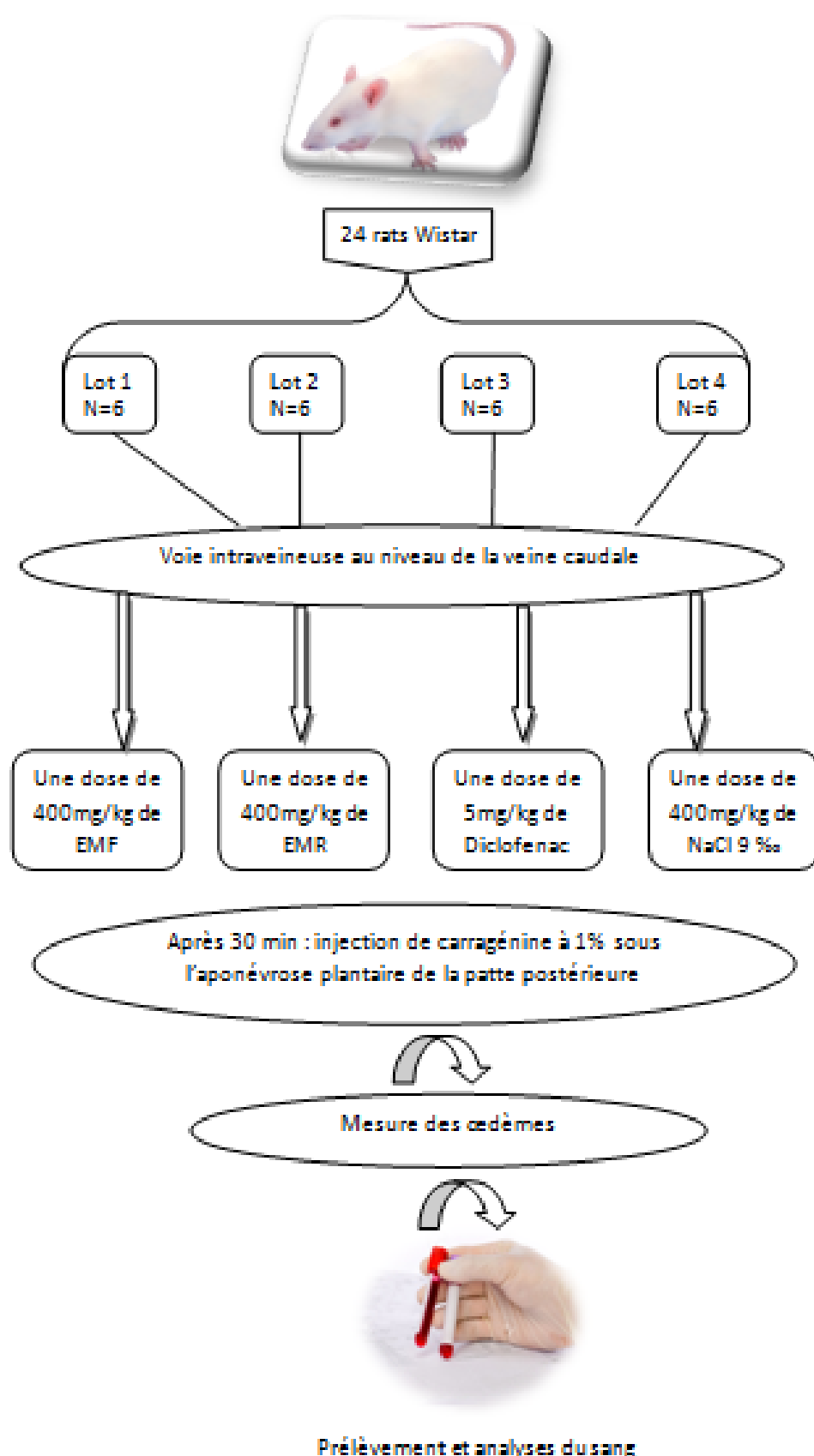


Figure 23 : Protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire.

Analyse statistique

Toutes les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (V8.0.725.0) avec une analyse ANOVA suivi du test Tukey. La signification statistique a été fixée à $p < 0,05$.

CHAPITRE III : ***Résultats & discussion***

III.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique

III.1.1. Connaissance de la sauge argentée

L'enquête réalisée a permis d'interroger 100 personnes, réparties en 59 femmes et 41 hommes. Cette enquête indique que la plante n'est pas connue par toute la population. Selon un sondage effectué à Sidi Bel-Abbès les résultats obtenus montrent que les femmes sont plus informées sur l'utilisation thérapeutique de la sauge argentée que les hommes avec respectivement 67,80 % et 51,22% (Figure 24).

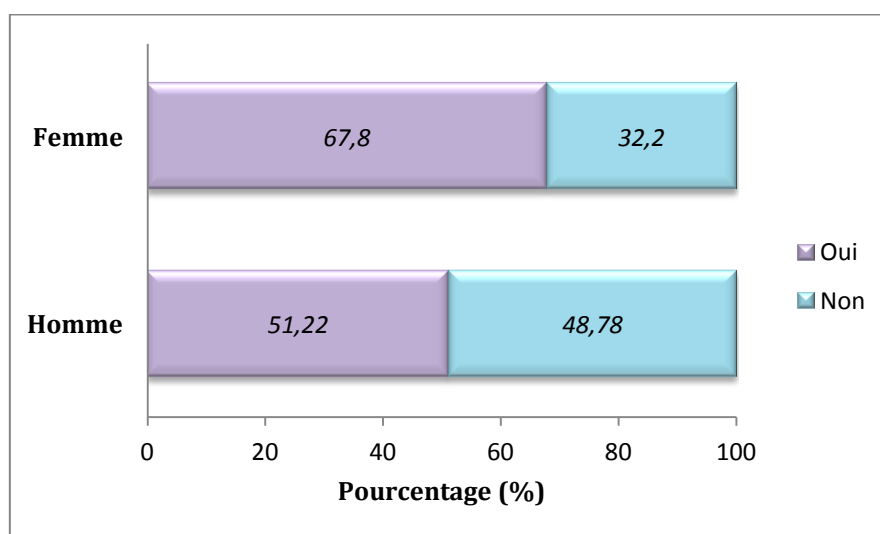


Figure 24 : Pourcentage de connaissance de la sauge argentée par la population enquêtée.

III.1.2. Parties utilisées

Les principes actifs (métabolites secondaires) peuvent être situés dans différentes parties des plantes médicinales (feuilles, fleurs, racines, graines ...). Dans la wilaya de Sidi Bel Abbès, les feuilles restent la partie la plus utilisée de la plante étudiée avec un taux de 65,57 %, suivie par l'utilisation combinée de feuilles et de racines avec 31,15 % puis un pourcentage de 3,28 % pour l'utilisation des racines (Figure 25).

La prédominance de l'utilisation d'un organe par rapport à un autre dans le domaine thérapeutique découle de sa concentration en principes actifs. Les feuilles sont les plus utilisées car elles sont en même temps un siège des réactions photochimiques et un réservoir de matières organiques qui en dérivent (Babba Aissa, 1999). Elles fournissent la majorité des alcaloïdes, hétérosides et huiles essentielles.

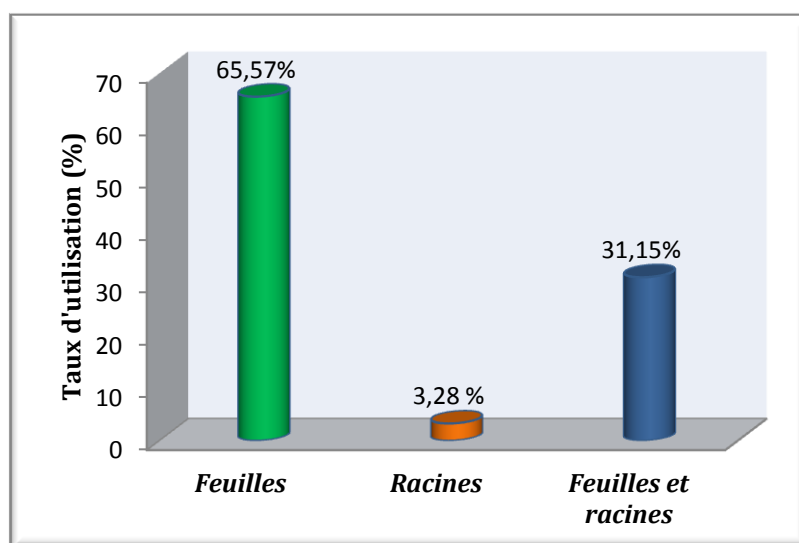


Figure 25 : Taux d'utilisation par la population des différentes parties de la plante.

III.1.3. Maladies traitées par la plante

Plusieurs milliers de plantes sont utilisés de par le monde. Leur champ d'action est vaste et leur puissance varie. La plupart ont des effets spécifiques sur certaines parties de l'organisme et sont reconnues pour pouvoir traiter divers cas (Iserin, 2001). Ces plantes peuvent être utilisées seules ou en association (Hachi et al., 2015).

L'analyse ethnobotanique nous a permis de déterminer également les maladies traitées par cette sauge et la manière traditionnelle de son utilisation. D'après la Figure 26, ce sont les affections des voies respiratoires (l'allergie, le rhume, la toux, les bronchites, infection pulmonaire et l'asthme) qui sont les plus traitées avec la sauge argentée, avec un pourcentage de 85,24 %, suivies des problèmes digestifs (6,56 %), ensuite viennent, le traitement des blessures et les douleurs rhumatismales respectivement à des taux de 4,92 % et 3,28 %.

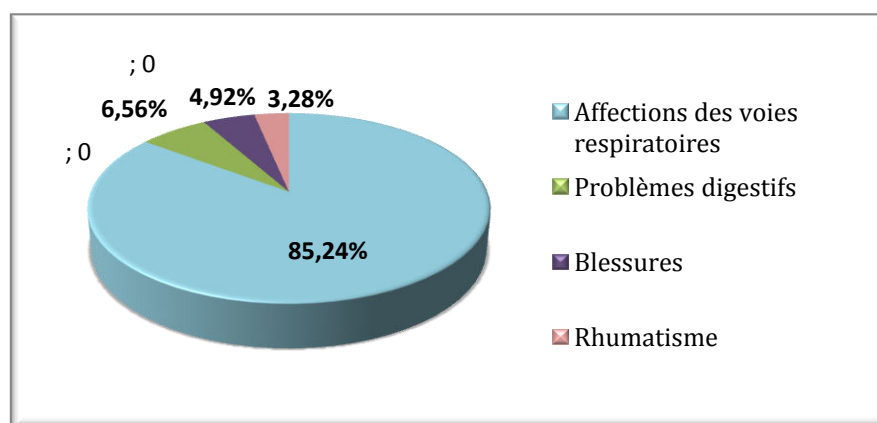


Figure 26 : Répartition des maladies traitées par la sauge argentée (*S. argentea*).

III.1.4. Mode d'utilisation

L'administration des remèdes se fait soit par voie interne (infusion, décoction...) soit par voie externe (cataplasme, emplâtre...) en fonction de la nature chimique des principes. Il en résulte qu'une plante peut avoir un usage interne et externe (El Chaar, 2005).

Selon la Figure 27, la poudre est la forme d'emploi la plus utilisée avec un pourcentage de 49,18 %, suivie de la forme en tisane avec 44,26 %. L'emploi sous forme de cataplasme n'est représenté que par 6,56%.

La plupart des préparations effectuées par les personnes interrogées recommandent un nettoyage puis un séchage préalable de l'organe utilisé de la plante. Les préparations à base de poudre de feuilles ou bien la combinaison de feuille et de racine, sont souvent utilisées avec du miel, du lait ou tout simplement saupoudrée dans l'alimentation.

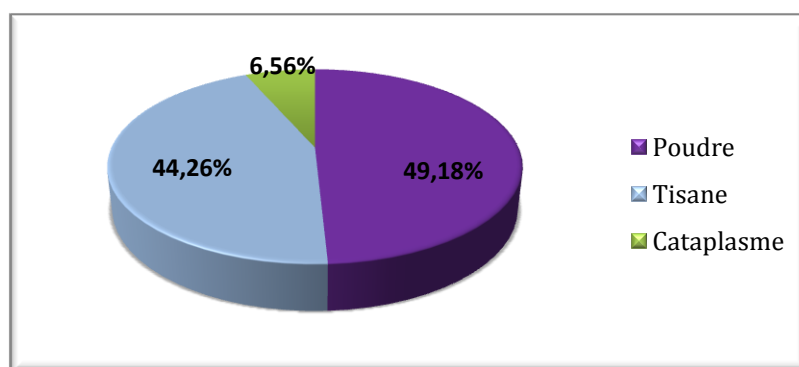


Figure 27 : Mode de préparation de la sauge argentée.

III.2. Détermination des métabolites primaires

Les résultats des métabolites primaires sont représentés dans la Figure 28. Les teneurs en eau exprimées en pourcentage dans les deux parties séchées (feuilles et racines) de *S. argentea* sont de $8,63\% \pm 0,16$ pour les racines et $9,50\% \pm 0,01$ pour les feuilles. Selon Paris et Moyse, (1965), pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10%. La Saugue étudiée renferme un taux plus important en cendres au niveau des feuilles par rapport aux racines avec respectivement des valeurs de $14,68\% \pm 0,10$ et $9,03\% \pm 0,04$. Pour la matière grasse, les valeurs sont relativement faibles et à l'inverse de la teneur en cendres, les racines présentent un taux plus élevé ($3,94\% \pm 0,05$) que les feuilles ($2,92 \pm 0,11$). La teneur en sucres observée est de $4,13\% \pm 0,04$ dans les feuilles et seulement $0,15\% \pm 0,12$ au niveau des racines. Le taux de protéines déterminé au niveau des feuilles est environ deux fois plus élevé que celui des racines avec respectivement des valeurs de $10,73\% \pm 0,18$ et $5,23 \pm 0,32$.

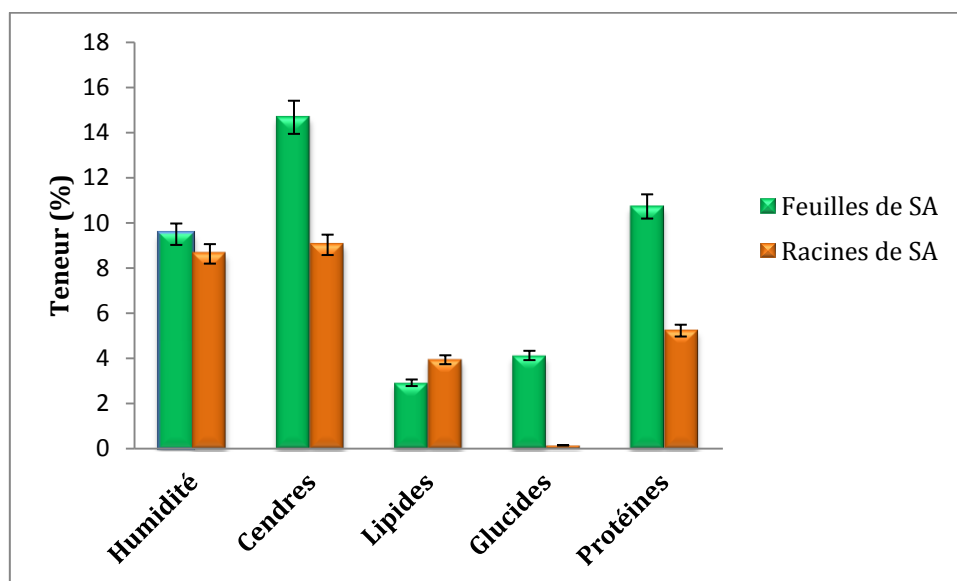


Figure 28 : Teneurs en métabolites primaires des feuilles et des racines de *S. argentea*
(Les valeurs sont sous forme de moyennes $\pm$ Ecart-types avec $P < 0,05$ considérée comme significative)

III.3. Rendement

Le rendement d'extraction se réfère au pourcentage d'extrait brut obtenu à partir d'un échantillon de plante séché par une procédure d'extraction en utilisant des solvants pour un isolement et une utilisation supplémentaires (Figure 29).

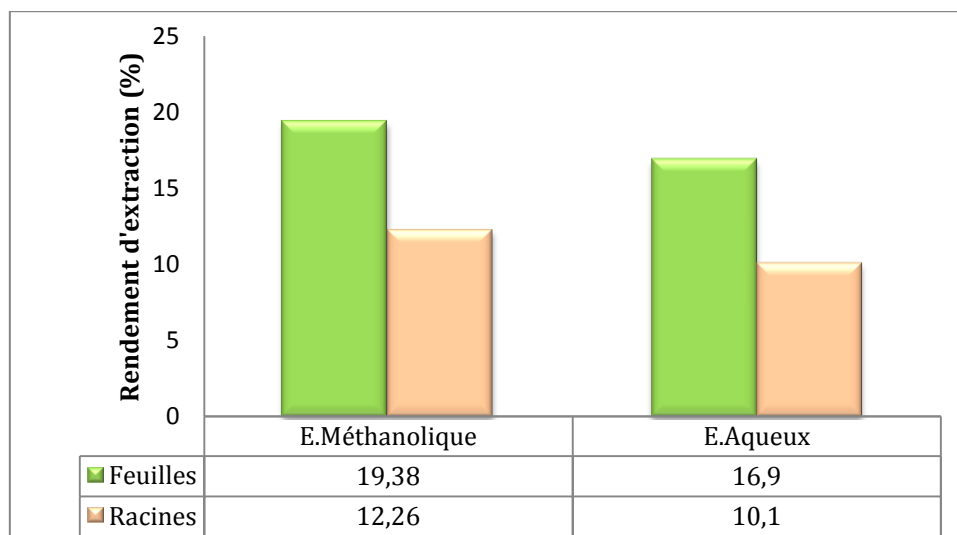


Figure 29 : Rendements des extraits de *S. argentea*.

Les rendements constatés dépendent à la fois de l'organe de la plante et aussi du solvant utilisé. On remarque que l'extraction par macération sous agitation avec le méthanol donne toujours un rendement plus élevé quelque soit l'organe utilisé.

Les extraits méthanoliques de feuilles et de racines de *Salvia argentea* ont été préparés dans le présent travail par macération de la poudre de chaque organe dans le mélange méthanol/eau. L'utilisation de ce mélange hydroalcoolique a pour objectif d'extraire les composés polaires ainsi que les composés de moyenne et de faible polarité. L'aptitude du méthanol d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires facilite l'extraction d'un plus grand nombre de composés. L'utilisation du méthanol permet également de prévenir la croissance microbienne au cours de la macération (Seidel, 2005). De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Les extraits aqueux ont été préparés selon la méthode de chauffage à reflux. Cependant, l'utilisation des poudres au lieu des organes entiers est effectuée dans le but de permettre une extraction plus efficace.

Selon Jones et Kinghon, (2006), l'eau n'est pas le solvant idéal pour plusieurs constituants bioactifs des plantes. Elle permet d'extraire préférentiellement les composés polaires. A température élevée, l'eau peut aussi extraire quelques composés amphiphiles.

L'efficacité du méthanol en tant que solvant se rapporte à sa polarité intermédiaire, ce qui lui permet d'extraire des composés organiques de bas poids moléculaire possédant des groupes fonctionnels (Nguyen et al., 2015).

III.4. Screening phytochimique des extraits des feuilles et des racines de *Salvia argentea*

L'examen préliminaire phytochimique a montré que les parties ciblées en l'occurrence les feuilles et les racines de *S. argentea*, renferment des polyphénols, des flavonoïdes, des saponosides, des tanins ainsi que des stérols et triterpènes dans les deux extraits méthanolique et aqueux hormis les alcaloïdes qui ne sont pas détectés dans EMF et EMR comme indiqué dans le Tableau 05.

Tableau 05 : Screening phytochimique des différents extraits des feuilles et racines de *S. argentea*

Constituants	EMF	EMR	EAF	EAR
Polyphénols	+++	+++	+++	+++
Flavonoïdes	+++	++	+++	++
Tanins	+	++	+	++
Saponosides	+	+	+++	+
Terpénoïdes	++	+	+++	+++
Alcaloïdes	-	-	+	++
Stérols et triterpènes	+	++	+	+

EMF : extrait méthanolique feuille ; EMR : extrait méthanolique racine ; EAF : extrait aqueux feuille ; EAR : extrait aqueux racine.

Dans des études antérieures, Les polyphénols jouent de nombreux rôles, comme celui de la protection contre les agressions biotiques et abiotiques, de l'activité antifongique (Kanwal et al., 2010), antivirale (Ono et al., 1990), anti-oxydante (Rahmat, 2012 ; Amessis-Ouchemoukh et al., 2014) et anti-inflammatoire (Hiemann et al., 1998). Les flavonoïdes jouent aussi un rôle important dans la coloration des végétaux et protection des plantes contre le stress (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1968). La présence des alcaloïdes peut expliquer des activités biologiques diverses (Milcent et Chau, 2003). Quant aux terpènes, ils servent comme des additifs dans les industries alimentaires et cosmétiques (Tsao et Coats, 1995) et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques: antimicrobienne, insecticide, anti-carcinogénique, anti-inflammatoire (Murakami et al., 2004), anesthésique, antihistaminique et diurétique (Velickovic et al., 2003 ; Hsiou et al., 2000).

Il est connu que les différentes parties des plantes contiennent des concentrations différentes de constituants actifs et différentes concentrations phytochimiques (Bruneton, 1999). Les flavonoïdes, les triterpénoïdes et les monoterpènes se retrouvent dans les parties aériennes des plantes de *Salvia* en particulier les fleurs et les feuilles, alors que les diterpénoïdes et les acides phénoliques se trouvent principalement dans les racines (Topçu, 2006).

III.5. Détermination des métabolites secondaires

III.5.1. Teneurs en polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, exprimé en équivalent acide gallique des feuilles et des racines de *S. argentea* a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu (Qusti et al., 2010), en

utilisant comme standard l'acide gallique (annexe 03). Les quantités de polyphénols totaux des extraits des feuilles et des racines de *S. argentea* sont regroupées dans le **Tableau 06**.

La quantité de polyphénols totaux est plus élevée dans l'extrait méthanolique des feuilles (EMF) avec $87,13 \pm 0,32$ mg EAG/g comparée à celle de la partie souterraine (EMR) $55,64 \pm 0,35$ mg EAG/g ($p < 0,05$). Ces taux sont aussi supérieurs à ceux obtenus en milieu aqueux avec des teneurs respectivement de $71,80 \pm 0,79$ mg EAG/g et $48,20 \pm 0,79$ mg EAG/g pour les feuilles et les racines ($p < 0,05$).

Ces valeurs sont proches de celles obtenues par **Orhan et al. (2013)**, sur la partie aérienne de *S. argentea* originaire de la Turquie (84,14 mg EAG/g), tandis qu'une teneur de 118,14 mg EAG /g au niveau des racines a été obtenue.

Les travaux de **Ben Farhat et al, 2013a et 2013b** ont rapportés que les extraits méthanoliques et aqueux (distillation) de la partie aérienne de la même espèce poussant en Tunisie présentent des teneurs en composés phénoliques de 67,67- 72,02 mg EAG/g et 41,47- 48,90 mg EAG/g, largement inférieures à celles trouvées dans les extraits de notre espèce.

Une étude faite sur des extraits aqueux et méthanolique des parties aériennes de *S. argentea* de la Grèce, révèle des quantités importantes en polyphénols avec 205 mg EAG/g et 191 mg EAG/g respectivement (**Stagos et al., 2012**).

Selon **Lamien-Meda et al, 2010** les variations quantitatives des polyphénols peuvent être dues à divers facteurs, géographique, climatique, phase végétative, équipement génétique et autres. Ces facteurs peuvent influencer l'accumulation de composés phénoliques en synthétisant des quantités différentes et/ou types différents de composés phénoliques (**Shahidi et Nacz, 1995**). Selon **Lee et al., (2003)** la méthode d'extraction et celle de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux.

Les polyphénols sont considérés comme les principaux composés chimiques responsables de l'activité pharmacologique des espèces appartenant au genre *Salvia* (**Gonzalez-Burgos et al., 2011; McKay et Blumberg, 2006; Kamatou et al., 2008**).

III.5.2. Teneurs en flavonoïdes

Des dosages spectrophotométriques ont été effectués à partir des extraits bruts méthanoliques et aqueux des deux organes étudiés afin de déterminer la teneur en flavonoïdes.

Une courbe d'étalonnage (annexe 03) a été réalisée en utilisant une solution de catéchine à différentes concentrations mesurée à une longueur d'onde de 510 nm.

L'EMF et l'EAF sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs respectivement de $59,97 \pm 0,21$ mg EC/g et $44,16 \pm 0,60$ mg EC/g (Tableau 06). Cependant, l'EMR demeure important avec $31,22 \pm 0,49$ mg EC/g tandis que l'EAR n'est que de $18,12 \pm 0,54$ mg EC/g. Les flavonoïdes représentent environ 68% des polyphénols des feuilles avec une différence significative ($p < 0,05$).

Suite à une étude faite par Orhan et al., (2013), des concentrations moyennes de 74,30 mg EC/g et 19,84 mg EC/g ont été constatées respectivement sur les parties aérienne et souterraine de *S. argentea*.

Selon Marin et al., 2004 ; Nazemiyeh et al., 2006 et El-Ansari et al., 1991 le genre *Salvia* est riche en flavonoïdes. Ces derniers sont largement distribués chez les espèces de ce genre (Adzet et al., 1987; Ulubelen et al., 1990).

Tableau 06 : Teneurs en métabolites secondaires

Extraits	Polyphénols (mg EAG/g)	Flavonoïdes (mg EC/g)	Tanins (mg EC/g)
EMF	$87,13 \pm 0,32^a$	$59,97 \pm 0,21^a$	$3,70 \pm 0,09^a$
EMR	$55,64 \pm 0,35^b$	$31,22 \pm 0,49^b$	$5,58 \pm 0,13^b$
EAF	$71,80 \pm 0,79^c$	$44,16 \pm 0,60^c$	$4,01 \pm 0,16^c$
EAR	$48,20 \pm 0,79^d$	$18,12 \pm 0,54^d$	$5,83 \pm 0,09^{bd}$

EMF : Extrait méthanolique des feuilles de *S. argentea* ; EMR : Extrait méthanolique des racines de *S. argentea* ; EAF : Extrait aqueux des feuilles de *S. argentea* ; EAR : Extrait aqueux des racines de *S. argentea*. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ Ecart type.

^{a,b,c,d} Valeurs sont statistiquement significative, ($p < 0.05$).

III.5.3. Teneurs en tanins

Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 06. Les EAR et EMR renferment des quantités non négligeable en tanins, qui sont respectivement de $5,83 \pm 0,09$ et $5,58 \pm 0,13$ mg EC/g légèrement plus importantes que celles des EAF et EMF avec respectivement $4,01 \pm 0,16$ et $3,70 \pm 0,09$ mg EC/g ($P > 0,05$). Il n'existe pas d'études antérieures qui ont ciblé les tanins chez cette espèce. Les travaux faites par Mahmoudi et al., 2013, sur *Cynara scolymus* L montrent que la décoction est plus efficace pour l'extraction des tanins (3,05 mg EC/g en moyenne) que la macération (2,35 mg EC/g en moyenne). L'augmentation de la température favorise d'une part la diffusion et la solubilité des substances extraites et d'autre part la destruction de certaines substances fragiles (Jokić et al., 2010).

Enfin, la présence de composés phénoliques (flavonoïdes, tanins, autres composés phénoliques) dans différentes parties de *S. argentea*, indique que cette plante peut avoir une bonne capacité d'un produit antioxydant.

III.6. Activités biologiques

III.6.1. Activité antioxydante

III.6.1.1. Test au DPPH

Le radical DPPH est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité sous forme radicalaire et la simplicité de l'analyse (Bozin et al., 2008). Le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans la Figure 30.

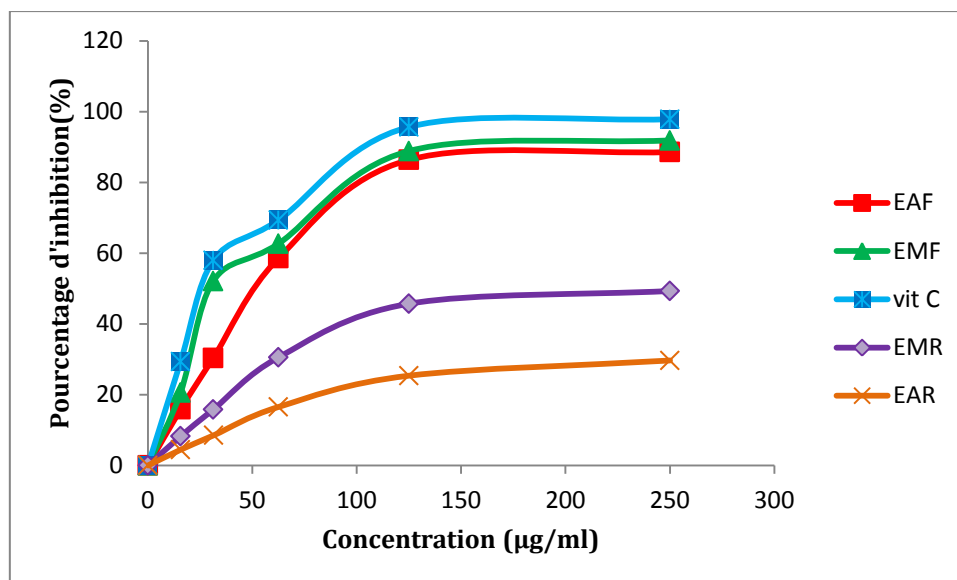


Figure 30 : Pouvoir anti radicalaire des extraits de *S. argentea*.

EMF : Extrait méthanolique des feuilles de *S. argentea* ; EMR : Extrait méthanolique des racines de *S. argentea* ; EAF : Extrait aqueux des feuilles de *S. argentea* ; EAR : Extrait aqueux des racines de *S. argentea* ; Vit C : Vitamine C.

Le taux de DPPH réduit par les différents antioxydants, mesuré à 517 nm montre que les plus fortes activités antiradicalaires concernent l'extrait méthanolique ($91,83\% \pm 0,74$) et aqueux ($88,59\% \pm 0,46$) des feuilles, tandis que les plus faibles activités ont été constatées respectivement pour l'extraits méthanolique ($49,29\% \pm 0,88$) et aqueux ($29,64\% \pm 0,41$) des racines pour une concentration de 250 µg/ml et en comparaison avec un antioxydant standard, la vitamine C dont la capacité antioxydante demeure la plus élevée.

Si on se réfère aux travaux de Orhan et al., (2013), les pourcentages d'inhibition des extraits éthanoliques des parties aériennes et des racines de *S. argentea* sont de 45,35% et 35,56%

respectivement à une concentration de 250 µg/ml et sont largement inférieurs à ceux obtenus dans notre étude.

Nos résultats révèlent que *S. argentea* possède une bonne activité anti-radicalaire particulièrement pour l'EMF qui présente une concentration d'inhibition médiane (IC₅₀) de 45,42 ± 0,46 µg/ml. Cette valeur est importante par rapport celles des autres extraits des feuilles et des racines mais en parallèle les IC₅₀ de tout les extraits testés sont inférieurs en comparaison avec la vitamine C (16,97 µg/ml) (Figure 31).

Selon Lafka et al., (2013), l'activité anti-radicalaire peut être affectée par les solvants de polarité différente. Aussi, la capacité antioxydante des polyphénols dépend surtout de la teneur en flavonoïdes (Fenglin et al., 2004).

Les extraits méthanolique des parties aériennes de *S. argentea* de deux régions de la Tunisie, révèlent des IC₅₀ de l'ordre de 33,85 µg/ml et 90,68 µg/ml (Ben Farhat et al, 2013a et 2013b).

L'étude de Stagos et al., (2012), montre des IC₅₀ de 27µg/ml et 36µg/ml respectivement pour les extraits aqueux et méthanolique de *S. argentea*, en revanche les extraits méthanolique analysés par Salah et al., 2006, indiquent un IC₅₀ de 374,4 µg/ml.

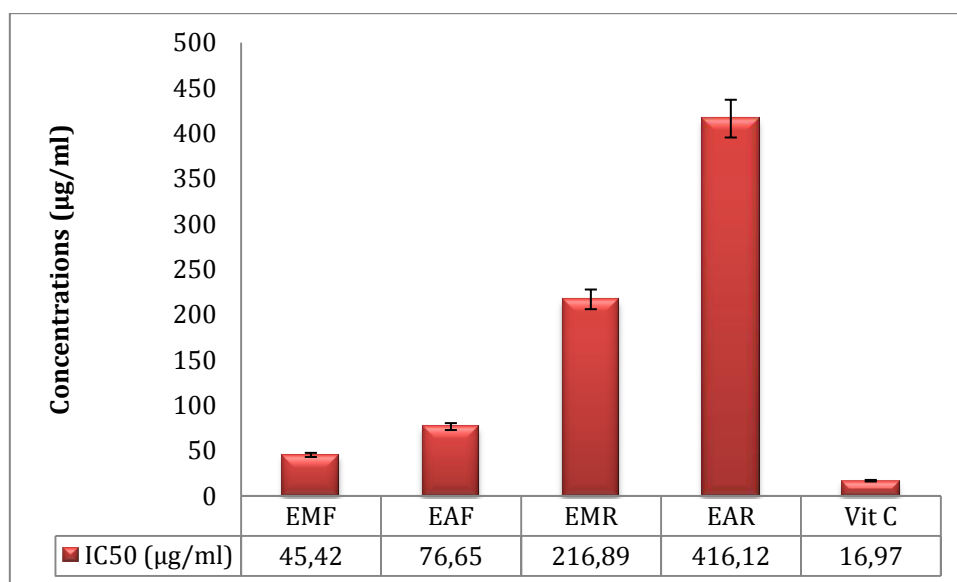


Figure 31 : Concentration d'inhibition médiane des extraits de feuilles et de racines de *S. argentea*.

Il est probable que les tanins et les flavonoïdes présents dans nos extraits de *Salvia* étudiés sont au moins en partie, responsables des activités de piégeage des radicaux libres.

L'activité antioxydante des différents extraits permet de les classer et de montrer l'efficacité du solvant à extraire le plus de principes actifs à caractère antioxydant comme suit :

EMF > EAF > EMR > EAR.

A la lumière de ces différents résultats, le contenu polyphénolique considérable et la teneur importante en flavonoïdes de *S. argentea* peuvent expliquer son activité élevée de piégeage des radicaux libres en raison de ses propriétés d'oxydoréduction (Rice-Evans et al., 1995).

III.6.1.2. Pouvoir de réduction du fer (FRAP)

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction du fer est une méthode facile et reproductible, très utilisée pour discerner les extraits les plus actifs (Li et al., 2007).

Pour tous les extraits, des dilutions en cascade allant de 1 à 0.0625 mg/ml, sont préparées et les pouvoirs réducteurs sont mesurés à 700 nm.

Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. D'après les résultats représentés dans la Figure 32, on constate une augmentation de l'absorbance correspondant à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits issus de *S. argentea*. La réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de l'absorbance et de la concentration (Ozturk et al., 2007 ; Su et al., 2008 ; Liu et al., 2009).

L'EMF présente une activité de réduction du fer plus élevée que celle de l'EAF avec des absorbances respectivement de $2,5 \pm 0,020$ et $1,87 \pm 0,025$ pour une concentration de 1mg/ml, ce qui traduit un pouvoir réducteur des feuilles plus élevé que celui des racines. Néanmoins, Tous les extraits de la plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celle de l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique qui présente une DO de 2,98 à la même concentration.

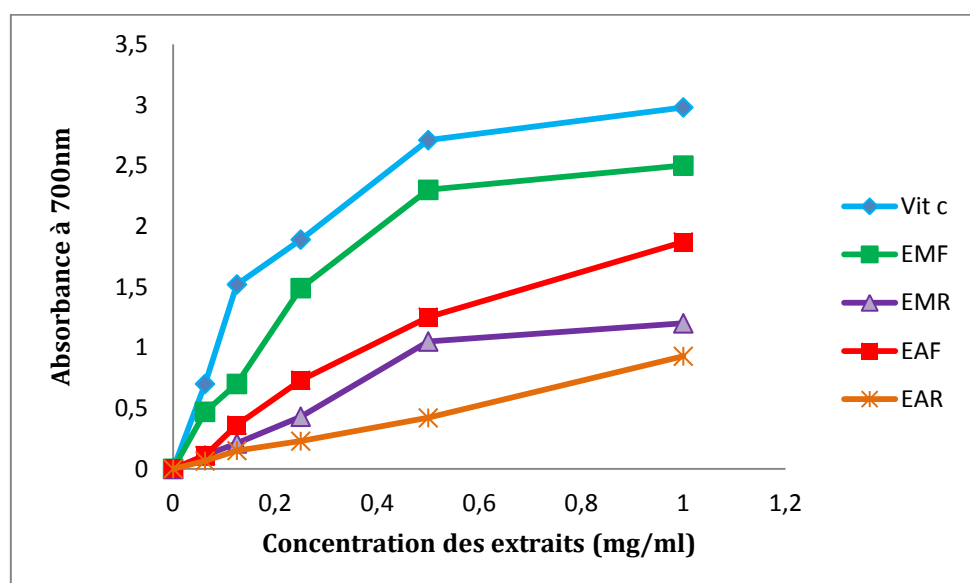


Figure 32 : Activité antiradicalaire des extraits méthanoliques et aqueux des feuilles et des racines de *S. argentea*

Dans une étude antérieure (Orhan et al., 2013), les extraits éthanoliques de *S. argentea* ont été testés et une activité antioxydante notable a été démontrée utilisant la méthode de FRAP.

Plusieurs propriétés biologiques ont été signalées pour cette espèce. En fait, une bonne activité antioxydante a été démontrée à partir des extraits aqueux et éthanoliques (Stagos et al., 2012) et de l'extrait méthanolique (Salah et al., 2006 ; Ben Farhat et al., 2013a, 2013b).

III.6.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *S. argentea*

Les produits antibactériens sont des molécules qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Ces produits peuvent être synthétisés (pharmaceutiques) ou naturels (végétale) (Hemaiswarya et al., 2008).

Cependant, peu d'études se sont concentrées sur la propriété antimicrobienne de *S. argentea*. A cet effet, nous avons étudié la sensibilité d'une gamme de sept souches bactériennes et une souche fongique vis-à-vis des extraits méthanoliques et aqueux issus des feuilles et racines de cette plante.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode des disques (Aromatogramme). Les mesures des diamètres des zones d'inhibition ont pour but de mettre en évidence l'action des extraits sur les souches microbiennes testées.

Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibition par les différents extraits sont regroupés dans le (Tableau 07) et la (Figure 33).

Tableau 07 : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de *S. argentea*.

		Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne ± écart-type) et sensibilité															
Extraits	Concentrations	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>B.branhiseptica</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>S.aureus</i>		<i>M.luteus</i>		<i>B.substilis</i>		<i>C.albicans</i>	
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
EMF	2mg / disque	21,5 ± 0,70	+	28,5 ± 2,12	+	16,5 ± 1,53	+	0	-	15 ± 1,41	+	29 ± 1,53	+	24 ± 0,78	+	10 ± 1,21	+
	1mg / disque	17 ± 1,41	+	14,5 ± 0,70	+	16,5 ± 0,70	+	0	-	14,5 ± 0,52	+	16 ± 2,12	+	18,5 ± 0,50	+	9 ± 0,70	±
	0,5mg / disque	12,5 ± 0,70	+	9,5 ± 0,70	±	14 ± 0,70	+	0	-	11 ± 1,41	+	7,5 ± 2,12	±	10,5 ± 0,70	+	7 ± 0,70	±
EAF	2mg / disque	13 ± 1,14	+	27 ± 2,28	+	0	-	0	-	17 ± 1,41	+	20,5 ± 0,70	+	17,5 ± 0,70	+	15 ± 1,41	+
	1mg / disque	9,5 ± 2,12	±	15 ± 1,41	+	0	-	0	-	8 ± 0,7	±	15,5 ± 2,12	+	10 ± 0,50	+	10 ± 0,70	+
	0,5mg / disque	0	-	7,5 ± 0,70	±	0	-	0	-	8 ± 0,70	±	10,5 ± 0,70	+	9,5 ± 0,70	±	7,5 ± 0,72	±
EMR	2mg / disque	12 ± 2,46	+	14 ± 1,41	+	16 ± 1,53	+	0	-	18 ± 1,41	+	19 ± 1,41	+	13 ± 2,18	+	8 ± 1,70	±
	1mg / disque	0	-	0	-	13 ± 1,70	+	0	-	13,5 ± 0,70	+	15 ± 0,70	+	12,5 ± 0,70	+	7,5 ± 1,41	±
	0,5mg / disque	0	-	0	-	12 ± 0,70	+	0	-	11,5 ± 1,41	+	12,5 ± 2,12	+	11,5 ± 0,70	+	7 ± 1,40	±
EAR	2mg / disque	10 ± 1,41	+	16 ± 2,28	+	0	-	0	-	12 ± 1,14	+	14 ± 2,12	+	9,5 ± 2,12	±	0	-
	1mg / disque	9 ± 1,52	±	0	-	0	-	0	-	0	-	13,5 ± 1,5	+	10,5 ± 0,72	+	0	-
	0,5mg / disque	9 ± 1,2	±	0	-	0	-	0	-	0	-	10 ± 1,5	+	10 ± 1,14	+	0	-

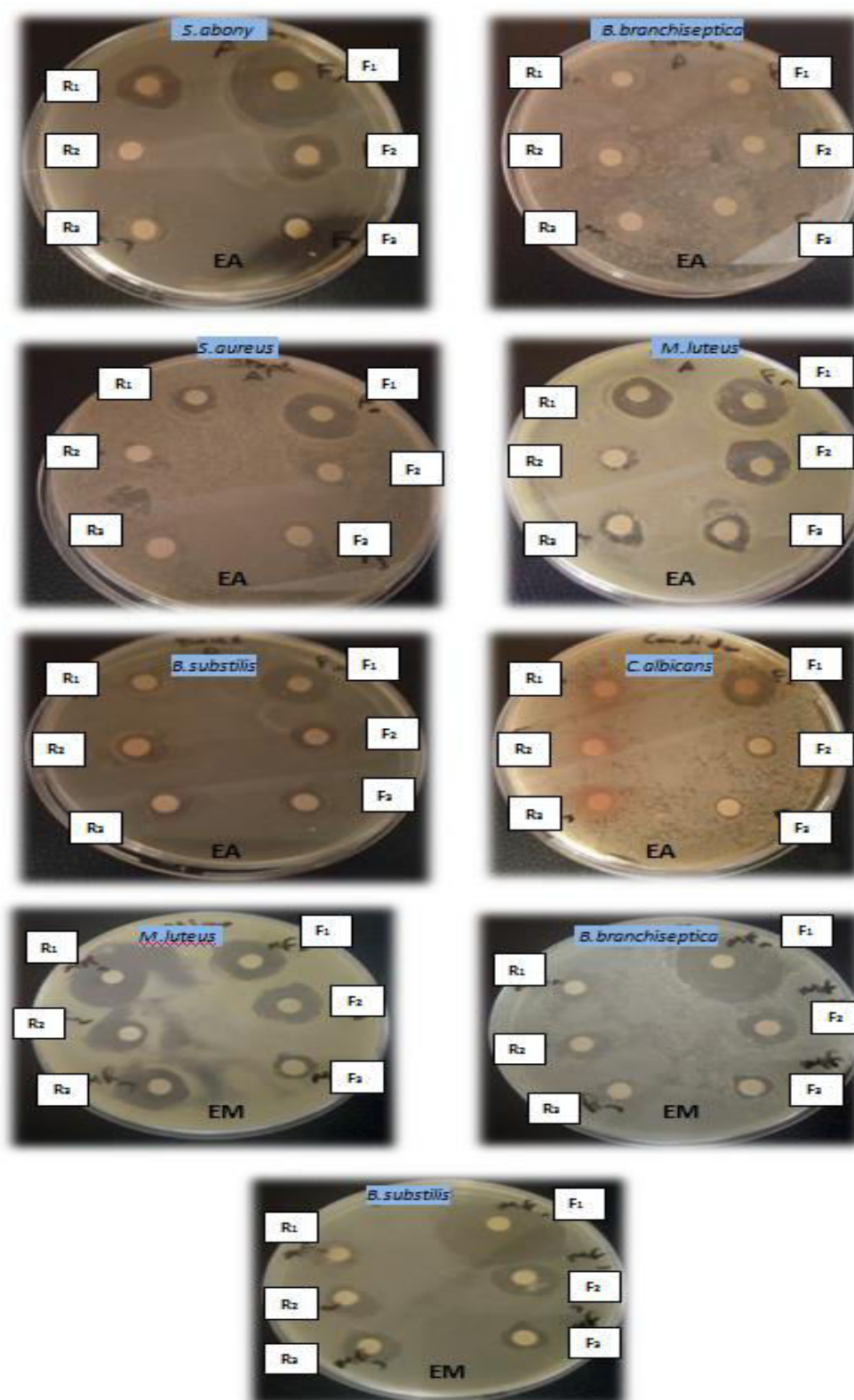


Figure 33 : Activité antimicrobienne de *Salvia argentea*.

EM : extrait méthanolique ; EA : extrait aqueux.

F₁ ; F₂ ; F₃ : Extrait de feuilles à 2mg/disque ; 1mg/disque ; 0,5mg/disque.

R₁ ; R₂ ; R₃ : Extrait de racines à 2mg/disque ; 1mg/disque ; 0,5mg/disque.

Les résultats obtenus montrent que l'effet antibactérien varie d'une souche à une autre et dépend aussi de l'échantillon testé.

L'EMF présente la zone d'inhibition la plus élevée avec $29 \pm 1,53$ mm vis-à-vis de *M. luteus*. Aussi, la concentration de 0,5mg/disque était suffisante pour inhiber la croissance d'*E. coli* avec un diamètre de $12 \pm 0,70$ mm. La souche *C. albicans* est sensible à l'EAF avec $15 \pm 1,41$ mm et moins sensible à l'EMF ($10 \pm 1,21$ mm). Des zones remarquables ont été enregistrées à partir de l'EAF sur les souches Gram+ et Gram- ainsi que *C. albicans* excepté *B. bronchiseptica* qui s'est montrée résistante. D'une façon générale les extraits les plus concentrés sont les plus actifs.

L'EMR s'avère exercer des effets beaucoup plus sur les souches Gram+ avec des zones d'inhibition de $19 \pm 1,41$ mm et $18 \pm 1,41$ mm vis-à-vis de *M. luteus* et *S. aureus* respectivement, suivi de *B. bronchiseptica* avec un diamètre de $16 \pm 1,53$ mm. Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés en utilisant l'antibiotique de référence l'Amikacine (30µg) et l'Erythromicine (15µg) dont les zone d'inhibitions sont respectivement de 27 mm et 45 mm.

En revanche on a observé que les souches *E. coli* et *S. abony* sont résistantes lorsque l'EMR est dilué.

Pour l'EAR, on constate la présence des zones d'inhibitions de diamètre allant de $9,5 \pm 2,12$ mm à $16 \pm 2,28$ vis-à-vis de *S. abony*, *M. luteus*, *S. aureus* *E. coli* et *B. subtilis* ; tandis que, *C. albicans* et *B. bronchiseptica* paraissent résistantes à toutes les concentrations.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* semble être résistante à tous les échantillons testés car aucune zone d'inhibition n'a été obtenue.

Selon Naucien, 2000, *P. aeruginosa* possède une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques.

Une observation générale dérivée de plusieurs études faite sur beaucoup d'autres espèces végétales, indique que la résistance est généralement plus élevée chez les bactéries Gram négatives que celles Gram positives (Nostro et al., 2000 ; Turkmen et al., 2007 ; Shan et al., 2007 ; Ouattara et al., 1997). Cela pourrait être attribué à la présence de leur membrane phospholipidique externe, pratiquement imperméable aux composés hydrophobes (Nikaido et Vaara, 1985 ; Longaray Delamare et al., 2007 ; Georgantel et al., 2007).

D'après les résultats de Sarac et Ugur, (2007), les extraits éthanoliques de la partie aérienne de *S. argentea* originaire de la Turquie, présentent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. Il est à noter qu'il n'y a que peu de travaux qui ont concerné l'activité antimicrobienne de *S. argentea*.

Cependant de nombreuses études ont porté sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du genre *Salvia*. Kabouche et al., 2005, ont rapporté que l'huile essentielle obtenue à partir de racines de *Salvia jaminiana* a une activité antibactérienne.

En outre, l'effet des terpènes sur la membrane bactérienne est attribué à leurs propriétés lipophiles et à la force de leurs groupes fonctionnels. Leur site d'action parait avoir lieu sur la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique cellulaire. Cette altération de la membrane perturbe la régulation osmotique. L' α -pinène, le β -pinène et le limonène inhibent l'activité respiratoire chez la mitochondrie de la levure (Tepe et al., 2005).

Catégorisation du potentiel antimicrobien des feuilles et des racines de *S. argentea*

Les Tableaux 09 et 10 et les Figures 34 et 35 illustrent les résultats de classification des extraits des feuilles et des racines selon leurs effets antibactérien et antifongique ainsi que la sensibilité des souches étudiées.

Tableau 09 : Catégorisation des extraits de feuilles de *S. argentea* selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités.

Type de test et de souches	Extraits	Résistant		Intermédiaire		Sensible		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Test Antibactérien	E.M	3	14,28%	2	9,52%	16	76,20%	21	100%
	E.A	7	33,33%	5	23,81%	9	42,86%	21	100%
Test Antifongique	E.M	0	0%	2	66,67%	1	33,33%	3	100%
	E.A	0	0%	1	33,33%	2	66,67%	3	100%
Bactéries	<i>E.coli</i>	1	16,66%	1	16,66%	4	66,68%	6	100%
	<i>S.abony</i>	0	0%	2	33,33%	4	66,67%	6	100%
	<i>B.bronchiseptica</i>	3	50,00%	0	0,00%	3	50,00%	6	100%
	<i>P.aeruginosa</i>	6	100%	0	0,00%	0	0,00%	6	100%
	<i>S.aureus</i>	0	0%	2	33,33%	4	66,67%	6	100%
	<i>M.luteus</i>	0	0%	1	16,66%	5	84,34%	6	100%
	<i>B.substilis</i>	0	0%	1	16,66%	5	84,34%	6	100%
Levure	<i>C.albicans</i>	0	0%	3	50%	3	50%	6	100%

Tableau 10 : Catégorisation des extraits de racines de *S. argentea* selon leurs effets antibactérien et antifongique et des souches microbiennes selon leurs sensibilités.

Type de test et de souches	Extraits	Résistant		Intermédiaire		Sensible		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Test Antibactérien	E.M	6	28,57%	0	0%	15	71,43%	21	100%
	E.A	10	47,62%	3	14,28%	8	38,10%	21	100%
Test Antifongique	E.M	0	0%	3	100%	0	0%	3	100%
	E.A	3	100%	0	0%	0	0%	3	100%
Bactéries	<i>E.coli</i>	1	16,67%	2	33,33%	3	50%	6	100%
	<i>S.abony</i>	4	66,67%	0	0%	2	33,33%	6	100%
	<i>B.bronchiseptica</i>	3	50%	0	00%	3	50%	6	100%
	<i>P.aeruginosa</i>	6	100%	0	0%	0	0%	6	100%
	<i>S.aureus</i>	2	33,33%	0	0%	4	66,67%	6	100%
	<i>M.luteus</i>	0	0%	0	0%	6	100%	6	100%
	<i>B.substilis</i>	0	0%	1	16,67%	5	84,33%	6	100%
Levure	<i>C.albicans</i>	3	50%	3	50%	0	0%	6	100%

Pour les feuilles de *S. argentea*, l'extrait méthanolique présente un pourcentage élevé de 76,20% des tests sensibles sur les bactéries suivi de l'extrait aqueux avec un effet modéré se traduisant par un taux de 42,86%. Par contre, l'extrait aqueux semble le plus actif sur la souche fongique avec un taux de 66,67%. En effet, *M. luteus* et *B. substilis* sont les souches bactériennes les plus sensibles avec des pourcentages de 84,34 % suivi de *S. aureus* (66,67 %) alors que *C. albicans* demeure sensible avec un taux de 50%.

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien des racines, le test de l'extrait méthanolique est intermédiaire en revanche on décèle une résistance remarquable de *C. albicans* vis-à-vis de l'extrait aqueux. La souche bactérienne *M. luteus* est la plus sensible avec un taux de 100 % alors que *P. aeruginosa* est la plus résistante.

Les travaux menés par Liu, (1995), ont rapportés que l'acide ursolique composant de *S. argentea*, joue un rôle dans l'activité antibactérienne.

Des composants volatils tels que le carvacrol et le thymol se désagrègent et vident la teneur cytoplasmique des hyphes fongiques (Soylu et al., 2006 ; Medjahed et al., 2016).

Les travaux de Cowan, (1999) ont montré que les tanins sont capables d'inhiber la croissance des hyphes de nombreux champignons; ces molécules sont utilisées comme agents antimicrobiens (Scalbert, 1991).

Les résultats obtenus par Alizadeh et Shaabani, (2012), montrent que l'huile essentielles de *S. officinalis* présente d'importantes propriétés antimicrobiennes contre deux micro-organismes testés : *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

Dans de nombreuses études, l'activité antibactérienne des extraits de solvant est généralement élevée comparée à celle des huiles essentielles (Lourens et al., 2004; Njenga et al., 2005; Van Vuuren et al., 2006).

Il faut souligner que les différences dans les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont la nature de l'espèce, l'origine géographique et la saison de cueillette (Sagdic et Ozcan, 2003 ; Moreira et al., 2005 ; Celik et al., 2007), l'organe de la plante testé (Natarajan et al., 2005), le solvant, le mode d'extraction ainsi que la concentration en principes actifs (Wagner, 1993 ; Thangara et al., 2000 ; Ulukanli et Akkaya, 2011) et aussi la nature des souches testées (Valero et Salmeron, 2003).

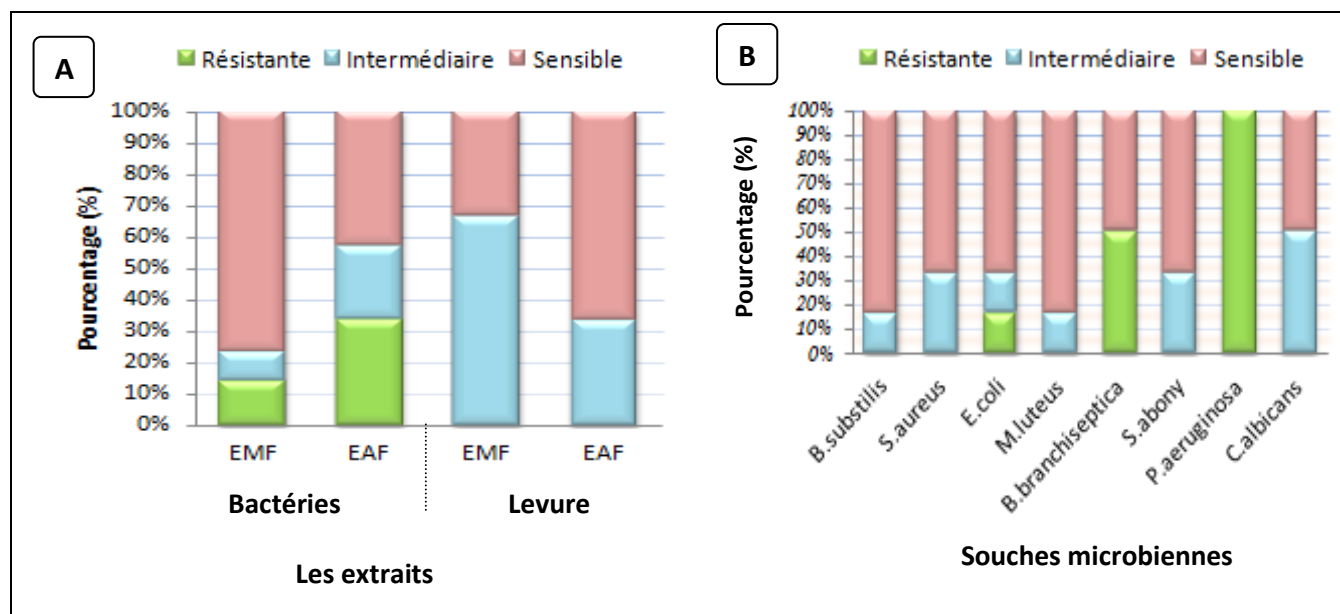


Figure 34: A Catégorisation des extraits de feuilles de *S. argentea* selon leurs effets antibactérien et antifongique et B sensibilités des souches microbiennes vis-à-vis de ces extraits.

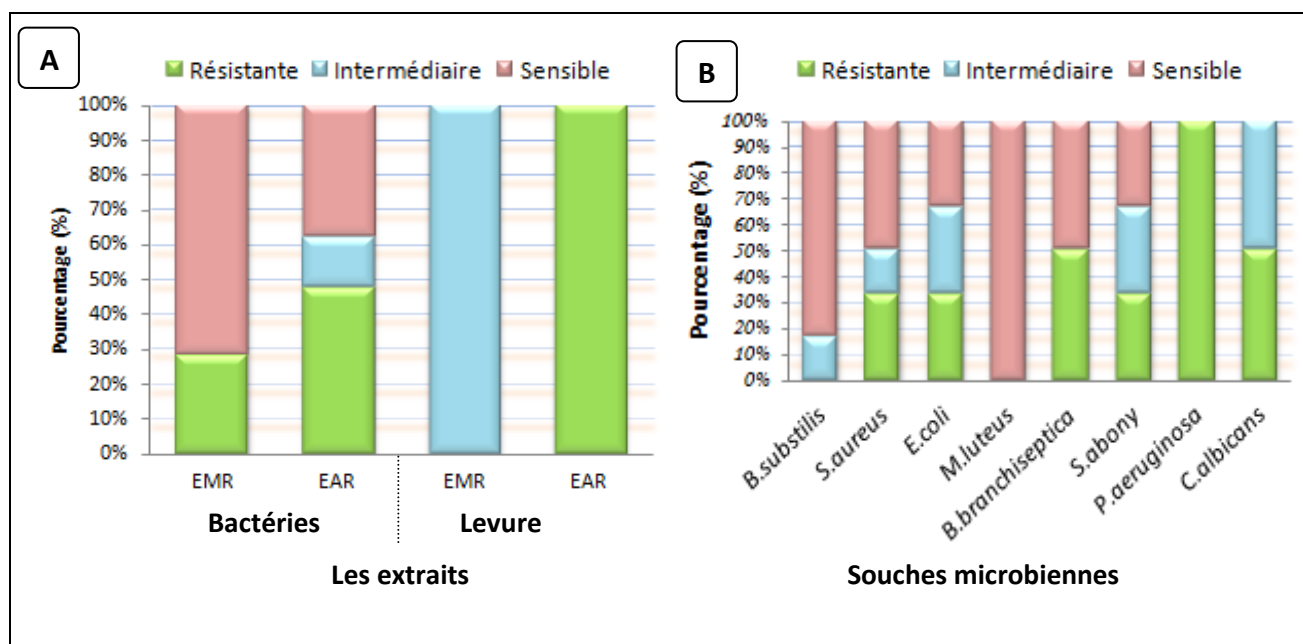


Figure 35: **A** Catégorisation des extraits de racines de *S. argentea* selon leurs effets antibactérien et antifongique et **B** sensibilités des souches microbiennes vis-à-vis de ces extraits.

III.6.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* de *S. argentea*

III.6.3.1. Mesure des œdèmes et des taux d'inhibition

Les anti-inflammatoires synthétiques sont souvent associés à plusieurs effets nocifs sur la santé humaine, tels que les ulcères gastro-intestinaux et les risques cardiovasculaires (Al-Saeed, 2011), les dommages au foie et la carcinogenèse (Gulcin et al., 2005). Les plantes médicinales peuvent offrir un traitement plus sûr et efficace pour les maladies inflammatoires et celles liées au stress oxydatif (Bouriche et al., 2016). Ces plantes représentent l'une des sources les plus importantes de substances à activité biologique ayant des applications dans l'ethnomédecine (Pavan-Fruehalf, 2000).

Dans la présente étude, nous avons démontré l'effet des EMF et EMR de *S. argentea* dans un modèle expérimental d'inflammation aiguë (l'œdème de la patte induit par la carragénine chez les rats Wistar). Le choix des extraits méthanoliques repose sur leur richesse en principes actifs par rapport aux extraits aqueux.

Pour démontrer l'effet de *S. argentea in vivo*, nous avons mesuré l'œdème inflammatoire de la patte postérieure gauche de chaque rat des quatre lots testés (Figure 36).

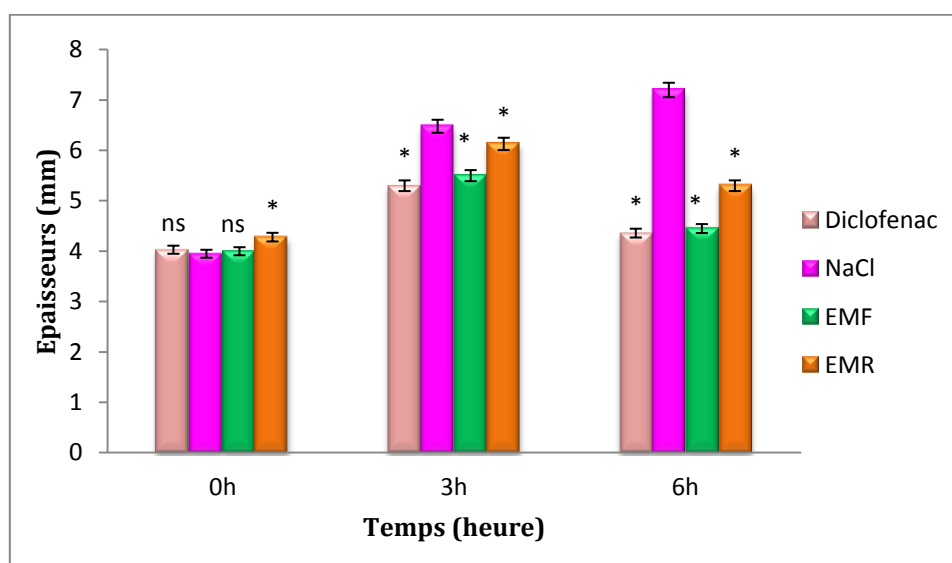


Figure 36 : Effet des EMF et EMR sur l'œdème induit par la carragénine chez les rats Wistar

Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ Ecart type (n=6).

ns : non significative ; * : $p < 0,05$ différence significative par rapport au témoin (NaCl).

Les rats du groupe témoin qui ne recevaient que la solution de carragénine sous l'aponévrose plantaire, développent après 6h un œdème maximal caractérisé par une épaisseur moyenne accrue ($7,2 \pm 0,24$ mm) après une épaisseur initiale de $3,95 \pm 0,29$ mm ($p < 0,01$). Le traitement avec 400 mg/kg d'EMF et d'EMR induit une réduction significative de l'inflammation par rapport au groupe de rats témoin négatif ($P < 0,05$).

Les lots de rats traités par injection intraveineuse de 400 mg/kg des extraits méthanoliques de feuilles et de racines de *S. argentea* ont montré une inhibition de l'œdème lors des deux phases de mesure (3h puis 6h) et particulièrement la dernière phase.

Dans le cas de l'EMF et avant l'injection de la carragénine l'épaisseur était de $4 \pm 0,08$ mm, après 3h on a enregistré un œdème avec une épaisseur de $5,5 \pm 0,49$ mm qui diminue à $4,45 \pm 0,24$ mm après 6h traduisant ainsi des pourcentages d'inhibition de 45,63% puis 75,75%, valeurs proches de celles obtenues avec le Diclofenac (59,13% puis 89,84%) utilisé comme agent anti-inflammatoire de référence (Figure 37). De même pour le lot traité avec l'EMR, des atténuations considérables de l'œdème ont été constatées avec des épaisseurs de $6,13 \pm 0,61$ mm et $5,3 \pm 0,32$ mm respectivement après 3h et 6h d'inflammation correspondant à 39,32% et 66,66% d'inhibition ($p < 0,05$).

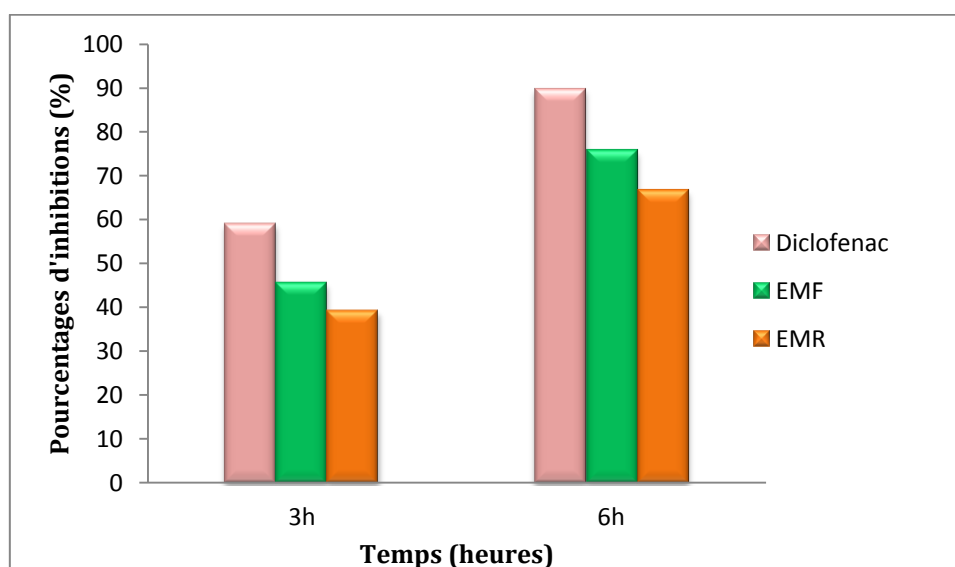


Figure 37 : Taux d'inhibitions des œdèmes.

Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SD, $p < 0,05$ est considéré significatif

L'EMF de *S. argentea* est plus efficace que l'EMR dans la prévention de l'œdème aigu de la patte de rat.

Aucune étude n'a concerné l'activité anti-inflammatoire de *S. argentea* mais nos résultats sont comparables aux travaux antérieurs réalisés sur d'autres espèces de la même famille (Takaki et al., 2008 ; Melo et al., 2011 ; Nogueira de Melo et al., 2012).

L'œdème induit par l'injection d'un agent irritant (la carragénine) au niveau de la patte de rat est l'examen le plus fréquemment adopté pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits de végétaux et des produits naturels (Ait El Cadi et al., 2012 ; Ouédraogo et al., 2012).

Le développement de l'œdème dans la patte du rat après l'injection de carragénine a été caractérisé comme processus biphasique (Vinegar et al., 1969 ; Wantana et al., 2009 ; DiRosa et al., 1971). Dont la phase initiale se produit dans 1h de l'administration de carragénine, est attribuée à la libération de l'histamine, la sérotonine à partir des mastocytes (Vinegar et al., 1987), suivi par une seconde phase de gonflement, qui est causée par une libération accrue de métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines, leucotriènes) dans la zone inflammatoire et la continuité entre les deux phases est fournie par les Kinines (Mandal et al., 2015).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent les enzymes de la cyclooxygénase (COX-2) impliquées dans la synthèse des prostaglandines (Seibert et al., 1994 ; Robinson, 1997 ; Kulkarni et al., 2000).

Sur la base de ces résultats, il est possible que l'effet inhibiteur des extraits méthanoliques de feuilles et de racines de *S. argentea* sur l'inflammation induite par la carragénine chez les rats, puisse être dû à l'inhibition de la cyclooxygénase conduisant à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines.

Il a été noté que le contenu phénolique dans les plantes médicinales est responsable de l'activité anti-inflammatoires de ces espèces, ce qui leur permet d'être utilisées comme agents chimiopréventifs potentiels (Sahu et Saxena, 2013). En outre, les composés terpéniques présents dans les herbes de la famille des Lamiaceae jouent un rôle primordial dans l'activité anti-inflammatoire (Alcaraz et Jiménez, 1988; Amabeoku et al., 2001; Bispo et al., 2001; Maleki et al., 2001).

D'après Gonzalez-Gallego et ses collaborateurs (2007), les flavonoïdes agissent aussi sur l'expression des molécules d'adhésion et des cytokines pro-inflammatoires par divers mécanismes incluant l'inhibition de la transcription du facteur nucléaire Kappa-B en inhibant les kinases impliquées dans la transduction du signal.

III.6.3.2. Variation des marqueurs de l'inflammation chez les rats Wistar

L'hémogramme est un diagramme sanguin qui analyse le nombre, la proportion, la morphologie et les variations des éléments figurés du sang (Scipioni et al., 1997 ; Wright et al., 1983). Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés au dénombrement des leucocytes, le critère le plus caractéristique d'une réaction inflammatoire ainsi que les plaquettes.

✓ Taux sérique en globules blancs

D'après les résultats illustrés par la Figure 38, on constate une augmentation remarquable des globules blancs (leucocytoses) chez les rats qui ont reçu la solution de NaCl (0,9%) par rapport au témoin sain (Ts) et il en est de même pour les lots traités avec le Diclofenac, l'EMF et l'EMR ($p < 0,05$).

Au moment de l'inflammation, l'activation des cellules leucocytaires (Aderem et Ulevitch, 2000) induit la sécrétion de plusieurs médiateurs pro-inflammatoire tels que le tumor necrosis factor alpha (TNF- α), l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6), (Nantel et al., 1999 ; Espinosa et al., 2006) et les prostaglandines (PGs) (Geronikaki et Gavalas, 2006).

Lors de la phase aiguë, la production de médiateurs vasoactifs induit une augmentation du flux vasculaire. La vasodilatation des vaisseaux au niveau local favorise l'extravasation des protéines plasmatiques dans le tissu. En parallèle, la production de cytokines sur le lieu de l'agression favorise la circulation des leucocytes du sang vers le tissu (Moser et al., 2004). Les

neutrophiles polymorphonucléaires (PNN) sont les premières cellules à gagner le site de l'infection par diapédèse (Segal, 2005).

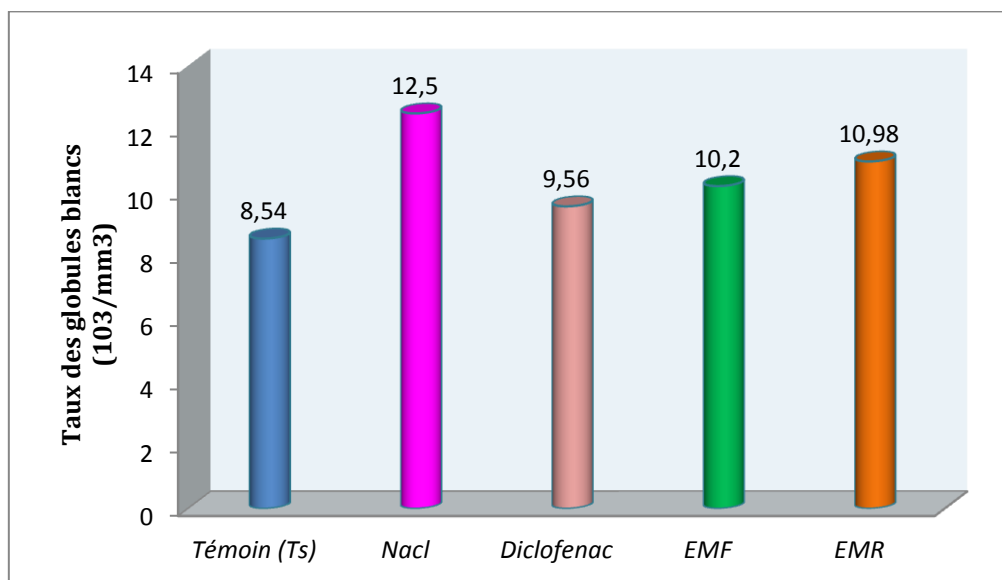


Figure 38 : Taux de globules blancs chez les rats Wistar

Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SD, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin négatif.

Cela signifie que l'injection du Diclofenac, EMF et EMR mène à un abaissement du taux de globules blancs dans le sang.

Cependant on a enregistré une diminution importante chez le lot traité avec les feuilles en comparant avec le lot traité avec les racines, on peut suggérer que la différence dans la composition en polyphénols et flavonoïdes dans les deux organes a fait l'objet de cette différence.

Les résultats de cette étude indiquent que l'extrait méthanolique des feuilles est légèrement plus efficace que celui des racines.

En effet, le dépistage phytochimique a montré que les deux organes étudiés sont riches en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins. Ces composés sont de bons inhibiteurs de la sérotonine, de l'histamine et de la migration des leucocytes (Middleton et al., 2000).

Les flavonoïdes ont été révélés avoir une activité anti-inflammatoire dans les phases d'inflammation proliférative et exsudative et ils inhibent l'histamine, la cytokine, la prostaglandine et la libération de leucotriènes (Park et al., 2008 ; Rathee et al., 2009).

✓ Taux de plaquettes (thrombocytes)

Les thrombocytes sont de petits éléments du sang, en forme de disque anucléés, issus des mégacaryocytes. Ils sont de taille très variable dans le sang circulant mais toujours comprise entre 1 et 4 μm et leur volume est d'environ 5 fl (Groner et al., 1986). Leur couleur est mauve avec quelques granules azurophiles plus roses. Leur rôle étant principalement d'assurer la fonction d'agrégation plaquettaire dans la coagulation sanguine (Fujimori et al., 1998 ; Bailly et Duprat, 1990).

D'après la Figure 39, il apparaît une augmentation importante du taux des thrombocytes (thrombocytose) dans le sang chez les rats qui ont reçu la solution de NaCl comparés à tous les autres lots expérimentaux. Cela montre que le traitement des rats par le Diclofenac et les extraits méthanoliques de feuilles et de racines de *S. argentea* donne des taux de plaquettes semblables à celui du lot témoin sain. Le résultat du lot traité avec l'EMF semblent plus proche à celui du lot traité avec le Diclofenac par rapport à celui du lot traité avec l'EMR.

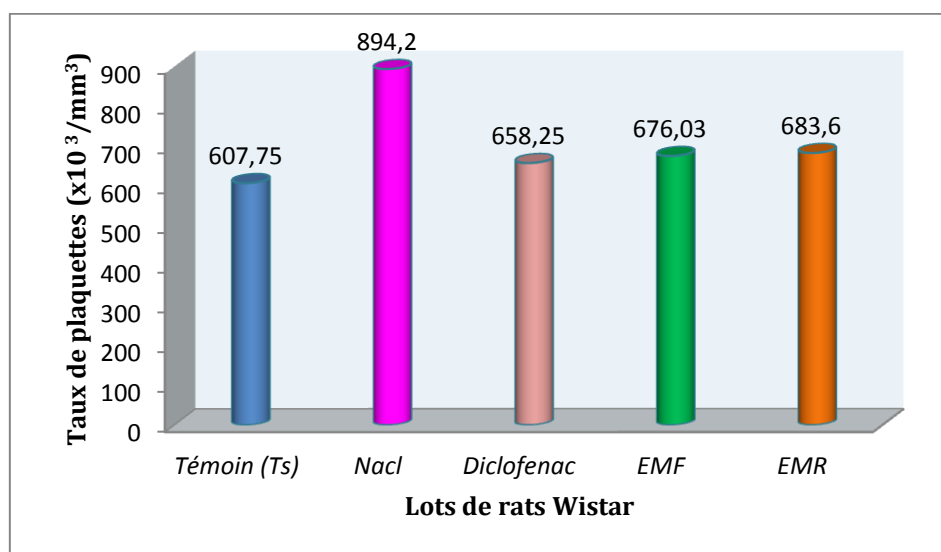


Figure 39 : Taux de plaquettes chez les rats Wistar.

Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SD, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin négatif.

Il a été bien établi que les plaquettes de diverses espèces présentent des sensibilités différentes lorsqu'elles sont exposées *in vitro* à une dose unique d'un agoniste faible tel que la sérotonine, l'épinéphrine ou l'acide arachidonique (Dodds, 1978 ; Meyers et Wardrop, 1991, Pelagalli et al., 2002).

Selon Esmon, (2005), les médiateurs inflammatoires peuvent augmenter la production de plaquettes.

Les interactions plaquettes-cellules endothéliales et leucocytes-cellules endothéliales jouent un rôle déterminant au cours d'une réaction inflammatoire, notamment grâce à l'action des molécules d'adhérence qui existent sous forme soluble dans le plasma (Weill et Batteux, 2003).

✓ Concentration sérique en C-Réactive Protéine (CRP)

Les résultats du dosage de la C-Réactive Protéine sont représentés dans la Figure 40. On constate une concentration en CRP très élevée (772,6 mg/l) par rapport au témoin sain. Il en est de même pour les lots de référence, de l'EMF et de l'EMR. La comparaison entre la teneur sérique en CRP du lot traité par le Diclofenac et les lots traités par les extraits des deux organes étudiés révèle une différence négligeable. En revanche la comparaison est clairement significative avec le lot NaCl où la concentration en CRP est élevée ($P < 0,05$).

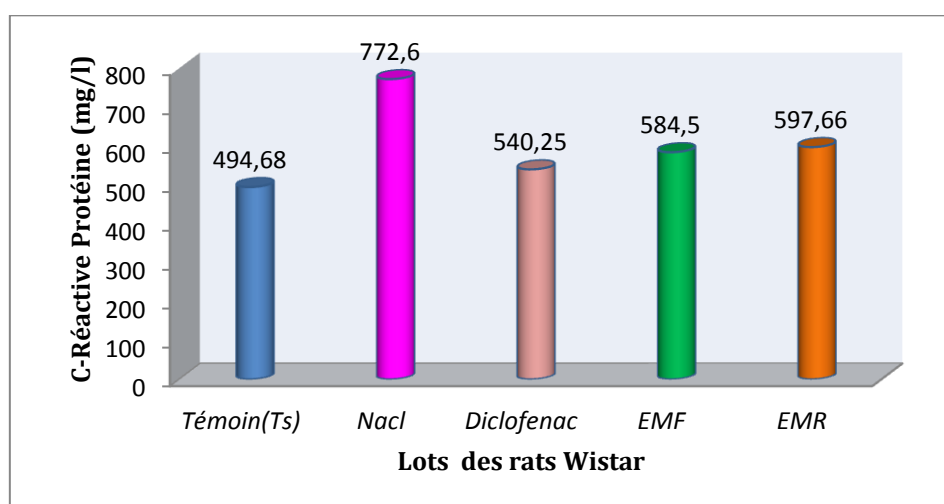


Figure 40 : Taux de la CRP chez les rats Wistar.

Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SD, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin négatif.

Dans toutes les espèces animales étudiées, une augmentation rapide de la concentration en CRP est notée dans les heures qui suivent une agression (Watanabe et al., 1992 ; Takiguchi et al., 1990 ; Eckersall et al., 1996 ; Burger et al., 1992).

En ce qui concerne la production de la CRP, le consensus général est que la production est principalement sous le contrôle de l'IL-6. Cependant, l'IL-1 et le TNF- α peuvent également contribuer à la synthèse hépatique et à la sécrétion de la CRP. Cette dernière a une demi-vie d'environ 19 heures (Yudkin et al., 2000 ; Jialal et al., 2004).

La liaison de la CRP à l'agent pathogène interagit également avec des récepteurs spécifiques sur les phagocytes, induit une production de cytokines anti-inflammatoires et module la fonction des neutrophiles.

✓ Concentration sérique en albumine

Les résultats obtenus (Figure 41) indiquent une baisse significative de la concentration sérique en albumine chez le groupe ayant reçu la solution de NaCl (0,9%) comparé aux autres groupes. Cependant, on note que les concentrations de nos extraits méthanoliques semblent proches de celles du groupe témoin sain et du groupe de référence qui a reçu le Diclofenac.

Selon Eissa et Zidan, (2009), une hypoalbuminémie est un désordre hépatique qui a pour conséquence la perturbation de la synthèse hépatique de l'albumine.

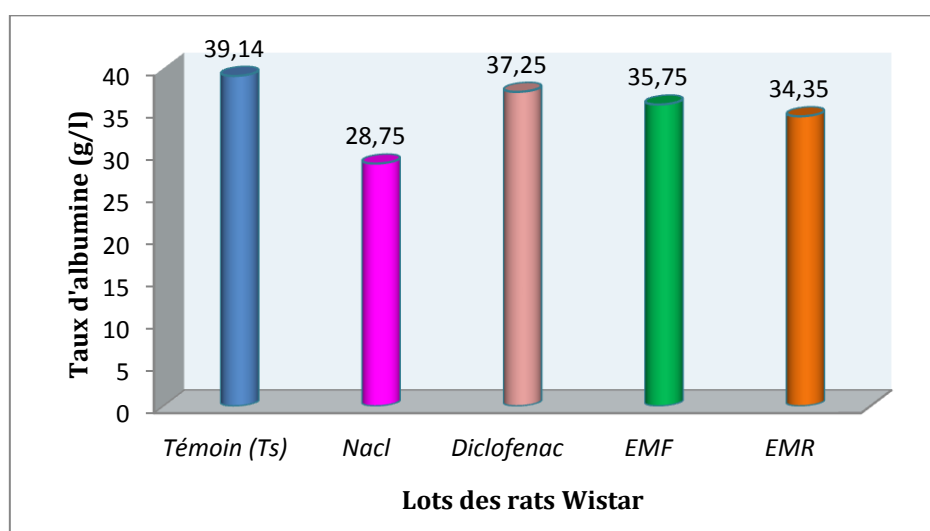


Figure 41 : Taux d'albumine chez les rats Wistar.

Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SD, $p < 0,05$ est considéré significatif par rapport au témoin négatif.

Au cours des états infectieux il existe précocement une hypoalbuminémie quantitative et qualitative dont la valeur pronostique a été largement démontrée (Tamion, 2010).

La sécrétion de l'albumine est stimulée par une chute de la pression osmotique (Evans, 2002) mais peut également être affectée par des changements physiopathologiques comme lors d'une maladie infectieuse ou inflammatoire, dans ces cas la sécrétion est réduite. Ceci est dû aux cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines (IL-1, IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α).

Les effets anti-inflammatoires observés pour les extraits méthanoliques de feuille et de racine de *S. argentea* peuvent être dus à la présence de composés antioxydants déjà caractérisés dans notre cas.

Des travaux réalisés sur *salvia officinalis* indiquent diverses utilisations comme le traitement des infections microbiennes, le cancer et l'inflammation (Kamatou et al., 2008 ; Al-Qudah et al., 2014). Cette sauge possède des caractéristiques permettant son utilisation comme agent anti-inflammatoire et antifongique (Abu-Darwish et al., 2013 ; Arranz et al., 2014).

Des études antérieures ont montré les effets anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des tanins, des flavonoïdes, des saponosides et des triterpènes/stéroïdes (Akindele et al., 2007 ; Bose et al., 2007). La présence de ces composés chimiques dans l'extrait des feuilles et l'extrait des racines pourrait être responsable des propriétés pharmacologiques observées.

Conclusion

Conclusion

L'exploitation du potentiel biologique des espèces végétales revêt un intérêt important. Les nouvelles démarches consistent à s'intéresser à la recherche des principes actifs dans les produits naturels d'origine végétale.

Le présent travail a pour but de contribuer à la connaissance de la composition en métabolites primaires, en principes actifs et des effets biologiques *in vitro* et *in vivo* de *Salvia argentea*, espèce de la flore méditerranéenne, spontanée et abondante dans l'ouest Algérien.

Pour ce faire, nous avons au préalable effectué une enquête ethnobotanique qui s'inscrit dans le cadre de la collecte d'informations sur le savoir thérapeutique ancestral dans la région de Sidi Bel Abbès. Cette enquête nous a permis d'évaluer le potentiel curatif de *Salvia argentea*. La plupart des tradipraticiens utilisent la poudre de feuilles dans le traitement des affections respiratoires.

S'agissant de l'étude comparative entre les deux parties foliaire et racinaire de la plante, nous avons montré que les feuilles contiennent des taux considérables en métabolites primaires comparées aux racines l'exception des lipides.

Le test de criblage phytochimique préliminaire des différentes familles de métabolites secondaires contenus dans les deux parties en question, a montré que *S. argentea*, renferme des polyphénols, des flavonoïdes, des saponosides, des tanins, des alcaloïdes, des stérols et des triterpènes.

D'autre part, les extraits méthanolique et aqueux des deux organes foliaire et racinaire ont été analysés quantitativement par spectrophotométrie pour leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins. Nous avons montré que les feuilles sont plus riches par rapport aux racines en utilisant la macération avec du méthanol, et en milieu aqueux hormis la teneur en tanins dans ce dernier milieu et pour les racines.

L'étude du pouvoir antioxydant *in vitro*, utilisant le radical DPPH et l'activité de réduction du fer par la méthode de FRAP, révèle que *S. argentea* possède de bonnes activités antioxydantes particulièrement pour l'extrait méthanolique des feuilles par rapport aux autres extraits de feuilles et de racines. Une concentration d'inhibition médiane (IC₅₀) de 45,42 ± 0,46 µg/ml a été enregistrée. Ces activités antioxydantes sont dépendantes du contenu en principes actifs.

L'activité antimicrobienne des extraits méthanolique et aqueux de feuilles et de racines de la sauge argentée vis-à-vis d'une gamme de sept bactéries pathogènes et une levure, est réalisée en appliquant la méthode de diffusion en milieu solide. Les résultats obtenus ont montré que les

extraits de la sauge argentée ont manifesté une activité inhibitrice contre cette large classe de souches pathogènes. Seule la souche *P. aeruginosa* a montré une résistance. L'inhibition de la croissance varie en fonction de la souche microbienne, de la nature et de la concentration de l'extrait testé et aussi de l'organe ciblé.

L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire a été réalisée en mesurant l'œdème induit par injection de la carragénine au niveau de la patte postérieure gauche des rats Wistar. Les résultats obtenus ont montré que les extraits méthanoliques de feuilles et de racines à 400mg/kg, sont capables de réduire significativement l'œdème de l'inflammation avec des pourcentages d'inhibition de 75,75% et 66,66% respectivement. Cet effet se traduit par une diminution du taux des leucocytes, des plaquettes, de la CRP et une augmentation de l'albumine en comparaison avec les résultats du lot recevant du NaCl à 0,9% comme seul traitement. Les effets de nos extraits sont comparables à ceux obtenus pour le lot de rats de référence traités avec le Diclofénac.

En définitive, on peut affirmer que les deux organes foliaire et racinaire de *S. argentea* possèdent des molécules bioactives douées de propriétés thérapeutiques telles qu'antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire.

A cet effet et dans les perspectives de ce projet, nous envisageons d'entamer une étude chimique en vue d'isoler les substances actives et d'élucider leurs structures chimiques responsables de l'effet anti-inflammatoire. Cette étude pourrait être approfondie par une étude pharmacologique qui nous aidera à cibler le niveau d'action des molécules actives.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

.. A ..

Abd-Elmageed M. A. M., Hussein B. A. (2008). Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Salvia officinalis* L. flowers. *Sudan JMS*, 3 : 127-130.

Abu-Darwish M.S., Cabral C., Ferreira I.V., Gonçalves M.J., Cavaleiro C., Cruz M. T., Al-bdour T.H., Salgueiro L. (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed Res. Int*, 1-9.

Achenbach H., Walbel R., Nkunya M.H.H., Weenen H. (1992). Antimalarial compounds from *Hoslundia opposita*. *Phytochemistry*, 31 : 3781-3784.

Adedapo A.A., Jimoh F.O., Koduru S., Masika P.J., Afolayan A.J. (2009). Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complement Altern. Med*, 9: 21.

Aderem A., Ulevitch R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406 : 782-787.

Adeyemi O.O., Okpo S.O., Oguni O.O. (2002). Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea Americana* Mill (Lawraceae). *Fitoterapia*, 73 : 375-80.

Adzet T., Canigueral S., Iglesias J. (1987). A chromatographic survey of polyphenols from *Salvia* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16 : 29-32.

Ait El Cadi M., Makram S., Ansar M., Khabbal Y., Alaoui K., Faouzi M.A., Cherrah Y., Taoufik J. (2012). Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 70 : 113-116.

Akindele A.J., Adeyemi O.O. (2007) Antipyretic activity of *Byrsocarpus coccineus* Schum and Thonn. *Internat J Pharmaocol*, 4 : 357-361.

Amessis-Ouchemoukh N., Abu-Reidah I.M., Quirantes-Piné R., Madani K., Segura-Carretero A. (2014). Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria, *Industrial Crops and Products*, 61 : 120-129.

Anderse.O.M., Markham K.R. (2006). Flavonoides chemistry, Biochemistry and Applications., CRC Press, Taylor & Francis. Boca Raton, Florida, USA Washington.

Alcaraz M.J., Jiménez M.J. (1988). Protective effects of hypolaetin-8-glucoside on the rat gastric mucosa, *Prog. Clin. Biol. Res*, 280 : 183-186.

Al-Saeed A. (2011). Gastrointestinal and cardiovascular risk of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Oman. Med. J*, 26 : 385-391.

Alizadeh A., Shaabani M. (2012). Essential oil composition, phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity in *Salvia officinalis* L. cultivated in Iran. *Advances in Environmental Biology*, 6(1) : 221-226.

Al-Qudah M.A., Al-Jaber H.I., Abu Zarga M.H., Abu Orabi S.T. (2014). Flavonoid and phenolic compounds from *Salvia palaestina* L. growing wild in Jordan and their antioxidant activities. *Phytochemistry*, 99 : 115-120.

Amabeoku G.J., Eagles P., Scott G., Mayeng I., Springfield E. (2001). Analgesic and antipyretic effects of *Dodonaea angustifolia* and *Salvia africana-lutea*. *J. Ethnopharmacol*, 75 : 117-124.

Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., et Weil J.A. (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84 : 551-562.

AOAC, (1990). Official methods of analyses. Washington DC: Association of Official Analytical Chemist.

Arranz, E.; Jaime, L.; Lopez de la Hazas, M. C.; Vicente, G.; Reglero, G.; Santoyo, S. (2014). Supercritical sage extracts as anti-inflammatory food ingredients. *Ind. Crops Prod*, 54 : 159-166.

Aşkun T., Başer K.H.C., Tümen G et al. (2010). Characterization of essential oils of some *Salvia* species and their antimycobacterial activities. *Turk J Biol*, 34: 89-95.

Audigie C., Figarella J., Zonszaain F. (1984). Manipulation d'analyse biochimique. Doin (Ed).Paris, 274.

Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem*, 2 : 15850-15855.

.. B ..

Baba-Aissa F. (2000) Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS Algérie.

Babba Aissa F. (1999). Flore d'Algérie et du Maghreb. Encyclopédie des plantes utiles. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Ed. Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alger, 368p.

- Babak Bahadori M., Valizadeh H., Asghari B., Dinparast L., Moridi Farimani M., Bahadori S.** (2015). Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *Journal of Functional Foods*, 18 : 727-736.
- Bahorun T.** (1997). Substances naturelles activités: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Ed. AMAS. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*; 83-94.
- Bailly Y., Duprat P.** (1990). Normal blood cell values, Rat. *Hemopoietic system*, Springer Verlag, 27-38.
- Bekkara F., Jay M., Viricel M.R.** (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation. *J Plant Soil*, 203: 27-36.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : antioxidant activity, occurrence, and potential use. *Food Chem*, 99 : 191-203.
- Banthorpe D.V., Bilyard H.J., Brown G.D.** (1989). Enol esters of caffeic acid in several genera of the Labiatae. *Phytochemistry*, 28: 2109-2113.
- Baricevic D., Sosa S., Della Loggia R et al.** (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: The relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol*, 75: 125-132.
- Beecher G.R.** (2003). Proceeding of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health : Role of Flavonoids in the Diet Overview OF dietary ; Flavonoids : Nomenclature, Occurrence and Intake. *Nutr. Rev*, 3 : 3248-3254.
- Belhattab R. , Larous L., Kalantzakis G., Boskou D. and Exarchou V.** (2004) Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts.. *J. food Agric .Environment*, 2(1):69-73.
- Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Ana Maria Gomez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutiérrez A., Lercker G.** (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils : a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Mol*, 12 : 1679-1719.
- Ben Farhat M., Landoulsi A., Chaouch-Hamada R., Sotomayor J.A., Jordan M.j.** (2013a). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49 : 904-914.
- Ben Farhat M., Landoulsi A., Chaouch-Hamada R., Sotomayor J.A., Jordan M.J.** (2013b). Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity. *Ind Crops Prod*, 47 : 106-112.

- Benghanou M.** (2012). La phytothérapie entre la confiance et mefiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, institut de formation paramédical Chettia, Alger, 56.
- Benhammou N., Bekkara F., Kadifkova Panovska T.** (2009). Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie*, 12 : 1259-1266.
- Benkherara S., Bordjiba O., Djahra A.B.** (2011). Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Sauge officinale : *Salvia officinalis* L. sur quelques entérobactéries pathogènes. *Synthèse*, 23 : 72-80.
- Bidaut-Russell M., Gabriel S.E.** (2001). Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 15(5) : 739-53.
- Bidie A.P., N'Guessan B.B., Yapo A.F., N'Guessan J.D., Djaman A.J.** (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8 (1) : 1-11.
- Bispo M.D., Mourão R.H., Franzotti E.M., Bomfim K.B., Arrigoni-Blank M.F., Moreno M.P., Marchioro M., Antonioli A.R.** (2001). Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animal. *J. Ethnopharmacol*, 76 : 81-86.
- Black H.S.** (1987). Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol*, 46, 213-221.
- Bondia-Pons I., Aura A.M., Vuorela S., Kolehmainen M., Mykkanen H., Poutanen K.** (2009). Rye phenolics in nutrition and health. *J. of Cereal Science*, 3 : 1-14.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A.** (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217: 7972-7980.
- Bose A., Mondal S., Jayanta K., et al.** (2007) Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitot*, 78 : 515-520.
- Botting R.M., Botting J.H.** (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clinical Drug Investigation*, 19: 1-7.
- Bolou G.E.K., Attioua B., N'Guessan A.C., Coulibaly A., N'Guessan J.D., Djaman A.J.** (2011). Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80 : 772-790.

Bouriche H., Kherbache A., Kada S., Senator A., Demirtas I. (2016). Phenolic content, anti-inflammatory and antioxidant activities of *Anacyclus clavatus* extracts. *Environmental and Experimental Biology*, 14 : 127-135.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igic R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: 925-929.

Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halperin, A.J., Pontén, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 : 10124-10128.

Bremness L. (1998) Les plantes aromatiques et Médicinales. Bordas Editions.

Bruno M., Savona G., Hueso-Rodriguez J.A., Pascual C., Rodriguez B. (1987). Ursane and oleanane triterpenoids from *Salvia argentea*. *Phytochemistry*, 26:497-501.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie : phytochimie Plantes Médicinales. Techniques et Documentation, 3^{ème} Ed, Lavoisier, Paris.1120p.

Bruneton. J. (2009). Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} éd. Paris, Tec et Doc- Editions médicales internationales. Lavoisier, 1288p.

Burger W., Fennert E.M., Pohle M., Wesemeier H. (1992). C-Reactive protein-a characteristic feature of health control in swine. *J. Vet. Med. A*, 39 : 635-638.

.. C ..

Cadirci I., Suleyman H., Gurbuz P., Kuruuzum A., Guvenalp z., Demirezer L.O. (2012). Anti-inflammatory effects of different extracts from three *Salvia* species. *Turk J Biol*, 36 : 59-64.

Caier.O., Roux.D. (2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3^{ème} ed. France : Wolters Kluwe.

Cao H., Xie Y., Chen X. (2015). Type 2 diabetes diminishes the benefits of dietary antioxidants: Evidence from the different free radical scavenging potential. *Food Chem*, 186, 106-112.

Cardon, D., Chatenet, G. (1990). Guide des teintures naturelles : plantes , lichens, champignons, mollusques et insectes.Ed. Delachaux et Nestlé, Neuchâtel-Paris. 399p.

Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., et al. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., depending on location and seasonal variations. *Food Chem*, 100 : 553-9.

Charles N., Serhan P., Ward A., Gilroy D.W. (2010). Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press, 2-3.

Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F., Chou S.T. (2002) Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 : 2454-2458.

Coelho de Souza G.P, Elisabetsky E.I. (1998). Ethnobotany and anticonvulsant properties of Lamiaceae from Rio Grande de Soul (Brasil). In: Harley R, Payton A, Harvey T, eds. Lamiales Newsletter. Royal Botanic Gardens, Kew, 10p.

Clebsch B., Barner C.D. (2003). The new book of Salvias. Timber Press, Portlan, 115-117.

Codd L.E.W. (1985). Lamiaceae: Flora of Southern Africa. 28 Botanical Research Institute, Pretoria.

Couladis M., Tzakou O., Stojanovic D., Mimica-Dukic N., Jancic R. (2001). The essential oil composition of *Salvia argentea* L. *Flavour Fragr. J*, 16: 227-229.

Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 12 : 564-582.

Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009). Dietary phenolics : chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat.Prod.Res*, 26 : 1001-1043.

.. D ..

Daoudi A., Bachiri L., Bammou M., Ibijbijen J., Nassiri L. (2015). Etude ethnobotanique au moyen Atlas central. *European Scientific Journal*, 11 (24) : 226-242.

Davidson J.F., Whyte B., Bissinger P.H., Schiestl R.H. (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5116-5121.

Deaton C.H.M., Marlin D.J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract*, 2(3) : 278-91.

Del Baño M.J., Lorente J., Castillo J., Benavente-García O., del Río J.A., Ortuño A., Quirin K.W., Gerard D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J. Agric.Food Chem*, 51 : 4247-4253.

Di Carlo G., MascoJo N., Izzo A.A., Capasso F. (1999). Flavonoids: olei and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 65, 337-353.

DiRosa M., Giroud J.P., Willoughby D.A. (1971). Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.*, 104, 15-29.

Djerroumi A., Nacef M. (2004). 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed Palais du livre, 135-141.

Dodds W.J. (1978). Platelet function in animals: species specificities. In *Platelets: A Multidisciplinary Approach* (G. deGaetano and S. Garattini, Eds.), Raven Press, New York, 45-59.

Dombrowicz D., Capron M. (2001). Eosinophils, allergy and parasites. *Current Opinion in Immunology*, 13: 716-720.

Domenico T., Francesco C., Maria G.S., Vincenza V., Mariateresa C.D., Antonella S., abriela M. and Giuseppe B. (2005). Mechanisms of antibacterial action of Three Monoterpenes. *Antimicrob Ag. Chemother.* 49 : 2474-2478.

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

Duling E.N., Owen J.C., John B.G., Rosmary F.W., Kevin A.M., Yeap L.F., Nigel B.P. (2007). Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. *Food chemistry*, 101 : 1417-1424.

.. E ..

Eckersall P.D., Saini P.K., McComb C. (1996). The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha (1)-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 51 : 377-385.

Edenharder R., Grunhage D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.*, 540 : 1-18.

Eidi M., Eidi A., Zamanizadeh H. (2005). Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.*, 100 : 310-3.

Eissa F.I., Zidan N.A. (2009). Hematological, Biochemical and Histopathological Alterations Induced by Abamectin and *Bacillus thuringiensis* in Male Albino Rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3) : 2497-2505.

El-Ansari M.A., Barron D., Abdalla M.F., Saleh N.A.M., Le Quere J.L. (1991). Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 30 : 1169-1173.

El Chaar S. (2005). Étude ethnobotanique et éthopharmacologique des espèces médicinales libanaises agissant sur le système broncho-pulmonaire. *Annales de Recherche Scientifique*, 6 : 145-176.

Esmon C.T. (2005). The interactions between inflammation and coagulation. *Br. J. Haematol*, 131 : 417-430.

Englard S., Seifter S. (1990). Precipitation techniques. *Methods Enzymol*, 182 : 285-300.

Esmaili M.A., Sonboli A. (2010). Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food Chem. Toxicol*, 48 (3) : 846-853.

Espinosa E, Chillet P, Valitutti S. (2006). Immunologie. Paris: Ellipses. 432 p.

Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afric J. Biotech*, 4 : 685-688.

Evans T.W. (2002). Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure . *Aliment. Pharmacol. Therap*, 16 : 6-11.

.. F ..

Fablet C., Madec F. (2009). Protéines de la phase aiguë de l'inflammation chez le porc : Intérêt en santé animale et en santé publique vétérinaire. *Revue Méd. Vét*, 160 (1) : 28-43.

Faivre C.I., Lejeune R., Staub H., Goetz P. (2006). Zingiber officinale Roscoe. *Phytotherapie*, 4(2) : 99-102.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Fauve R.M. et Hevin M. (1998). Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. In: inflammation. Russo-Marie F., Peltier A., Polla B S. Eds, John Libbey Eurotext (France). 10-19.

Fenglin H., Ruili L., Bao H., Liang M. (2004). Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. *Fitoterapia*, 75 : 14.

Fiore G., Nencini C., Cavallo F., Capasso A., Bader A., Giorgi G., Micheli L. (2006). In vitro antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phytother Res*, 20 : 701-703.

Flanagan S.W., Moseley P.L., Buettner G.R. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS lett*, 431 : 285-286.

Fleuriet A. (1982). Expression et régulation du métabolisme des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la croissance Thèse Doc. Etat, Montpellier.

Foster S, Tyler V.E. (1999). Tyler's Honest Herbal: A sensible guide to the use of the herbs and related remedies. 4th ed. The Haworth Press, New York, pp. 327-329.

Fox J.D., Robyt J.F. (1991). Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Analytical Biochemistry*, 195 : 93-96.

Fouché J.G., Marquet A., Hambuckers A. (2000). Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman, 89-100.

Fujimori H., Ozaki K., Nomuras S., et al. (1998). Characterisation of platelets abnormalities of Tester Moriyama (TM) rats with storage pool deficiency. *Lab. Anim. Sci*, 48, 5 : 490-495.

.. G ..

Ganther H.E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20 (19): 1657- 1666

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité chimique*, 91-96.

Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2ème Ed Tec et Doc. Paris. 275p.

Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., et al. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Sci Elsevier*, 76: 172-8.

Girrotti chanu C. (2006). Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea debilis*. Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Lyon.

Geronikaki A.A., Gavalas A.M. (2006). Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 9: 425-442.

Gonzalez-Burgos E., Carretero M.E., Gomez-Serranillos M.P. (2011). Sideritis spp.: uses, chemical composition and pharmacological activities – a review. *J.Ethnopharmacol*, 135 (2) : 209-225.

Gonzalez-Gallego J., Sanchez-Campos S., Tunon M.J. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, 22 : 287-93.

Graham L.P., Depovere P. (2002). Chimie pharmaceutique.ed. De Boeck, 154p.

Gresele P., Cerletti C., Guglielmini G., Pignatelli P., De Gaetano G. and Violi F. (2011). Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function : an update .*J. of Nutr. Biochem*, 22 : 201-211.

Grieve, M. (1980). A Modern Herbal. Penguin Press, London, U.K. 700-705.

Groner W., Boyett J., Johnson A., Scantlebury M. (1986). Variability of erythrocyte size and hemoglobin content observed in Man and four selected animals. *Blood. Cells*, 12 : 65-80.

Guiné R.P.F., Gonçalves F.J. (2016). Bioactive Compounds in Some Culinary Aromatic Herbs and Their Effects on Human Health. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(11) : 855-866.

Gutteridge J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun*, 19: 141-158.

Gulcin I., Alici H.A., Cesur M. (2005). Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chem. Pharm. Bull*, 53: 281-285.

.. H ..

Habauzit V., Horcajada M.N. (2008). Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochem Rev*, 7 : 313-344.

Hachi M., Hachi T., Belahbib N., Dahmani J., Zidane L. (2015). Contribution à l'étude floristique et ethnobotanique e la flore medicinale utilisée au niveau de la ville e Khenifra (Maroc). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 11 (3) : 754-770.

Hamidpour M, Hamidpour R., Hamidpour S., Shahlari M. (2014). 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*, 4 : 82-88.

Hanson J.R. (1995). In Terpenoids and Steroids Specialist Periodical Reports, *The chemical Society, London, and Nat. Prod. Reports*, 1-12.

Harley R.M., Atkins S., Budantsev A.L., Cantino P.D., Conn B.J., Grayer R., Harley M.M., de Kok R., Krestovskaja T., Morales R., Paton A.J., Ryding O., Upson T. (2004). Labiatae. In: Kadereit, J.W. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants, Lamiales*, vol. VII. Springer, Berlin, 167-282.

- Harley R., Paton A., Harvey T.** (1998). Lamiales Newsletter. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hartmann, T.** (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68 : 2831-2846.
- Haton C.** (2005). Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, 43.
- Havsteen B.H.** (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96 : 67-202.
- Hedge I.C.** (1972). *Salvia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, editors. Flora Europaea. Vol. 3. Cambridge: Cambridge University Press, 188p.
- Hemaiswarya S., Kruthiventi A K., Doble M.** (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639-652.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Skaltsounis A.L., Bailleul F.** (2007). Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium perefrinum*. *Biochem. Syst. Ecol*, 35 : 642-626.
- Henzen C.** (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum médical suisse*, 19 : 442-446.
- Hiermann A., Schramm H.W., Laufer S.** (1998). Antiinflammatory activity of myricitin-3-o-beta-D-glucuronide and related compounds. *Inflamm. Res*, 47 : 421-427.
- Holeman M.A., Berrada M., Bellakhdar J., Ildrissi A., Pinel R.** (1984). Comparative chemical study on essential oils from *Salvia officinalis*, *S. aucheri*, *S. verbenaca*, *S. phlomoides* and *S. argentea*. *Fitoterapia*, 55 : 143-148.

.. I ..

Iserin P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales (2ème Eds) Dorling Kindersiey Limited, Londres, 12p.

ISO 659:2009 (2014). Oil seeds - Determination of oil content (Reference method), 12.

.. J ..

Jacques B., André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris, pp: 217-219- 220-223-225.

Janicsák G., Veres K., Zoltan Kakásy A., Máté I. (2006). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochem Syst Ecol.* 34 : 392-396.

Jialal I., Devaraj S., Venugopal S.K. (2004). C-Reactive Protein: Risk Marker or Mediator in Atherothrombosis. *Hypertension*, 44 : 6-11.

Jokić S., Velić D., Bilić M., Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S. (2010). Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *J. Food Sci*, 28 : 206- 212.

Jones W.P., Kinghorn D. (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa), 334-335.

Julkunen-Tiitto R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem*, 33 (2): 213-217.

.. K ..

Kabouche A., Kabouche Z. (2008). Bioactive diterpenoids of *Salvia* species. *Studies in Natural Products Chemistry*, 35 : 1-81.

Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabeled K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, 15 : 129-133.

Kamatou G.P., Makunga N.P., Ramogola W.P., Viljoen A.M. (2008). South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *J. ethnopharmacol*, 119 (3) : 664-672.

Kanwal Q., Hussain I., Latif Siddiqui H., Javaid A. (2010). Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Nat Prod Res*, 24 (20) : 1907-14.

Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugb-Uaja V.O. (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J. Med Scien*, 4 : 179-182.

Katarzyna U., Anna M., Marta M., Joanna J.B., Grzegorz W. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62 (2) : 132-135.

Khan A.M., Qureshi R.A., Ullah F., Gilani S.A., Nosheen A. Sahreen S., Laghari M.K., Laghari M.Y., Ur-Rehman S., Hussain I., Murad W. (2011). Phytochemical analysis of

selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *J. Med Plants Res*, 5(25) : 6017-6023.

Khiati M. (1998). Guide des maladies infectieuses et parasitaires. *OPU, Alger*, 28p.

Kintzios, S.E. (2000). Sage the genus *Salvia*. Taylor & Francis e-Library. CRC Press, 9p.

Kosar M., Dorman M.J.D., Bachmayer O., Baser K.H.C., Hiltuten R. (2003). An Improved On-line HPLC-DPPH* Method for the Screening of Free Radical Scavenging Compounds in Water Extracts of Lamiacea Plants. *Chemistry of Natural Compounds*, 39(2) : 161-166.

Kraus A.L. (1980). Research methodology. *The Laboratory Rat* 2 (1) : 5-19.

Krief S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.

Ksouri M., Megdiche W., Debez A., Fallah H., Grignon C., Abdelly C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxydant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol. Bioch.*, 45 : 244-249.

Kulkarni S.K., Jain N.K., Singh A. (2000). Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potentiel for selective COX-2 inhibitors . *Methods and Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 22 : 291-298.

.. L ..

Lakhal H., Kabouche A., Alabdul Magid A., Voutquenne-Nazabadioko L., Harakat D., Kabouche Z. (2014). Triterpenoids from *Salvia argentea* var. *aurasiaca* (Pomel) Batt. & Trab and their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry*, 102 : 145-51.

Lakhal H., Kabouche A., Alabdul Magid A., Voutquenne-Nazabadioko L., Harakat D., Kabouche Z. (2014). Triterpenoids from *Salvia argentea* var. *aurasiaca* (Pomel) Batt. & Trab. and their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry*, 102: 145-51.

Lamien-Meda A., Nell M., Lohwasser U., Borner A., Franz C., Novak J. (2010). Investigation of Antioxidant and Rosmarinic Acid Variation in the Sage Collection of the Genebank in Gatersleben. *J. Agric. Food Chem.*, 58 : 3813-3819.

Landolfi R., Mower R.L., Steiner M. (1984). *Biochem Pharmacol*, 33 : 1525-1530.

Lawrence, B. M. (2005). *The Antimicrobial /Biological Activity of Essential Oils*, Allured Publishing Corp. USA: Carol Stream.

Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51 : 7292-7295.

Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Tian Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chem*, 102 : 771-776.

Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H., Zeng X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from *Ilex Kudingcha* C.J. Tseng. *Food chemistry*, 112 : 35-40.

Liu J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol*, 49(2) : 57-68.

Longaray Delamare A.P., Moschen-Pistorello I.T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100 : 603-608.

Lourens A.C.U., Reddy D., Baser K.H.C., Viljoen A.M., Van Vuuren S.F. (2004) . *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95 : 253-258.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Randall R. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193 : 265-275.

.. M ..

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.

Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado. P. (2006). Composés phénoliques dans la plante -Structure, biosynthèse, réparation et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris.

Machholz E., Guy M., Casimira R., Corning B.F., Pritchett-Corning K.R. (2012). Manual Restraint and Common Compound Administration Routes in Mice and Rats. *J Vis Exp*, (67): 2771.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (1997). Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall International Editions, 102p.

Mahmood N., Pizza C. and Aquino R. (1993). Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res*, 46 (7): 1257-1271.

- Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N.** (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie*, 9 : 35-40.
- Maleki N., Garjani A., Nazemiyeh H., Nilfouroushan N., Eftekhari Sadat A.T., Allameh Z., Hasannia N.** (2001). Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats, *J. Ethnopharmacol*, 75 : 213-218.
- Mandal G., Chatterjee C., Chatterjee M.** (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of methanolic extract of leaves of *Bougainvillea spectabilis* in experimental animal models. *Pharmacognosy Res. Jan-Mar*; 7(1) : 18-22.
- Marfak A.** (2003). Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools. 6-7-10.
- Maria John K.M., Ayyanar M., Arumugam T., Enkhtaivan G., Jin K., Kim D.H.** (2015). Phytochemical screening and antioxidant activity of different solvent extracts from *Strychnos minor* Dennst leaves. *Asian Pac J Trop Dis*, 5(3): 204-209.
- Marin P.D., Grayer R.J., Grujic-Jovanovic S., Kite G.C., Veitch N.C.** (2004). Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus. *Betonica. Phytochemistry*, 65(9) : 1247-1253.
- Martinez-Cayuela M.** (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*, 77: 147-161.
- Masaki H.** (2010). Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci*, 58(2) : 85-90.
- McKay D.L., Blumberg J.B.** (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother. Res*, 20 (8) : 619-633.
- Medjahed F., Merouane A., Saadi A., Bader A., Cioni P.L., Flamini G.** (2016). 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) : 195-200.
- Mehdioui R., Kahouadji A.** (2007). Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). *Bulletin de l'Institut scientifique, Rabat, section Sciences de la vie*, 29 : 11-20.
- Melo G.A., Grespan R., Fonseca J.P., Farinha T.O., Silva E.L., Romero A.L., Bersani-Amado C.A., Cuman R.K.** (2011). *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Inhibits *in vivo* and *in vitro* Leukocyte Migration. *J. Med. Food*, 14 : 944-946.
- Meyers K., Wardrop K.J.** (1991). Platelets and coagulation. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med*, 36 : 87-150.

- Michavila A., De la Torre M.C., Rodriguez B.** (1986). 20-nor-abietane and rearranged abietane diterpenoids from the root of *Salvia argentea*. *Phytochemistry*, 25 : 1935-1937.
- Middleton E.J., Kandaswami C., Theoradies T.C.** (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673-751.
- Milane H.** (2004). La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155p.
- Milcent R., Chau F.** (2003). Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentale, chimie et biochimie des principaux composés naturels, EDP sciences.
- Mirjalili, M.H., Peyman s., Sonboli A., Vala M.M.** (2006). Essential oil of variation *Salvia officinalis* Aerial parts during its phenological cycle. *Chemistry of Natural Compounds*, 42: 1.
- Mold C., Rodriguez E., Rodic-Polic B., Du Clos T.W.** (2002). C-reactive proteins in grass sickness (equine dysautonomia). *Res. Vet. Sci*, 50 : 273-278.
- Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.E., Roura S.I.** (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT Food Sci Technol*, 38: 565-70.
- Moroh J.L.A., Bahi C., Dje K., Loukou Y.G. et Guede-Guina F.** (2008). Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bull. Soc. Royale . Sci. Liège*, 77 : 44 –61.
- Moser B., M. Wolf A. Walz et al.** (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, 25: 75-84.
- Murakami A., Tanaka T., Lee J.Y., Surch Y.J., .Kim H.W., Kawabata K., Akamura Y., Jiwajinda S., Ohigashi H.** (2004). Zerumbone, a sesquiterpene en subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *International journal of cancer*, 110 : 481-490.

.. N ..

- Nagy G., Gunther G., Mathe I., et al.** (1999). Diterpenoids from *Salvia glutibnosa*, *S. austriaca*, *S. tomentosa* and *S. verticillata* roots. *Phytochemistry*, 52: 1105-1109.

- Nakajou K., Watanabe H., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M.** (2003). The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj*, 88-97.
- Nantel F., Denis D., Gordon R., Northey A., Cirino M., Metters K.M., Chan C.C.** (1999). Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol*, 128 : 853-859.
- Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., et al.** (2005). Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*: a rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*, 102 : 123-126.
- Nauciel C.** (2000). Bactériologie medicale, Masson(Ed).Paris, 275p.
- Nazemiyeh H., Shoeb M., Movahhedine N., Kumarasamy Y., Talebpour A.H., Delazar A., Nahar L., Sarker S.D.** (2006). Phenolic compounds and their glycosides from *Stachys schtschegleevii* (Lamiaceae). *Biochemic Systematic and Ecology*, 34 : 721-723.
- NCCLS** "National Committee for Clinical Laboratory Standards". (2001). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100-S11, Wayne, PA, USA.
- Ndiaye M., Sy G., Dièye A.M., Touré M.T, Faye B.** (2006). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d' *Annona reticulata* (Annonaceae) sur l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 14 : 179-186.
- Newall C.A., Anderson L.A., Phillipson J.D.** (1996). *A guide for Health-care Professionals*, London.
- Nguyena V.T., Bowyera M.C., Vuonga Q.V, Van Altenaa I.A., Scarlett C.J.** (2015). Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (*Paramignya trimera*) root as affected by various solvents and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 67 : 192-200.
- N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traoré D., Aké-Assi.** (2009). L. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte d'Ivoire). *Sci. Nat*, 6(1) : 1-15.
- Nijveldt R.J., Nood E., Hoorn D.E., Boelens P.G., Norren K., Leeuwe P.** (2001). Flavonoids : A review of probable mechanisms of action and potential application. *Am.J.Clin Nutr*, 74 : 418-425.
- Nikaido H., Vaara M.** (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, 49 : 1-32.
- Njenga E.W., Van Vuuren S.F., Viljoen A.M.** (2005). Antimicrobial activity of *Eriosephalus* L. species. *South African Journal of Botany*, 71 : 81-87.
- Nkhili E.** (2004). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Diplôme de Doctorat, Spécialité:

Sciences des Aliments. Université Cadi Ayyad. Marrakech Université D'avignon Et Des Pays De Vaucluse, SPSA, Montpellier. 378p.

Nikolova M.T, Grayer R.J, Genova E., Porter E.A. (2006). Exudate flavonoids from bulgarian species of *Salvia*. *Biochem Syst Ecol*, 34 : 360-364.

Nogueira de Melo G.A., Fonseca J.P., Farinha T.O., José do Pinho R., Damião M J., Grespan R., Leite da Silva E., Bersani-Amado C.A., Nakamura Cuman R.K. (2012). Anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(35) : 4934-4939.

Nostro A., Germano M. P., D'Angelo V., Marino A., Cannatelli M. A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30 : 379-384.

.. O ..

Oancea S., Stoia M., Coman D. (2012). Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of *Vaccinium Corymbosum* in the Perspective of Food Applications. *Procedia Eng*, 42 : 489-495.

OMS. (2002). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005.

Ono K., Nakane H., Fukushima M., Chermann J.C., Barre-sinoussi F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases, *Eur. J. Biochem*, 190 : 469-476.

Orhan I.E., Senola F.S., Ercetinc T., Kahramand A., Celepf F., Akayding G., Senera B., Doganf M. (2013). Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Industrial Crops and Products*, 41, 21-30.

Ouattara B., Simard R. E., Holley R. A., Piette G. J. P., Bégin A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155-162.

Ouédraogo N., Lompo M., Sawadogo R.W., Tibiri A., Hay A.E., Koudou J., Dijoux M.G., Guissou I.P. (2012). Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*, 1-7.

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

Ozenda P. (1977). Flore du Sahara. Paris, C.N.R.S., 622 p.

Ozturk M., Aydogmus-Ozturk F., Duru M.E., Topçu G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extract of rhubarb (*Rheumribes*): an edible medicinal plant. *Food chemistry*, 103: 623-630.

.. P ..

Palozza P., Simone R., Picci N., Buzzoni L., Ciliberti N., Natangelo A., Manfredini S., Vertuani S. (2008). Design, synthesis, and antioxidant potency of novel alpha-tocopherol analogues in isolated membranes and intact cells. *Free Radic. Biol Med*, 44(7) : 1452-64.

Paris R., Moyse M. (1965). Précis de matière médicale. Edit. Masson. *Paris*.66-104.

Park H.H., Lee S., Son H.Y., Park S.B., Kim M.S., Choi E.J., Singh T.S., Ha J.H., Lee M.G., Kim J.E., Hyun M.C., Kwon T.K., Kim Y.H., Kim S.H. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of pro-inflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res*, 31: 1303-1311.

Parke, A., Parke, D.V. (1995). The pathogenesis of inflammatory disease: Surgical shock and multiple system organ failure. *Inflammopharmacology*, 3 : 149-168.

Patudin A.V., Romanova A.S., Sokolov V.S., Pribylova G.I. (1974). *Planta Med*, 26 : 201.

Pavan-Fruehalf S. (2000). Plantas medicinais de mata atlântica: manejo sustentado e amostragem. São Paulo: Annablume: FAPESP, 10-26.

Payne D.N.R., Adcock I.M. (2001). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2 : 145-150.

Pelagalli A., Lombardi P., d'Angelo D., Della Morte R., Avallone L., Staiano N. (2002). Species variability in platelet aggregation response to different agonists . *J. Comp. Pathol*, 127 : 126-132.

Pelmont J. (1995). Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. *Office des Publications Universitaires*, 2 : 541-572.

Pelt J.M. (2001). Les nouveaux actifs naturels. Marabout. Paris. 219-124.

Pelt.J. M. (1980). Les drogues, leur histoire et leurs effets. Édition Doin, Paris: 221.

Pepys M.B. (1981). C-reactive protein fi fty years on . *Lancet*, 653-657 .

Pieroni A., Quave C.L., Santoro R.F. (2004). Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. *J Ethnopharmacol*, 95 : 373-384.

Piquet. A., Hebuterne X. (2007). Nutrition en pathologie digestive ; Ed : DOIN, 16-20.

Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A., Stewart C.R., (1994). Evidence for Chilling- Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. *Plant Cell*, 6 : 65-74.

Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem*, 48(8) : 396-402.

.. Q ..

Quezel P., Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Ed., CNRS, Paris, (2), 793.

Qusti S.Y., Abo-khatwa A.N., Bin Lahwa M.A. (2010). Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the holy quran. *EJBS*, 2(1) : 1-12.

.. R ..

Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2(2) : 219-36.

Rahmat A.K. (2012). Evaluation of flavonoids and diverse antioxidant activities of *Sonchus arvensis*, *Chemistry Central Journal*, 6:126.

Ramamoorthy T.P., Eliot M. (1993). Mexican Lamiaceae: Evolution, distribution, endemism. Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution.. Oxford University Press, New York.

Raulescu V., Silvia C., Eliza O. (2004). Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of *Salvia officinalis*. *Journal of chromatography A*, 1027 : 121-126.

Renault-Roger.C., Philogene.B. JR et Vincent.CH. (2008). Bio pesticides d'origine végétale .Ed.Tec et Doc, Paris : 51-60p.

Ribeiro M.A., Bernardo-Gil M.G., Esquivel M.M. (2001). Melissa officinalis, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, *Journal of Supercritical Fluids*, 21 : 51-60.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E. (1968). Les composés phénoliques des végétaux, Traité d'oenologie, Paris : Édition Dunod, 254p.

Riccobono L., Maggio A., Rosselli S., Ilardi V., Senatore F., Bruno M. (2015). Chemical composition of volatile and fixed oils from *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) growing wild in Sicily. *Natural Product Research*, 1-10.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1995). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend. Plant Sci*, 4 : 152-159.

Ringuet. J., Bloth.J., Botrel. A. (2001). Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2ème édition de VUEF, Hong Kong: 335p.

Robinson D.N., Smith-Leiker T.A., Sokol N.S., Hudson A.M., Cooley L. (1997). Formation of the *Drosophila* ovarian ring canal inner rim depends on cheerio. *Genetics*, 145(4) : 1063-1072.

Russo A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Delfine S., Cardile V., et al. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 2(55) : 42-47.

Russo-Marie F., Peltier A. et Polla B. (1998). L'inflammation. Editions John Libbey Euro text, 565p.

Ryu S.Y., Lee C.O., Choi S.U. (1997). *In vitro* cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med*, 63: 339-342.

.. S ..

Sahnoun Z. , Jamoussi K. et Zeghal K.M. (1998). Radicaux libres et anti-oxydants : physiologie, pathologie humaine et aspects thérapeutiques (IIème partie) = Cellular systems implicated in production of free radicals and physiological functions of these radicals and free radicals in human pathology. *Rencontre Nationales de Pharmacologie*, 53(4) : 355-389.

Sahu R., Saxena J. (2013). Screening of Total Phenolic and Flavonoid Content in Conventional and Non-Conventional Species of Curcuma. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(1) : 176-179.

Sajewicz M., Staszek D., Wrobel M.S., Waksmundzka-Hajnos M., Kowalska T. (2012). The HPLC/DAD fingerprints and chemometric analysis of flavonoid extracts from the selected sage (*Salvia*) species. *Chromatogr Res Int*, 1-8.

Salah K.B., Mahjoub M.A., Ammar S., Michel L., Millet-Clerc J., Chaumont J.P., Mighri Z., Aouni M. (2006). Antimicrobial and antioxidant activities of the methanolic extracts of three *Salvia* species from Tunisia. *Natural Product Research*, 20 (12), 1110-1120.

Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*, 23 : 197-223.

Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H. (2007) The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol*, 117: 112-9.

- Sanchez-Moreno C.** (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3) : 121-137.
- Sévenet T., Tortora C.** (1994) Plantes, molécules et médicaments. Nathan, CNRS Editions Paris.
- Rankin J.A.** (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical*. 15: 3-17.
- Rathee P., Chaudhary H., Rathee S., Rathee D., Kumar V., Kohli K.** (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 8 : 229-235.
- Sagdic O., Ozcan M.** (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control Elsevier*, 14: 141-3.
- Sarac N., Ugur A.** (2007). Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsia J BioSci*, 4, 28-37.
- Sarni-Manchado.P., Cheynier.C.** (2006). Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition Tec et Doc, Paris (France): 398p.
- Scalbert A.** (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 : 3875-3883.
- Schauenberg, P., Paris F.** (1990). Guide to Medicinal Plants. First paperback edition Paris. Lutterworth Press.
- Scipioni R.L., Diters R.W., Myers W.R., Hart S.M.** (1997). Clinical and clinicopathological assessment of serial phlebotomy in the Sprague-Dawley rat. *Lab. Anim. Sci*, 47 (3) 293-299.
- Seidel V.** (2005). Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa), 27-37.
- Seibert K., Zhang Y., Leahy K., Hauser S., Masferrer J., Perkins W., et al.** (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci*, 91(25) : 12013-12017.
- Şeref Gün S., Çinbilgel İ., Öz E., Çetin H., Kafkas Univ Vet Fak Derg.** (2011), 17 (Suppl A), 61-65.
- Setty A.R., Sigal L.H.** (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34, 773-784.
- Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K.** (2006). Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67: 2058–2070.
- Shahidi F, Naczsk M.** (1995). Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc.

Small, E., Catling, P.M. (2000). Les cultures médicinales canadiennes. Canada : Ottawa (Ontario), NRC Research.Press.

Smidling D., Mitic-Culafic D., Vukovic-Gacic B., Simic D., Knezevic-Vukcevic, J. (2008). Evaluation of antiviral activity of fractionated extracts of Sage *Salvia officinalis* L (Lamiaceae). *Arch BiolSci Belgrade*, 60 : 421-429.

Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, 327 : 649-662.

Soylu E.M., Soylu S., Kurt S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161 : 119-128.

Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A.M., Kouretas D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 50 : 4115-4124.

Sugiyama M. (1992). Role of physiological antioxidants in chromium (VI) induced cellular injury. *Free Radic Biol Med*, 12 : 397-407.

Su M.S., Shyu Y.T., Chein P.J. (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food chemistry*, 11: 892-896.

.. T ..

Tada M, Okuna K, Chiba K et al. (1994). Antiviral diterpenes from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 35: 539-541.

Takaki I., Bersani-Amado L.E., Vendruscolo A., Sartoretto S.M., Diniz S.P., Bersani-Amado C.A., Cuman R.K. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil in experimental animal models *J. Med. Food*, 11:741-746.

Takiguchi M., Fujinaga T., Naiki M., Mizuno S., Otomo K. (1990). Isolation, characterization, and quantitative analysis of C-reactive protein from horses. *Am. J. Vet. Res*, 51 : 1215-1220.

Tamion F. (2010). Albumine dans les états infectieux graves. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 29 : 629-634.

Tardio J., Pardo-De-Santayana M., Morales R. (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Bot J Linnean Soc*, 152 : 27-71.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., and Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90 : 333-340.

Thangara J. H. S., Adjei O., Allen B. W., and Portaels F. (2000). *In-vitro* activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal Antimicrobial Agents Chemoter*, 45 (2) : 231-233.

Thannickal V.J. et Fanburg B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*, 279: 1005-1028.

Teixeira J., Gaspar A., Garrido E.M., Garrido J., Borges F. (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, 2013 : 1-11.

Topçu G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J Nat Prod*, 69 : 482-486.

Tsao R., Coats J.R. (1995). Starting from nature to make better insecticides. *Chemtech*, 25 : 23-28.

Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F, Polat G. (2007) Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12: 484-96.

.. U ..

Ulubelen A., Oeksuez S., Topcu G., Goeren A.C, Voelter W. (2001). Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia blepharochlaena*. *J. Nat. Prod*, 64 : 549-551.

Ulubelen A., Tuzlaci E. (1990). Flavonoids and triterpenoids from *Salvia euphratica* and *S.longipedicellata*. *Fitoterapia*, 61: 185.

Ulukanli Z., Akkaya A. (2011). Antibacterial Activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* var. *Hirta* Grown Wild in Eastern Anatolia, Turkey. *Int J Agric Biol*, 13: 105.

Urquiaga I. et Leighton F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33 (2) : 55-64.

.. V ..

Valero M., Salmeron M.C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85 : 73-81.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160 : 1-40.

Valsaraj R., Pushpangadan P. and Smitt U. W. (1997) New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod*, 60: 739-742.

Van Herck H., Baumans V., Brandt C.J.W.M. (1998). Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise. *Lab. Anim*, 32 : 377-386.

Van Vuuren S.F., Viljoen A.M., Van Zyl R.L., Van Heerden F.R., Baser K.H.C. (2006). The antimicrobial, antimalarial and toxicity profiles of helihumulone, leaf essential oil and extracts of *Helichrysum cymosum* (L.) D. Don subsp. *cymosum*. *South African Journal of Botany*, 72 : 287-290.

Velickovic A.S., Ristic M.S., Velickovic D.T., Ilie S., Mitic N.D. (2003). The possibilities of the application of some species of sage (*Salvia* L.) as auxiliaries in the treatment of some diseases. *J.Serb. Chem. Soc*, 68 (6), 435-445.

Veličković D.T., Ristić M.S., Milosavljević N.P., Davidović D.N., Bogdanović S.Z. (2014). Chemical composition of the essential oil of *Salvia argentea* L. *Agro Food Ind Hi Tech*, 25 : 70-72.

Verpoorte R. (2002). La pharmacognosie du nouveau millénaire: pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4^e congrès européen d'ethnopharmacologie. IRD Ed: Paris, 274p.

Vinegar R., Truax J.F., Selph J.L., Johnston P.R., Venable A.L., McKenzie K.K. (1987). Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc*, 46 : 118-26.

Vinegar R., Shereiber W., Hugo R. (1969). Biphasic development of carragenin-induced oedema in rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 166 : 96-103.

.. W ..

Wachter G. A., Hoffmann J. J., Furbacher T., Blake M. E., Timmermann B. N. (1999) Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry*, 52 : 1469-1471.

Wagner H. (1993). Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New-York, 50 p.

Wallace M., Staats P.S. (2004). Pain medicine and management: just the facts. McGraw-Hill New York, 48.

Wantana R., Tassanee N., Subhadhirasakul S. (2009). Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals. *J Nat Med*, 63(3) : 27-45.

Watanabe A., Morimatsu M., Yoshimatsu K., Yamamoto O., Terao A., Tsukazaki K., Saito M., Naiki M. (1992). Isolation of C-reactive protein from cat serum. *J. Small An. Pract*, 33 : 71-77.

Weill B., Batteux F., Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et reactions inflammatoires. Eds, De Boeck Universite (Paris). 12-23.

Weiss J., Taylor G.R., Zimmermann F., Nebendahl K. (2000). Collection of body fluids- In : kreinke G.J. The laboratory Rat, *The handbook of experimental Animal Academic press*, 25 : 485-495.

Wiert C. (2006). Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific. Eds, Humana Press, Totowa, 1-20.

Wichtl M., Anton R. (2009). Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition Lavoisier, Paris: 38, 41.

Wichtl. M., Anton. R. (1999). Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Ed Tec & Doc. Editions Médicales Internationales, 636p.

Winter C.A, Risley E.A., Nuss G.W. (1962). Carrageenan-induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111 : 544-7.

Wright J.R., Yates A.J., Shah N.T., Thibert P., et al. (1983). Hematological characteristics of the BB Wistar rat. *Veterinary Clinical Pathology*, 12 (1) 9-13.

Wu Y.B., Ni Z.Y., Shi Q.W., Dong M., Kiyota H., Gu Y.C., Cong B. (2012). Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem Rev*, 112: 5967-6026.

.. Y ..

Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomas-Barberan FA., Datta N., Singanusong R., Chen S.S. (2004). Flavonoides in food and their health benefits. *Plant.Food.Nutr*, 59 : 113-122.

Yao J., Wang J.Y., Liu L. (2010). Antioxydant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch Med Res*, 41 : 288-294.

Yang Z., Kitano Y., Chiba N et al. (2001). Synthesis of variously oxidized abietane diterpenes and their antibacterial activities against MRSA and VRE. *Bioorg Med Chem*, 9 : 347-356.

Yang M.H., Blunden G., Xu Y.X., Nagy G., Mathe I. (1996). Diterpenoids from *Salvia* species. *Pharm Sci*, 2 : 69-71.

Yepez B., Espinosa M., López S., Bolaños G. (2001). Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria*, 194 (197) : 879-884.

Yoo K.M., Al-Farsi M., Lee H., Yoon H., Lee C.Y. (2010). Antiproliferative effects of cherry juice and wine in Chinese hamster lung fibroblast cells and their phenolic constituents and antioxidant activities. *Food Chem*, 123 : 734-740.

Yudkin J.S., Kumari M., Humphries S.E., Mohamed-Ali V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link. *Atherosclerosis*, 148 : 209-214.

Yusuf Y. (2006). Catechins in foods. *Trends Food Sci. Tech.* 17 : 64-71.

.. Z ..

ZareShahneh, F., Valiyari, S., Baradaran, B., Abdolalizadeh, J., Bandehagh, A., Azadmehr, A., and Hajiaghah, R. (2013). Inhibitory and cytotoxic activities of *Salvia officinalis* L. Extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis. *Adv Pharm Bull*, 3 : 51-55.

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

Zimmermann M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-10.

Zouki C., Beauchamp M., Baron C.M., Filep J.G. (1997). Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J. Clin. Investig*, 100 : 522-529.

Annexes

Annexe 01 : Réactif de Wagner

Iodure de potassium.....2 g.
Iode.....1,27 g.
Eau distillée..... 100 ml.

Annexe 02 : Standard MacFarland 0.5

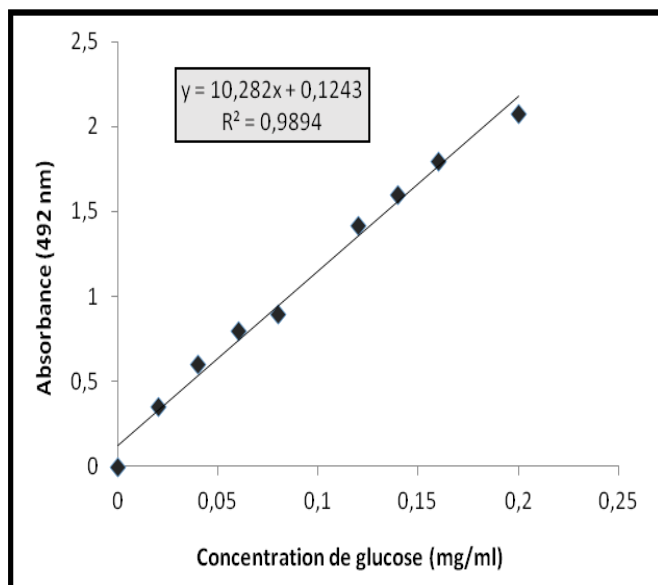
Préparation du Standard MacFarland 0.5 :

Acide Sulfurique (1%) 99,5 ml.
Chlorure de baryum (1.175%) 0,5 ml.

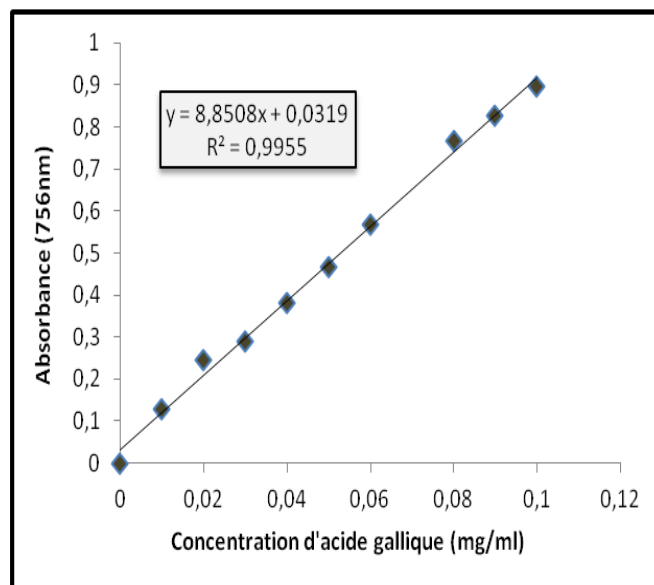
Instruction pour la conservation :

Conserver les tubes l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 25°C. ne pas le congeler ni les surchauffer. Laisser s'équilibrer jusqu'à température ambiante avant utilisation.

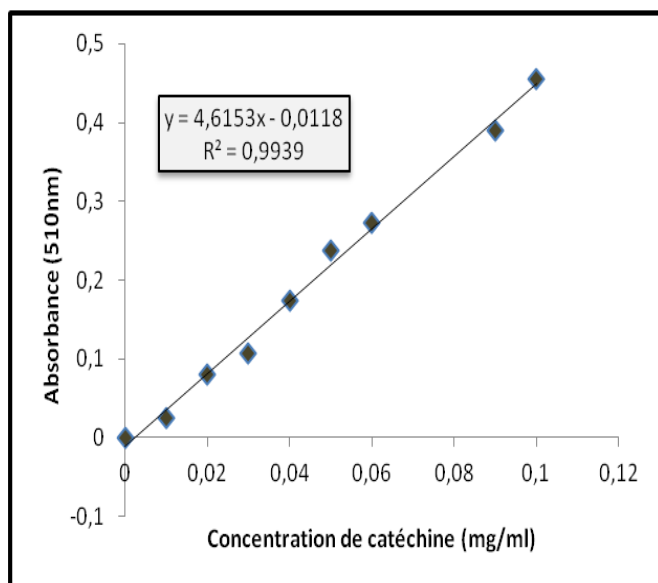
Annexe 03 : Les gammes d'étalonnage



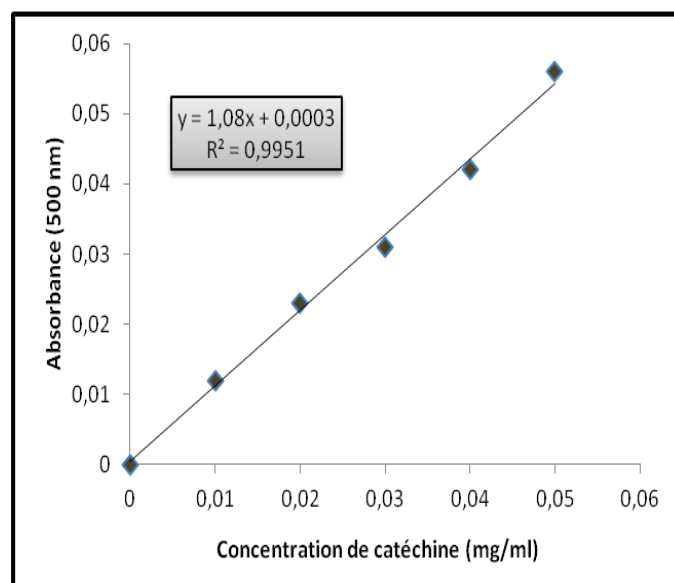
Courbe d'étalonnage des sucres



Courbe d'étalonnage des polyphénols



Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



Courbe d'étalonnage es tannins

Publication



ISSN 0975-413X
CODEN (USA): PCHHAX

Der Pharma Chemica, 2016, 8(22):1-6
(<http://www.derpharmachemica.com/archive.html>)

Determination of Primary and Functional Metabolites of *Salvia argentea* and Evaluation of its Leaves and Roots Antioxidant Activity

Wafaa Tehami¹, Asmaa Kherraf¹, Wahiba Boufeldja¹, Mustapha Mahmoud DIF³, Amira Ghislaine DRA¹, Bouziane Abbouni², Mohammed Benali¹

¹Biotoxicology Laboratory Department of Biology, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbès 22000, Algeria

²Molecular Microbiology and Proteomic Laboratory, Department of Biology, University of Djilali Liabes, Sidi Bel Abbès 22000, Algeria.

³Sciences Institute, Department of Biology, University Center, El Bayadh, 32000, Algeria

ABSTRACT

The objective of this work is to determine the primary metabolites and functional principles and to evaluate the antioxidant activity of silver sage *Salvia argentea*, an herbaceous plant growing in Algeria. Physicochemical analyzes performed for the first time revealed appreciable levels of primary metabolites. It contains for the leaves and roots, respectively, a moisture content of $9.50 \pm 0.01\%$ and $8.63 \pm 0.16\%$, ash content of $14.68 \pm 0.10\%$ and $9.03 \pm 0.04\%$ and for the fat content a rate of $2.92 \pm 0.11\%$ and $3.94 \pm 0.05\%$. The aerial and subterranean parts of *S. argentea*, have respectively contents of $10.73 \pm 0.18\%$ and $5.23 \pm 0.32\%$ of proteins. On the other hand, poverty in sugars in the roots was observed ($0.15 \pm 0.12\%$) compared to leaves ($4.13 \pm 0.04\%$). The mean polyphenol contents of leaves and roots in methanolic and aqueous extracts were 87.13 ± 0.32 - 55.64 ± 0.35 mg GAE/g and 71.80 0.79 - 48.20 0.79 mg GAE/g. The flavonoids were 59.97 ± 0.21 - 31.22 ± 0.49 mg CE/g and 44.16 ± 0.60 - 18.12 ± 0.54 mg CE/g and tannins respectively of 3.70 ± 0.09 - 5.58 ± 0.13 mg CE/g and 4.01 ± 0.16 - 5.83 ± 0.09 mg CE/g. In addition, the extracts tested showed appreciable antioxidant powers using the FRAP iron reduction method and the free radical scavenging method DPPH. The IC₅₀s range from 45.42 ± 0.46 to 416.12 ± 0.26 µg/ml. This study indicates that *S. argentea* may be a potential source of antioxidants used for therapeutic purposes.

Keywords: *Salvia argentea*, Primary metabolites, Functional principles, Antioxidant activity

INTRODUCTION

The discovery of the natural resources of the plant world remains crucial for the development of new therapeutic remedies. Secondary plant metabolites have been used for centuries in traditional medicine because of their large biological activities including antioxidant properties [1,2]. The essential oil of *Salvia argentea*, collected in the south-east of Serbia, was analyzed by GC-MS. Forty-seven constituents have been identified. The oil was characterized by a high content of sesquiterpenes. The main constituents were viridiflorol (32.4%), manol (14.6%) and α -humulene (10.7%) [3]. In recent years, plant extracts have appeared on the market as antioxidants used in the food and therapeutic industries [4]. The Lamiaceae family encompasses a large number of plants known for their antioxidant properties and the *Salvia* kind has about 900 species distributed widely throughout the world [5], of which 23 species grow in Algeria [6]. Apart from the studies carried out on its terpenoids by Couladis et al., Lakhel et al., and Riccobono et al., [3,7,8], *S. argentea* seems to have never been studied chemically unlike other species of the same genus as *S. officinalis*, *S. triloba*, *S. cavaleriei* [9,10]. For this purpose, we have chosen to determine the primary metabolites allowing biochemical characterization of the plant and a quantification of the functional principles of leaves and roots, namely polyphenols, flavonoids and tannins, and to evaluate the Antioxidant activity of some extracts.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), bovine serum albumin, sodium carbonate the Folin–Ciocalteu reagent, gallic acid, catechin, ascorbic acid, methano and iron chloride were purchased from Sigma–Aldrich (Germany).

Plant material

The leaves and roots of *Salvia argentea* were harvested in the region of Tenira (Sidi Bel-Abbès, Algeria) in April 2015. This plant was identified by the Department of Botany of the University of Sidi Bel-Abbès and was kept under the number SA/04.2015 in the laboratory of biotoxicology. The harvested plant material was dried away from moisture and light and then powdered with a crusher and stored in a brown bottle until use.

Preparation of the crude extracts by maceration and under reflux

The leaves and roots of *S. argentea* (10 g) powder were extracted for 24 h with 100 ml of 80% methanol at room temperature. The powdered plant material was contacted with water and the mixture was boiled under reflux for three hours [11]. The extracts obtained were filtered under vacuum and the various filtrates were concentrated to dryness by evaporation in a rotary evaporator (Heidolph instruments). The residues obtained were stored at 4°C.

Physicochemical analyzes

Moisture and ash levels were estimated using the methods described by Audigie et al., 1984 and AOAC, 1990 [12,13]. For fat content, samples (leaves and roots) were continuously extracted with boiling petroleum ether which gradually dissolved the fat using the Soxhlet extractor [14]. The total sugars were determined by dispersing 1 g of powdered sample in 10 ml of 25% (v/v) DMSO in water. The mixture was incubated in a boiling water bath for 15 min. 0.1 ml of this mixture was diluted in 9.9 ml of water. To 0.5 ml of the latter was added 0.5 ml of phenol (5%). After homogenization, 2 ml of H₂SO₄ (75%) were added. This mixture was incubated for 15 min in the water bath, then boiling for 15 min in the dark before reading on the spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments) at 492 nm. Glucose was used as a standard in the calibration range [15]. For protein determination, the protein extract was obtained by adding 0.226 g of ammonium sulfate to 1 ml of the aqueous extract of the sample. After a 12 h cold incubation, the solution was centrifuged at 13400 g at 4°C for 20 min. The supernatant obtained was removed and the pellet taken up in phosphate buffer saline pH 7.4 and then stored at -20°C until assayed [16]. Proteins were assayed by the method of Lowry et al., [17]. Calibration was carried out with Bovine Serum Albumin (BSA) with a concentration range of 0 to 0.25 mg/ml.

Determination of phenolic compounds

Determination of total phenol content

The total phenol content of leaves and roots was determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent [18]. 0.2 ml of each diluted extract or standard gallic acid was mixed with 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent (diluted to 10th with distilled water) and 0.8 ml of 7.5% Na₂CO₃. After 30 min of incubation, the absorbance was measured at 765 nm. The standard curve was carried out using a range of gallic acid concentrations ranging from 0 to 100 mg/L. The results were expressed in milligrams equivalent gallic acid per gram of dry matter (mg GAE/g MS).

Determination of total flavonoids

The aluminum chloride colorimetric method was used for the determination of flavonoids [19]. 0.5 ml of each extract diluted with 1.5 ml of distilled water was mixed with 0.3 ml of 5% NaNO₂. 3 ml of 10% AlCl₃ was added 5 min later. After 6 min, 1 ml of 4% NaOH was added. The solution was well mixed and the absorbance was measured at 510 nm. Catechin was used as the standard for the calibration curve. The total flavonoid contents were expressed in mg catechin equivalent/g dry matter (mg EC/g MS).

Determination of condensed tannins

The extracts of the various parts of the plant (0.1-0.5 ml) were placed in tubes to which 3 ml of a 4% (w/v) vanillin methanol solution were added. After vigorous stirring, 1.5 ml of concentrated HCl was immediately added and the mixture was stirred again. Absorbance was measured at 500 nm after 20 min incubation [20]. The calibration curve was prepared under the same conditions using catechin as standard and the results were expressed in mg catechin equivalent/g dry matter (mg EC/g MS).

DPPH radical scavenging activity

Evaluation of antioxidant activity of the leaves and roots of *S. argentea* was performed by the test 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) according to the protocol recommended by Benhammou et al., 2009 [21] with a slight modification. A methanolic solution (50 µl) of each extract at different concentrations was added to 1.95 ml of the 25 mg/l of DPPH methanol solution. The absorbance was measured at 515 nm after 30 min of incubation in the absence of light and at 37°C. The antioxidant capacity (AC) of the sample in percent (%) was calculated according to the following equation:

$$AC\% = \frac{[Abs\ control - Abs\ extract]}{Abs\ control} \times 100.$$

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The iron reducing activity of the extracts was estimated according to the method of Oyaizu et al., [22]. 0.5 ml of each extract at

different concentrations was mixed with 1.25 ml of a 0.2 M phosphate buffer solution (pH=6.6) and 1.25 ml of a solution of 1% $K_3Fe(CN)_6$ potassium ferricyanide. The whole was incubated at 50°C for 20 min, and then cooled to room temperature. 2.5 ml of 10% trichloroacetic acid were added to stop the reaction and then the tubes were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. 1.25 ml of the supernatant was added to 1.25 ml of distilled water and 250 μ l of a 0.1% iron chloride ($FeCl_3$) solution. The absorbance was read by spectrophotometer (Shimadzu Scientific Instruments) at a wavelength of 700 nm. The positive control was represented by a solution of a standard antioxidant, ascorbic acid, the absorbance of which was measured under the same conditions as the samples.

Statistical analysis

The results are given as mean $\pm$ SD. The statistical evaluation was carried out using the StatView software with an ANOVA analysis followed by the t-test. The value of $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of primary metabolites

The results of the primary metabolites are shown in Figure 1. The water contents expressed as a percentage in the two dried parts (leaves and roots) of *S. argentea* were $8.63 \pm 0.16\%$ for the roots and $9.50 \pm 0.01\%$ for the leaves. According to Paris et al. [23], to ensure good preservation, the water content must be less than or equal to 10%. The studied plant contains a higher level of leaf ash as compared to the roots, with values of $14.68 \pm 0.10\%$ and $9.03 \pm 0.04\%$, respectively. For the fat, the values were relatively low and, contrary to the ash content, the roots have a higher rate ($3.94 \pm 0.05\%$) than the leaves ($2.92 \pm 0.11\%$). The sugar content observed was $4.13 \pm 0.04\%$ in the leaves and only $0.15 \pm 0.12\%$ at the roots. The protein level determined at the leaf level was approximately twice that of the roots with values of $10.73 \pm 0.18\%$ and $5.23 \pm 0.32\%$, respectively.

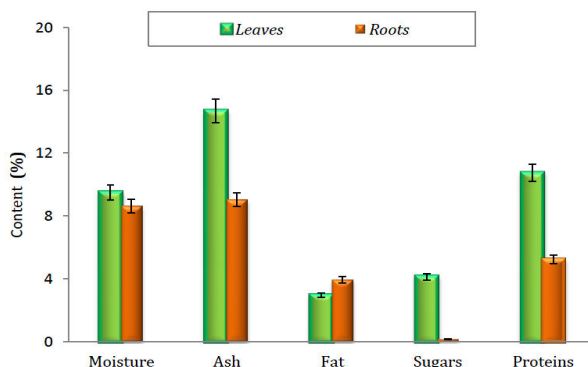


Figure 1: Levels of primary metabolites in leaves and roots of *Salvia argentea* (Values are expressed as mean $\pm$ standard deviations (n=3) with $P < 0.05$ considered to be significant)

Determination of secondary metabolites

Total polyphenols

The total polyphenols, expressed as the gallic acid equivalent of the leaves and roots of *S. argentea*, were assayed using the Folin-Ciocalteu method [18]. The amounts of total polyphenols in the leaves and roots of *S. argentea* were shown in Table 1. The amount of total phenols was higher in the aerial part (MEL) 87.13 ± 0.32 mg GAE/g compared to that of the underground part (MER) 55.64 ± 0.35 mg GAE/g ($p < 0.01$). These levels were also higher than those obtained in aqueous medium with contents of 71.80 ± 0.79 mg GAE/g and 48.20 ± 0.79 mg GAE/g for leaves and roots, respectively. The work of Ben Farhat et al., and Ben Farhat et al., [24,25] reported that the methanolic and aqueous extracts (distillation) of the aerial part of the same species growing in Tunisia had phenolic compound contents of $67.67 - 72.02$ mg GAE/g and $41.47-48.90$ mg GAE/g obtained by the distillation process. The work of Cuceu et al., [26] on methanol extracts of four species of *Salvia*, shows that the polyphenols determined by the Folin Ciocalteu method vary at most 27-37 mg GAE/g dry matter. According to Lamien-Meda et al., [27] the quantitative variations of polyphenols can be due to various factors, geographical, climatic, vegetative phase, genetic equipment and others. These factors may influence the accumulation of phenolic compounds by synthesizing different amounts and/or types of phenolic compounds [28]. According to Lee et al., [29], the extraction and quantification methods can also influence the estimation of the total phenol content.

Table 1: Secondary metabolites contents of leaves and roots of *Salvia argentea*

Extracts	Polyphenols ^a	Flavonoids ^b	Tannins ^b
MEL	87.13 $\pm$ 0.32	59.97 $\pm$ 0.21	3.70 $\pm$ 0.09
MER	55.64 $\pm$ 0.35	31.22 $\pm$ 0.49	5.58 $\pm$ 0.13
AEL	71.80 $\pm$ 0.79	44.16 $\pm$ 0.60	4.01 $\pm$ 0.16
AER	48.20 $\pm$ 0.79	18.12 $\pm$ 0.54	5.83 $\pm$ 0.09

Determination of secondary metabolites

Flavonoid content

MEL and AEL were the richest in flavonoids with levels of 59.97 ± 0.21 mg CE/g and 44.16 ± 0.60 mg CE/g respectively Table 1. However, the MER remains high with 31.22 ± 0.49 mg CE/g whereas the AER was only 18.12 ± 0.54 mg CE/g. Flavonoids represent about 68% of the leaf polyphenols. According to Marin *et al.*; Nazemiyeh *et al.*, and El-Ansari *et al.*, [30-32] the genus *Salvia* was rich in flavonoids. These were widely distributed in species of this genus [33,34].

MEL: Methanolic extract of leaves; MER: Methanolic extract of roots; AEL: Aqueous extract of leaves; AER: Aqueous extract of roots. The values represent the mean $\pm$ SD (n=3). ^aMilligrams gallic acid per gram of dry matter; ^bMilligrams catechin per gram of dry matter.

Content of condensed tannins

A preliminary screening showed the importance of this fraction compared to that hydrolysable. The results were reported in Table 1. AER and MER contain significant amounts of tannins, which were respectively 5.83 ± 0.09 and 5.58 ± 0.13 mg EC/g, somewhat greater than those of AEL and MEL with 4.01 ± 0.16 and 3.70 ± 0.09 mg CE/g ($P < 0.05$), respectively. There were no previous studies that have targeted tannins in this species. The work done by Mahmoudi *et al.*, [35], on *Cynara scolymus* L. shows that decoction is more efficient for tannin extraction (3.05 mg CE/g on average) than maceration (2.35 mg CE/g on average). The increase in temperature favors, on the one hand, the diffusion and solubility of the extracted substances and on the other hand, destroys certain fragile substances [36].

Antioxidant activity

The DPPH radical was generally one of the most widely used substrates for the rapid and direct evaluation of antioxidant activity due to its radical stability and the simplicity of the analysis [37]. The anti-radical activity profile of each extract, tested against the DPPH radical, is shown in Figure 2.

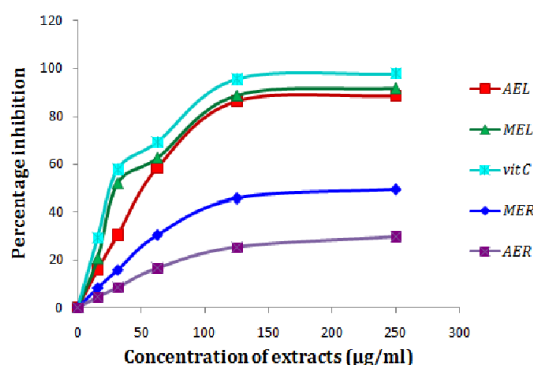


Figure 2: Anti-radical potency of *Salvia argentea* extracts

MEL: Methanolic extract of leaves; MER: Methanolic extract of roots; AEL: Aqueous extract of leaves; AER: Aqueous extract of roots; vit C: Vitamine C. The values used are mean $\pm$ standard deviation (n=3).

The level of DPPH reduced by the various antioxidants, measured at 517 nm, shows that the strongest anti-radical activities concern the methanolic ($91.83 \pm 0.74\%$) and aqueous ($88.59 \pm 0.46\%$) extracts of the leaves, while the lowest activities ($49.29 \pm 0.88\%$ and $29.64 \pm 0.41\%$) were observed respectively for the methanolic and aqueous extracts of the roots at a concentration of 250 µg/ml. These results reveal that *S. argentea* has good antiradical activity particularly for MEL, which has a median inhibition concentration (IC₅₀) of 45.42 ± 0.46 µg/ml. This value was significant compared with other leaf and root extracts Table 2. According to Lafka *et al.*, [38], the antiradical activity can be affected by solvents of different polarity. Also, the antioxidant capacity of polyphenols depends mainly on the content of flavonoids [39].

Table 2: Median inhibition concentration of extracts of leaves and roots of *Salvia argentea*

Extracts	MEL	AEL	MER	AER	Vit C
IC ₅₀ (µg/ml)	45.42 ± 0.46	76.65 ± 0.44	216.89 ± 0.20	416.12 ± 0.26	16.97 ± 0.54

Values are presented as mean $\pm$ SD (n=3) (Figure 2)

The antioxidant activity of the various extracts makes it possible to classify them and show the effectiveness of the solvent in extracting the most antioxidant active ingredients as follows: MEL>AEL>MER>AER.

In view of these different results, the considerable polyphenolic content and the high flavonoid content of *S. argentea* may explain its high free radical scavenging activity due to its oxidation-reduction properties [40].

Iron reducing (FRAP)

The evaluation of the antioxidant activity by reduction of iron is an easy and reproducible method, for this it is very used to discern the most active extracts [41]. For all extracts, cascade dilutions ranging from 1 to 0.0625 mg/ml were prepared and the reducing

powers were measured at 700 nm. According to our results Figure 3, an increase in the absorbance corresponds to an increase in the reducing power of the extracts of *S. argentea*.

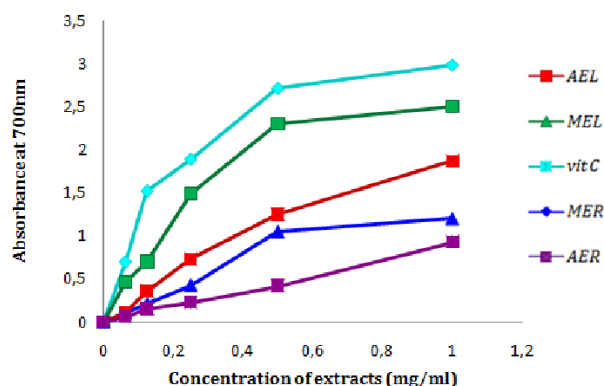


Figure 3: Anti-radical activity of the methanolic and aqueous extracts of the leaves and roots of *Salvia argentea*. The values used are mean $\pm$ standard deviation (n=3)

CONCLUSION

This work has for the first time concerned the determination of the primary and secondary metabolites of silver sage, a lamiaceae, and native of Algeria. Our results give a composition of the primary principles and show that secondary metabolites, mainly leaves, are of definite interest in medical therapeutics. Indeed, the important anti-radical activities of the aerial parts of this plant corroborate the numerous therapeutic virtues conferred on this type of plant since the Middle Age. It remains to value this plant by developing its nutraceutical potential and design for example a functional food containing its principles, with health effect.

REFERENCES

- [1] F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier, *Plant Sci.*, **2001**, 161, 839-851.
- [2] G.P.P. Kamatou, A.M. Viljoen, P. Steenkamp, *Food Chem.*, **2009**, 119, 684-688.
- [3] M. Couladis, O. Tzakou, D. Stojanovic, N. Mimica-Dukic, R. Jancic, *Flavour and Fragrance Journal.*, **2001**, 16, 227-229.
- [4] M. Tosun, S. Ercisli, M. Sengul, H. Ozer, T. Polat, E. Ozturk, *Biol Res.*, **2009**, 42, 175-181.
- [5] M.H. Mirjalili, S. Peyman, A. Sonboli, M.M. Vala, *Chemistry of Natural Compounds.*, **2006**, 42, 1, 19-23.
- [6] P. Quézel, S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Paris, 1963, Ed CNRS, 793.
- [7] H. Lakhal, A. Kabouche, A. Alabdul Magid, L. Voutquenne-Nazabadioko, D. Harakat, Z. Kabouche, *Phytochemistry*, **2014**, 102, 145-51.
- [8] L. Riccobono, A. Maggio, S. Rosselli, V. Ilardi, F. Senatore, M. Bruno, *Natural Product Research.*, **2015**, 30, 1, 1-10.
- [9] M.F. Wang, J. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E.J. LaVoie, C.T. Ho, T.C. Huang, *J. Agr. Food. Chem. Y.*, **1998**, 46, 4869-4873.
- [10] M. Kosar, H.J.D. Dorman, R. Hiltunen, *Food Chem.*, **2005**, 91, 525-533.
- [11] F. Bekkara, M. Jay, M.R. Viricel, *J. Plant. Soil.*, **1998**, 203, 27-36.
- [12] C. Audigie, J. Figarella, F. Zonszaain, Manipulation d'analyse biochimique, Paris, 1984, Ed Doin, 274.
- [13] AOAC, Official methods of analyses, 1990, Washington, DC.
- [14] ISO, Oil seeds, Determination of oil content, 2014, 659.
- [15] J.D. Fox, J.F. Robyt, *Anal. Biochem.*, **1991**, 195, 93-96.
- [16] S. Englard, S. Seifter, *Method. Enzymol.*, **1990**, 182, 285-300.
- [17] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, R. Randall, *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265-275.
- [18] S.Y. Qusti, A.N. Abo-khatwa, M.A. Bin Lahwa, *EJBS.*, **2010**, 2, 1, 1-12.
- [19] J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming, *Food Chem.*, **1999**, 64, 555-559.
- [20] R. Julkunen-Tiitto, *Agric Food Chem.*, **1985**, 33, 2, 213-217.
- [21] N. Benhammou, F. Bekkara, T. Kadifkova Panovska, C. R. Chimie., **2009**, 12, 1259-1266.
- [22] M. Oyaizu, *Japn. J. Nutri.*, **1986**, 44, 307-315.
- [23] R. Paris, M. Moyse, Précis de matière médicale, Paris, 1965, Ed. Masson., 412.
- [24] M. Ben Farhat, A. Landoulsia, R. Chaouch-Hamadaa, J.A. Sotomayorc, M.J. Jordan, *Industrial Crops and Products.*, **2013**, 49, 904-914.
- [25] M. Ben Farhat, A. Landoulsia, R. Chaouch-Hamadaa, J.A. Sotomayorc, M.J. Jordan, *Industrial Crops and Products.*, **2013**, 47, 106-112.

-
- [26] A.V.P. Cuceu, M. Tofană, S. Socaci, M. Nagy, M.D. Borș, L. Salanță, R. Vlaic, Bulletin UASVM Food Science and Technology, 2015, 72, 6-90.
- [27] A. Lamien-Meda, M. Nell, U. Lohwasser, A. Borner, C. Franz, J. Novak, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 3813-3819.
- [28] F. Shahidi, M. Naczk, Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications, 1995, Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc, 1995.
- [29] K.W. Lee, Y.J. Kim, H.J. Lee, C.Y. Lee, *Food Chem.*, **2003**, 51, 7292-7295.
- [30] P.D. Marin, R.J. Grayer, S. Grujic-Jovanovic, G.C. Kite, N.C. Veitch, *Phytochemistry*, **2004**, 65, 9, 1247-1253.
- [31] H. Nazemiyeh, M. Shoeb, N. Movahhedin, Y. Kumarasamy, A.H. Talebpour, A. Delazar, L. Nahar, S.D. Sarker, *Biochemic Systematic and Ecology*, **2006**, 34, 721-723.
- [32] M.A. El-Ansari, D. Barron, M.F. Abdalla, N.A.M. Saleh, *Phytochemistry*, **1991**, 30, 1169-1173.
- [33] T. Adzet, S. Canigueral, J. Iglesias, *Biochemical Systematics and Ecology*, **1987**, 16, 29-32.
- [34] A. Ulubelen, E. Tuzlaci, *Fitoterapia*, **1990**, 61, 185.
- [35] S. Mahmoudi, M. Khali, N. Mahmoudi, *Nature and Technologie*, **2013**, 9, 35-40.
- [36] S. Jokić, D. Velić, M. Bilić, A. Bucić-Kojić, M. Plan inić, S. Tomas, *J. Food Sci.*, **2010**, 28, 206-212.
- [37] M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, *Analyst*, **2002**, 127, 183-198.
- [38] T.I. Lafka, A.E. Lazou, V.J. Sinanoglou, E.S. Lazos, *Food*, **2013**, 2, 18-31.
- [39] H. Fenglin, L. Ruili, H. Bao, M. Liang, *Fitoterapia*, **2004**, 75, 14.
- [40] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Trend. Plant. Sci.*, **1995**, 4, 152-159.
- [41] H.B. Li, K.W. Cheng, C.C. Wong, K.W. Fan, F. Chen, Y. Jiang, *Food. Chem.*, **2007**, 102, 771-776.