

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DE SCIENCE

N° :



DOMAINE: SCIENCE DE LA MATIÈRE

FILIERE : CHIMIE

OPTION : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par :

Ben hamida Zeyneb

Hasni Fahima

Mazouz Khadidja

Intitulé

*Etude Phytochimique et Biologique de L'espèce
Salvia verbenaca L. et Exploration
anti-leishmanienne*

Devant le jury composé de:

Dr. DJERIOU Ammar

Université Mohamed Boudiaf M'sila Président

Dr. LADGHAM CHICOUCHE Mohamed Dj.

Université Mohamed Boudiaf M'sila Encadreur

Dr. TORCHI Ismail

Université Mohamed Boudiaf M'sila Examineur

Année universitaire : 2021/2022



Remerciements

Avant tous, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous remercions notre encadreur Mr Ladghem chikouche Mohamed Djamel qui nous a aidé par ses conseils et ses remarques.

Nous remercions aussi Mme Belhadad .O pour nous avoir accompagné durant cette recherche.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury d'avoir accepté de juger notre travail

Enfin, nous devons à tous ceux qui nous ont aidé, et qui ont participé à la réalisation de cette mémoire :

- *Les enseignants de Département de Chimie.*
- *Les membres du laboratoire de Chimie.*
- *Le personnel de l'Institut de Pasteur M'sila.*
- *Et toute personne qui nous a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*



Dédicaces



Je tiens d'abord à remercier Dieu le tout puissant qui m'a donné le courage, le savoir, la patience de faire ce modeste travail, Ensuite mes vifs remerciements à ma formation notamment notre encadreur monsieur: qui nous a accepté de :

M. Ladghem Chikouche .M Dj

Nous diriger en nous donnant les bonnes actions à la réalisation de cette mémoire.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues Benhamida Zeynebet Hasni Fahima pour toute l'aide qu'ils m'ont fourni.

Je dédie ce travail à mon mari :

« HABOUCHE FAICAL »

Qu'Allah le protège et le préserve pour son soutien et son aide au long de mon travail.

A mes chers enfants :

« NIHAL », « RAGHAD » et « TAMIM »

Qu'Allah les conserve et prolonge leur vie.

A mes frères et sœurs et leurs enfants. . . .

Khadija

Dédicaces



C'est avec l'aide et la grâce du Dieu qu'on achevé ce modeste travail

A mes chers parents

A mon cher mari "Sofiane"

A mes chers frères

Aux petites filles : "Meriem" et "Sirine"

A toute ma famille

A mes amies et mes collègues de travail

A tous ceux qui me sont chers

Que dieu les sauve tous

Fahima

Dédicaces



*Avant tout, merci à Dieu le tout puissant de m'avoir accordé la force, la santé
et les moyens de pouvoir accomplir ce modeste travail.*

A mon très cher mère, qui ma supporte et m'aidée dans les pires moments

A toute ma petite famille

A mon mari "Moussa"

A mes chers filles : Hadjer, Bouchra, Iness

A ma grande famille chacun avec son nom

Zeyneb

Résumé

Les leishmanioses sont des parasitoses aux conséquences socio-économiques lourdes. En effet les traitements disponibles requièrent pour la plupart des administrations parentérales et sont coûteux pour les populations concernées. La recherche de nouvelles molécules actives est donc une nécessité. Pour contribuer à l'effort de recherche d'alternatives thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et biologique de l'espèce de plantes de la famille des lamiacées, *Salvia verbenaca* en l'occurrence. Le criblage phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de substances ayant de grandes valeurs thérapeutiques (flavonoïdes, tanins, terpènes et mucilages). Les résultats obtenus, révèlent la richesse métabolique de cette plante en polyphénols et en flavonoïdes, avec des variations quantitatives et qualitatives d'un extrait à l'autre. L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par le test DPPH, l'extrait hydroéthanolique le plus actif avec de IC_{50} de (23,83 mg/ml).

Le test bactériologique des extraits de la plante sur les trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) montre que l'extrait d'éther de pétrole a une activité modérée.

En effet, cette plante a montré qu'elle possède des quantités intéressantes en flavonoïdes et polyphénols, expliquant probablement cet effet antileishmanien. Mais avant tout cela, il fallait identifier la maladie et particulièrement en Algérie. La plante étudiée à savoir *Salvia verbenaca* L., toutes ses composantes actives, et son utilisation par les différentes populations en phytothérapie traditionnelle, mais également après des études scientifiques publiées dans différentes revues respectables.

Mots-clés : *Salvia verbenaca*, leishmaniose cutanée, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Summary

Leishmaniasis are parasitoses with heavy socio-economic consequences. Indeed, the available treatments require for the most part parenteral administration and are costly for the populations concerned. The search for new active molecules is therefore a necessity. To contribute to the research effort of alternative therapies, we have been interested in the phytochemical and biological study of plant species of the family of lamiaceae, *Salvia verbenaca* in this case. Phytochemical screening revealed the presence of substances with high therapeutic values (flavonoïds, tannins, terpenes and mucilages.). The results obtained reveal the metabolic richness of this plant in polyphénols and flavonoïds, with quantitative and qualitative variations from one extract to another. Thydroethanol de antioxidant activity by the most active DPPH test was most active with IC₅₀ of (23.83 mg/ml).

Bacteriological testing of plant extracts on the three bacterial strains(*Echerichia colil*, *psoudomones*, *staphylococcal*) shows that the extract of petroleum ether has a moderate activity.

Indeed, this plant has shown that it has interesting amounts of flavonoïds and polyphenols , probably explaining this effect antileishmania. But before all this, it was necessary to identify the disease and especially in ALGERIA, The studied plant namely *Salvia verbenaca* L, all its active components, and its use by the different populations in traditional herbal medicine, but also after scientific studies published in various respectable journals.

Keywords: *Salvia verbenaca*, leishmania, polyphenols, flavonoïds, antioxidant activity, antibacterial activity.

المخلص :

داء الليشمانيات هو طفيليات لها عواقب اجتماعية واقتصادية وخيمة. في الواقع، تتطلب العلاجات المتاحة في الغالب الإدارة الوريدية وهي مكلفة للسكان المعنيين. لذلك فإن البحث عن جزيئات نشطة جديدة ضروري. للمساهمة في الجهود البحثية للعلاجات البديلة، كنا مهتمين بالدراسة الكيميائية النباتية والبيولوجية لأنواع النباتية من عائلة *lamiaceae, Salvia verbenaca* في هذه الحالة. سمح النبات الكيميائي النباتي بالمتري كدليل على وجود مادة ذات قيمة علاجية كبيرة (الفلافونويد والعفص والتربينات والعصبيات). تكشف النتائج التي تم الحصول عليها عن الشراء الأيضي لهذا النبات في البوليفينول والفلافونويد مع اختلافات كمية ونوعية من مستخلص إلى آخر. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات من خلال اختبار DPPH ، وهو أكثر استرات الهيدروميثانول نشاطاً مع IC50 من (23.83 ملجم/مل).

يُظهر الاختبار البكتريولوجي لمستخلصات النبات على السلالات البكتيرية الثلاث (*staphy, psoudo, E.col*) أن مستخلص الإيثر البترولي له نشاط متواضع.

في الواقع، أظهر هذا النبات كميات مثيرة للاهتمام من الفلافونويد والبوليفينول، مما يفسر على الأرجح هذا التأثير المضاد لليشمانيا. ولكن قبل كل هذا، كان من الضروري تحديد المرض وخاصة في الجزائر، النبات الذي تمت دراسته وهو سالفيا فيربيناكا، وجميع مكوناته النشطة، واستخدامه من قبل المجموعات المختلفة في طب الأعشاب التقليدي، ولكن أيضاً بعد الدراسات العلمية المنشورة في العديد من المجالات المحترمة، كان هذا موضوع دراستنا البيولوجية في هذا الموجز.

الكلمات الرئيسية: سالفيا فيربيناكا، الليشمانيا الجلدية، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

Table des matières

Résumé	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Liste des abréviations et symboles	
Introduction générale.....	1

Partie I: synthèse bibliographique

Chapitre I. Etude bibliographique du genre *Salvia* *Verbenaca*

I.1 La famille de Lamiacées.....	3
I.1.1 Introduction	3
I.1.2 Description botanique des Lamiacées.....	4
I.1.3 L'importance de la famille des Lamiacées.....	4
I.1.4 Phytothérapie des Lamiacées.....	5
I.2 Le genre <i>Salvia</i>	5
I.2.1 Description botanique du genre <i>Salvia</i>	5
I.2.2 Utilisation du genre <i>Salvia</i>	6
I.2.3 Les métabolites secondaires isolés du genre <i>Salvia</i>	6
I.2.4 Les composés phénoliques isolés du genre <i>Salvia</i>	7
I.3 <i>Salvia verbenaca</i> Linn de la famille Lamiaceae.....	8
I.3.1 Classification taxonomique.....	8
I.3.2 Description de la plante (<i>S. verbenaca</i>).....	8
I.3.3 Utilisation thérapeutique.....	10
I.4 Travaux antérieurs.....	11
I.4.1 Composition Chimique.....	11
I.4.2 Les composés phénoliques.....	13
I.4.3 Activités biologiques.....	13
I.4.4 Activités antileishmanienne.....	13

I.5	Principales classes des composés phénoliques.....	14
I.5.1	Les acides phénols.....	14
I.5.2	Les coumarines.....	14
I.5.3	Les tanins.....	15
I.5.4	Les flavonoïdes.....	15
I.5.4.1	Propriétés des flavonoïdes.....	17
I.5.4.1.1	Propriétés anticancéreuses.....	17
I.5.4.1.2	Propriétés antibactériennes.....	18
I.5.4.1.3	Activité antileishmanienne.....	18
I.5.4.1.4	Activité antioxydante.....	20

Chapitre II. La leishmaniose cutanée

II.1	Introduction.....	22
II.2	Définition des leishmanioses.....	23
II.3	Les différentes formes de la leishmaniose.....	23
II.3.1	La forme viscérale (LV).....	23
II.3.2	La forme cutanéomuqueuse (LCM) ou Espundia.....	23
II.3.3	La forme cutanée (LC) ou Bouton d'Orient.....	24
II.3.4	Formes cliniques de la leishmaniose cutanée.....	24
II.3.4.1	La leishmaniose cutanée localisée (LCL).....	24
II.3.4.1.1	Incubation.....	25
II.3.4.1.2	Invasion.....	25
II.3.4.1.3	Évolution.....	25
II.3.4.1.4	Formes cliniques de (LCL).....	25
II.3.4.2	La leishmaniose cutanée diffuse (LCD).....	26
II.3.4.3	La leishmaniose cutanéomuqueuse.....	27
II.3.4.4	Formes évolutives de la leishmaniose cutanée.....	28
II.3.4.4.1	Leishmaniose cutanée récidivante.....	28
II.3.4.4.2	Leishmaniose cutanée avec lymphangite nodulaire.....	28
II.3.4.4.3	Leishmaniose cutanée chronique.....	29
II.4	Les types de la leishmaniose cutanée en Algérie.....	29
II.4.1	La leishmaniose cutanée zoonotique.....	29
II.4.2	La leishmaniose cutanée sporadique du Nord.....	30
II.5	Distribution géographique de la leishmaniose cutanée.....	30
II.5.1	Leishmaniosescutanées en Algérie.....	31
II.6	Diagnostic des leishmanioses.....	32

II.6.1	Techniques modernes permettant la détection du parasite.....	32
II.6.2	Examens sérologiques.....	32
II.7	Traitement des leishmanioses.....	32
II.7.1	Aperçu bibliographique sur les plantes médicinales ayant une activité antileishmanienne.....	32
II.7.2	Traitement de première intention.....	35
II.7.3	Traitement de seconde intention.....	35

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre III. Matériels et Méthodes

III.1 Matériels

III.1.1	Matériel végétal.....	38
III.2	Méthodes.....	39
III.2.1	Méthodes d'extraction.....	39
III.2 .1.1.	Extraction par décoction.....	39
III.2 .1.2.	Extraction par infusion.....	39
III.2 .1.3.	Extraction par macération.....	39
III.2 .1.4.	Extrait d'éther de pétrole.....	39
III.2 .1.5.	Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	40
III.2.2	Screening phytochimique.....	41
III.2.2.1	Substances polyphénoliques.....	41
III.2.2.1.1	Les tanins.....	41
III.2.2.1.2	Les flavonoïdes.....	41
III.2.2.2	Les coumarines.....	42
III.2.2.3	Les saponosides.....	42
III.2.2.4	Les mucilages.....	42
III.2.2.5	Les stérols et triterpènes.....	43
III.2.2.6	Les alcaloïdes.....	43
III.2.3	Analyse quantitative des composés phénoliques.....	44
III.2.3.1	Dosage des polyphénols.....	44
III.2.3.2	Dosage des flavonoïdes.....	44

III.2.4	L'activité antioxydante par le test au DPPH (effet scavenger).....	45
III.2.5	L'activité antibactérienne.....	46
III.2.5.1	Souches utilisées.....	46
III.2.5.2	Antibiotique (ATB) en disque.....	46
III.2.5.3	Repiquage des espèces bactériennes.....	46
III.2.5.4	Préparation des milieux de culture.....	46
III.2.5.5	Préparation de l'inoculum.....	46
III.2.5.6	Préparation des disques.....	47
III.2.5.7	Dilution des extraits.....	47
III.2.5.8	La lecture.....	47

Chapitre IV. Résultats et Discussion

IV.1	Procédés d'extraction.....	49
IV.2	Résultats de screening phytochimique.....	50
IV.3	Résultats d'analyse quantitative des composés phénoliques.....	52
IV.3.1	Dosage des polyphénols.....	52
IV.3.2	Dosage des flavonoïdes.....	53
IV.4	Résultats d'activité antioxydante par les tests au DPPH.....	54
IV.5	L'activité antibactérienne.....	56
	Conclusion générale.....	61
	Références bibliographiques.....	63

Liste des Figures

Figure I.1 : Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées.....	03
Figure I.2 : Aspect d'une plante de Salvia.....	05
Figure I.3 : les feuilles d'une Salvia.....	05
Figure I.4 : les fleurs d'une Salvia.....	06
Figure I.5 : les graines d'une Salvia.....	06
Figure I.6 : Les structures de quelques flavonoïdes et des acides phénoliques isolés du genre Salvia.....	07
Figure I.7 : Aspect morphologique de Salvia verbenaca.....	10
Figure I.8 : (I) la verbénacine ; (II) la salvinine.....	11
Figure I.9 : Structures de base des flavonoïdes.....	15
Figure I.10 : Sites caractéristiques structuraux des flavonoïdes.....	20
Figure II.1 : Leishmaniose cutanée diffuse.....	26
Figure II.2 : Aspect léonin typique.....	26
Figure II.3 : Espundia « Nez de tapir ».....	27
Figure II.4 : Lésion débutante de la muqueuse nasale	27
Figure II.5 : Leishmaniose récidivante	28
Figure II.6 : Leishmaniose cutanée avec lymphangite nodulaire	28
Figure II.7 : Cas de leishmaniose cutanée zoonotique	29
Figure II.8 : Répartition des cas déclarés de leishmaniose cutanée en 2009 par wilaya.....	31
Figure III.1 : Photo de la plante Salvia verbenaca fraîche, sèche et broyée.....	38
Figure III.2 : Montage d'extraction d'huile essentielle par Clevenger.....	40

Figure III.3 : Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant.....	45
Figure IV.1 : Rendements des extraits de <i>Salvia verbenaca</i> exprimés en pourcentage.....	49
Figure IV.2 : Les images de quelques résultantes de la réaction de caractérisation.....	51
Figure IV.3 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	52
Figure IV.4 : Les valeurs de teneurs en polyphénols.....	53
Figure IV.5 : Courbe d'étalonnage de Quercétine	53
Figure IV.6 : Les valeurs des teneurs des flavonoïdes.....	54
Figure IV.7 : Activité inhibitrice du radical DPPH par les extraits de <i>Salvia verbenaca</i>	55
Figure IV.8 : Valeurs des IC50 de différents extraits de <i>Salvia verbenaca</i>	56
Figure IV.9 : Les résultats de l'extrait d'éther de pétrole.....	58
Figure IV.10 : Résultats de l'antibiotique.....	58

Liste des Tableaux

Tableau I.1 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia verbenaca</i> issue de la Grèce	12
Tableau I.2 : Principales classes des flavonoïdes	16
Tableau I.3 : Quelques polyphénols et flavonoïdes antileishmaniens.....	19
TableauII.4 : Quelques plantes antileishmaniennes.....	33-34
Tableau IV.1 : Comparaison des rendements en huile essentielle d'espèce étudié avec ceux des travaux antérieurs.....	50
Tableau IV.2 : Résultats de screeningphytochimique.....	51
Tableau IV.3 : Activité antibactérienne des extraits de <i>Salvia verbenaca</i>	57
Tableau IV.4 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus par différentesconcentrations dans EEP.....	57
Tableau IV.5 : Résultats de l'antibiogramme de l'antibiotique Gentamycine.....	58

Liste des abréviations et symboles

LC : Leishmaniose cutanée

LCD : Leishmaniose Cutanée Diffuse

LCL : Leishmaniose Cutanée Localisée

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse

LCS : Leishmaniose Cutanée Sporadique

LCZ : Leishmaniose Cutanée-Zoonotique

LV: Leishmaniose viscérale

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

WHO :World Health Organisation

IL : interleukine

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

ARN : Acide Ribonucléique

NADPH :Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen

C3-C6 :carbone 3-carbone 6

RP-HPLC :Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatographic Method

Mm : Millimètres

µg :Microgramme

IC₅₀ : La concentration inhibitrice de 50% .

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

g : Gramme

µl : Microlitre

cm : Centimètre

nm : Nanomètre

°C : Degré celsius

mL : Millilitre

h : Heure

min : Minute

FeCl₃ : Trichlorure de fer

H₂SO₄ : Acide sulfurique

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

HCl : Acide chlorhydrique

UV : Ultra-violet

EAG : Equivalent en acide gallique

EQ : Equivalent en quercétine

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

% : Pourcentage

E.coli : Escherichia coli

Pseud. : Pseudomonas aeruginosa

Staph. : Staphylococcus aureus

Introduction générale

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement, afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies [1]. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 81% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire [2]. Les médicaments à base de plantes sont encore largement utilisés, et ont une importance considérable dans le commerce international [3].

Laleishmaniose cutanée fait des ravages en Algérie et notamment dans les régions les plus démunies. Elle défigure les visages surtout, car l'agent vecteur du parasite est un genre de moustique (le phlébotome) qui s'attaque aux parties découvertes des corps. Les traitements conventionnels à base d'Antimoine Pentavalent, en plus de leur prix excessivement cher, n'est pas tout à fait efficace. Il est donc nécessaire de trouver des alternatives, et des regards se sont penchés sur la phytothérapie, c'est-à-dire l'utilisation des plantes.

L'objectif de ce travail était de rechercher par extraction des substances naturelles actives présentes dans l'espèce *Salvia verbenaca*.

De ce fait, on a tout d'abord fait une étude bibliographique consacré à l'étude botanique et phytochimique générale au genre *Salvia* et notamment l'espèce *Salvia verbenaca* ainsi que quelques substances actives de la plante.

En suite on a consacré une étude bibliographique sur la leishmaniose cutanée.

En fin et l'essentiel de notre apport s'est focalisé sur la partie expérimentale en présentant les différentes méthodes d'extraction et les protocoles utilisés dans les dosages, l'évaluation d'activité antioxydante par le test DPPH et l'activité antibactérienne.

Le dernier chapitre de cette partie, présente les résultats obtenus et leurs interprétations. Nous terminerons en fin notre travail par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus et des horizons sur la suite de ces travaux dans le futur.

Chapitre I

Etude bibliographique du genre *Salvia Verbenaca*

I.1. La famille Lamiacées

I.1.1.Introduction

Les lamiacées constituent une importante famille de plantes angiospermesdicotylédones qui comptent entre 233 à 263 genres, et de 6900 à 7200 espèces [4 ; 5] qui se répartissent sur tout le globe (**Figure I.1**). C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces. La plupart des plantes de cette famille sont partiellement ligneuses, formant des arbustes,et très rarement des arbres. C'est la famille des plantes aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie ou en pharmacie, comme la ballote, le basilic, la bugle, l'hysope, la lavande, la marjolaine et la mélisse. Il s'agit d'une grande famille, très typique du monde végétal, qui possède une importance économique due à sa richesse en huiles essentielles,et dans la production du miel (les miels de lavande et de romarin sont très réputés).Elle est très répandue dans les régions tempérées surtout méditerranéennes[6 ; 7].

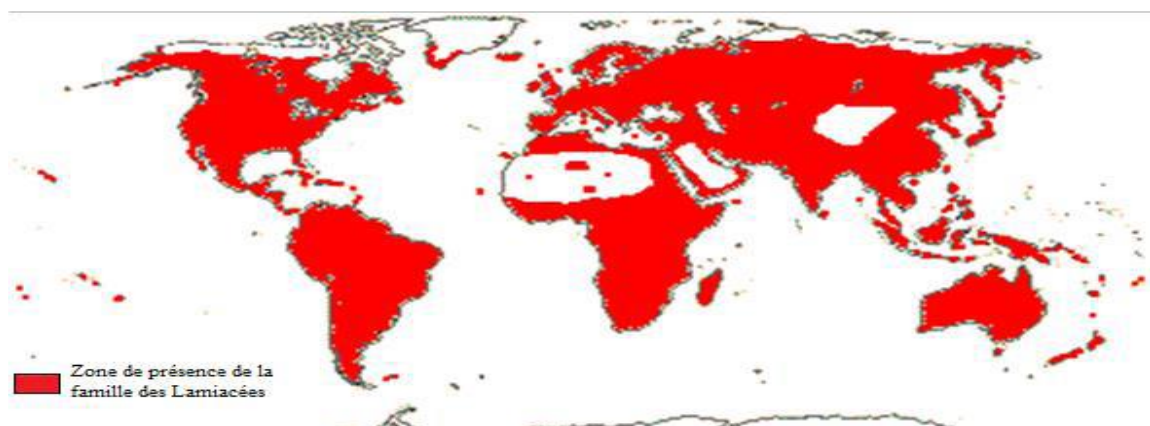


Figure I.1 : Carte de répartition géographique de la famille des Lamiacées

I.1.2. Description botanique des Lamiacées

Les Lamiacées sont le plus souvent des plantes herbacées, annuelles ou vivaces aromatiques, des sous-arbrisseaux et rarement des arbres [8].

Les feuilles opposées sont simples, parfois amplexicaules, toujours sans stipule et à limbe penninerve. La section de la tige est généralement quadrangulaire [9].

Les fleurs à deux lèvres, en glomérules verticillés ou en épi sur des tiges feuillées quadrangulaires, parfois fleurs solitaires, fleurs hermaphrodites, généralement zygomorphes. Cinq sépales généralement soudés, calice actinomorphe à zygomorphes plus ou moins tubuleux, campanulées ou rotacé, persistant, parfois accrescent dans le fruit. 5 Pétales généralement soudés, corolle bilabée, à lobes imbriqués, sauf chez *Ajuga* et *Teucrium* où la lèvre inférieure est trilobée et la supérieure bilobée [10].

I.1.3. L'importance de la famille des Lamiacées :

Cette famille comporte de nombreuses plantes exploitées pour les essences ou cultivées pour l'ornementation et la plupart de ces espèces sont aussi bien utilisées dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne.

La famille des Lamiacées contient une très large gamme de composés comme les trapézoïdes, les iridoïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les huiles essentielles et plus précisément les courtes chaînes des terpénoïdes qui sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des Lamiacées.

La plupart des espèces de la famille des Lamiacées sont censés contenir des composés qui possèdent des propriétés aromatiques, la plupart des études se sont concentrées sur leurs composants d'huile essentielle [10].

La famille des lamiacées regroupe un grand nombre d'espèces d'intérêt économique majeur et dont les applications sont très variées, comme la parfumerie, la cuisine, la phytothérapie et l'aromathérapie [11].

I.1.4. Phytothérapie des Lamiacées

Cette famille est utilisée en médecine traditionnelle et moderne, comme *Lavandula*, *Teucrium*, *Thymus* et *Salvia*. Plusieurs travaux, réalisés *in vitro* et *in vivo*, rapportent des résultats intéressants pour certaines molécules antioxydants d'origine végétale telles que les dicatéchols, la curcumine, les triterpènes pentacycliques et les flavonoïdes.

Dans la pharmacopée traditionnelle africaine, les plantes de la famille Lamiacée sont utilisées comme diurétique, antisiphilitique, anti-diarrhéique, cicatrisante, antiseptique et dans le traitement de nombreuses affections telles que les problèmes intestinaux ou encore le météorisme [12].

Le genre *salvia* (sauge) fait partie de genres les plus importants de la famille des lamiacées comprenant près de 900 espèces identifiées à travers le monde [13]. Elles sont aussi bien répandues dans les zones tempérées que subtropicales [14].

I.2. Le genre *Salvia*

I.2.1. Description botanique du genre *Salvia*:

Ce sont des arbustes ou des plantes herbacées, elles peuvent être annuelles bisannuelles ou vivaces selon l'espèce, calice bilabié variable, à lèvre supérieure tridentée, et à lèvre inférieure bidentée, corolle bilabiée. Elle comporte 2 étamines, chacune à filet court surmonté d'un long connectif à 2 branches inégales, l'une portant une loge de l'anthere et l'autre la plus courte une écaille, ou terminée en pointe [15 ;16].



Figure I.2 : Aspect d'une plante
Salvia



Figure I.3 : les feuilles d'une *Salvia*



Figure I.4 : les fleurs d'une *Salvia*



Figure I.5 :
les graines d'une *Salvia*

I.2.2. Utilisation du genre *Salvia*:

De nombreuses espèces de *Salvia* sont utilisées comme tisane, comme condiments, en cosmétique et dans les industries agroalimentaire et pharmaceutique. Plusieurs espèces de *Salvia* sont utilisées pour leurs propriétés biologiques et pharmacologiques comprenant leurs effets antibactériens, antiviraux, antioxydants, antipaludéens, anti-inflammatoires, antidiabétiques, cardiovasculaires et anticancéreux. Certaines de ces propriétés ont été attribuées à leurs huiles essentielles [17].

Ces espèces sont riches en flavonoïdes et composés phénoliques tels que (l'acide caféique, le rosmarinique, le chlorogénique, l'ellagique et le gallique) [18].

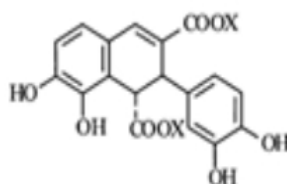
I.2.3. Les métabolites secondaires isolés du genre *Salvia*:

Les métabolites secondaires se définissent comme les molécules produites par des organismes vivants (plantes, champignons, bactéries...) ne jouant pas de rôle direct pour les fonctions vitales de l'organisme, c'est-à-dire la nutrition, la croissance et la reproduction.

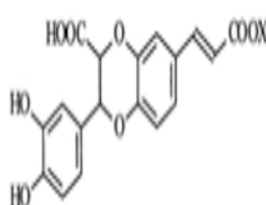
Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Salvia* ont permis de montrer que ses principaux marqueurs chimiotaxonomiques sont les composés phénoliques tels que les flavonoïdes [18].

I.2.4. Les composés phénoliques isolés du genre *Salvia*

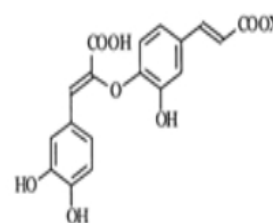
Les composés phénoliques ou polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires, caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle. Dans cette catégorie, on trouvera les acides phénoliques simples (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique), les coumarines et les squelettes C6-C3-C6 dérivant de l'extension du phényle tels que les chalcones, les flavones, les flavonols ou les dérivés du type flavane ou flavane-3-ol. On considère également les formes polymérisées : lignanes, lignines et tanins condensés[19].



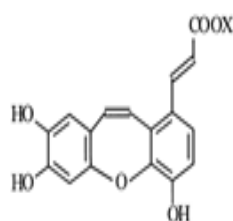
Acide salvianolique



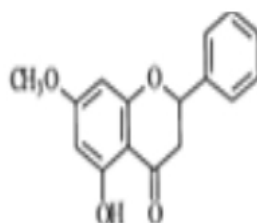
Acide salvianolique



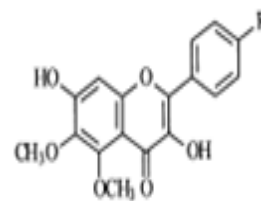
Acide salvianolique



Acide isosalvianolique

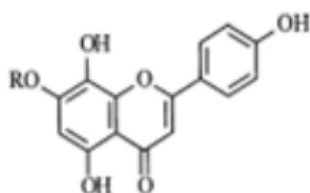


5-Hydroxy-7-methoxyflavanone



(R-OH) 5,6-Dimethyl ether

(R-H) 6-Hydroxygalangin-5,6-dimethyl ether



(R=H) 8-Hydroxyapigenin (isoscuteallarein)

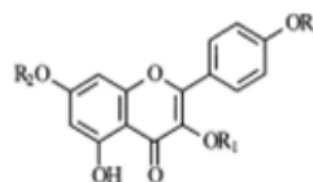
(R=CH₃) 3,6,4'-Trimethyl ether (santin)(R₁=R₂=R₃=H) 5,7,4'-Trihydroxyflavonol(R₁=CH₃, R₂=R₃=H) 3-Methyl ether (isokaempferide)(R₁=R₂=CH₃, R₃=H) 3,7-Dimethyl ether (kumatakenin)

Figure I.6 : Les structures de quelques flavonoïdes et des acides phénoliques isolés du genre *Salvia*

I.3. *Salvia verbenaca* L. de la famille Lamiaceae

Le nom *Salvia* est dérivé du latin "salvare" qui signifie «guérir ou être sûr et indemne» en se référant aux propriétés médicales de certaines espèces [20]. Ce genre englobe environ 900 espèces, répandues dans le monde entier et comprend plusieurs espèces ornementales, culinaires et médicinales parmi eux *Salvia verbenaca* L.[21].

Salvia verbenaca est une plante herbacée vivace qui peut agrandir jusqu'à 80 cm d'hauteur, mais habituellement moins de 50 cm. Elles s'appelle en Français sauge-verveine, sauge à feuilles de verveine ou sauge fausse verveine. En Anglais verbena sage, vervain sage ou wild clary. En Algérie et exactement dans la Wilaya de M'sila elle s'appelle "Oum lemdhamedh", alors qu'en Tunisie et au Maroc elle est nommée "Al-khyyata" ou "khiyyata"[22 ; 23]. Elle se trouve en général, à assez basse altitude ; elle peut s'élever jusqu'à 865m. Elle s'élève en Europe, au sud-ouest de l'Asie, au nord de l'Afrique et naturalisé dans l'Amérique du nord [24].

I.3.1. Classification taxonomique

Royaume : Plantae
Sous royaume : Tracheobiontes
Embranchement : Spermatophytes
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous classe : Asteridae
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae
Genre : *Salvia*
Espèce : *verbenaca* L. [25].

I.3.2. Description de la plante (*S. verbenaca*)

- **Tiges et feuilles:** Les tiges sont quadrangulaires et poilues modérément à densément. Les feuilles sont portées par paires le long des tiges et sont de forme assez variable (**Figure I.7**). Elles vont de la forme elliptique à la forme ovale avec des contours dentelés (crénelées), lobés ou profondément divisées (pinnatisées ou pinnatisectes). Les feuilles inférieures (2.5 à 10 cm de long et 1.5 à 8 cm de large) sont portées sur des pétioles de 1 à 10 cm de long et dotées de pointes pointues ou parfois arrondies, tandis que les feuilles supérieures sont plus

petites et stalkless (sessiles). Les feuilles sont également un peu velues (pubescent) avec une texture superficielle de grêle[26].

- **Fleurs** : sont tubulaires de 7 à 13 mm de long, portées dans des grappes allongées au bout des branches ou les racèmes terminales. Elles sont disposées en verticilles de 6 à 10 au-dessus de bractées de petites feuilles. Chaque fleur est stalkless (sessile) ou portée sur un pédicelle très court jusqu'à 2 mm de long. Ces fleurs ont cinq sépales violacés ou verts (de 3.5 à 9 mm de long) moyennement velus. Les sépales sont fusionnés ensemble dans un tube finement nervuré (tube de calice) qui a un large lobe supérieur à trois dents (la lèvre supérieure) et un lobe inférieur à deux dents plus étroit (la lèvre inférieure). Les pétales principalement sans poils sont également fusionnés ensemble à la base dans un tube (le tube de la corolle). Ils sont bleus, violets, roses ou de couleur lilas et se séparent également en deux lobes (lèvre supérieure et inférieure). La lèvre supérieure est encapuchonnée, tandis que la lèvre inférieure est à trois lobes. Chaque fleur a également deux étamines et un ovaire surmonté d'un style et inégalement stigmatisé à deux lobules. La floraison se produit tout au long de l'année [26].

- **Fruits** : (le schizocarpe) se divise en quatre segments d'une seule graine (des méricarpes ou des nutlets) à maturité. Ces «graines» brunes (2-3 mm de long et 1.8-2 mm de large) sont largement ovales (largement ovoïdes) et de texture lisse [26].

- **La racine** est longue, fibreuse, et pousse une ou deux tiges grêles, un peu velues, presque simples, et hautes de 50 cm. Les feuilles sont pétiolées, oblongues, assez glabres, veinées en dessous, obtuses à leur sommet, fortement crénelées en leur bord, et même un peu sinuées à leur base ; elles sont presque pinnatifides dans la variété /2 : les fleurs sont fort petites, à peine pédonculées, et forment un épi très-menu ; elles sont d'une couleur bleue (**Figure I.7**), et leurs verticilles sont un peu écartés. Cette plante croît dans les prés secs et montagneux [26].



Figure I.7 : Aspect morphologique de *Salvia verbenaca*.

I.3.3. Utilisation thérapeutique

Le genre *Salvia* a été utilisé dans la médecine traditionnelle de la Chine, l'Afrique du Sud et de nombreux autres pays contre diverses maladies infectieuses et inflammatoires, le paludisme, les gonflements durs, les abcès, les tumeurs et le cancer. Il est rapporté aussi que les espèces *Salvia* ont des effets contre diverses maladies telles que les troubles respiratoires et gastro-intestinaux, l'hépatite, les maladies cardiovasculaires, la perte de mémoire, les troubles menstruels, les fausses couches et l'insomnie [27]. En médecine traditionnelle d'Afrique du Nord, le genre *Salvia* est l'un des remèdes de plantes les plus populaires. Cependant, la décoction de la partie aérienne était utilisée comme cholagogue, antiseptique, diurétique et astringent [23]. Beaucoup d'espèces de *Salvia* sont utilisées comme tisanes et arômes alimentaires, ainsi que dans les cosmétiques, la parfumerie et l'industrie pharmaceutique [28].

En ce qui concerne *S. verbenaca*, dans les environs de la wilaya de M'sila en Algérie ainsi que en Tunisie et en Maroc, les feuilles fraîches hachées sont appliquées, en cataplasme, sur les plaies et les abcès vidés pour faciliter leur cicatrisation. Il est mentionné aussi dans le catalogue des plantes aromatiques et médicinales du Haut Atlas oriental, que le décocté des feuilles de *S. verbenaca*, est consommé pour traiter les spasmes, les coliques, l'anxiété et que la tisane des feuilles peut être utilisée pour traiter la frigidité, la grippe, la pharyngite, et les angines [23; 29].

I.4. Travaux antérieurs

I.4.1 Composition Chimique

L'espèce *Salvia verbenaca* a fait l'objet de quelques études chimiques, une réalisée par Holeman M et al;(1985).[30], sur l'espèce issue du Maroc, qui a donné une teneur majoritaire de l'huile essentielle en α -pinène, 1,8-cinéol, camphre, et en bornéol., rapportent que l'analyse de l'huile essentielle de *Salvia verbenaca* poussant à l'état spontané en Grèce, a permis d'identifier dix-neuf composés dont les principaux sont le β -Phellandrène, le (E)-Caryophyllène et le méthyl ester de l'acide 6-octadécénoïque[31].

Deux diterpènes (Figure I.8) ont été isolés de la partie aérienne de *Salvia verbenaca* ; la verbénacine (3, α -hydroxy-19-carboxykaur-15-ène) et la salvinine (19-hydroxy-12,14-dioxolabda-15,17-diène)[32].

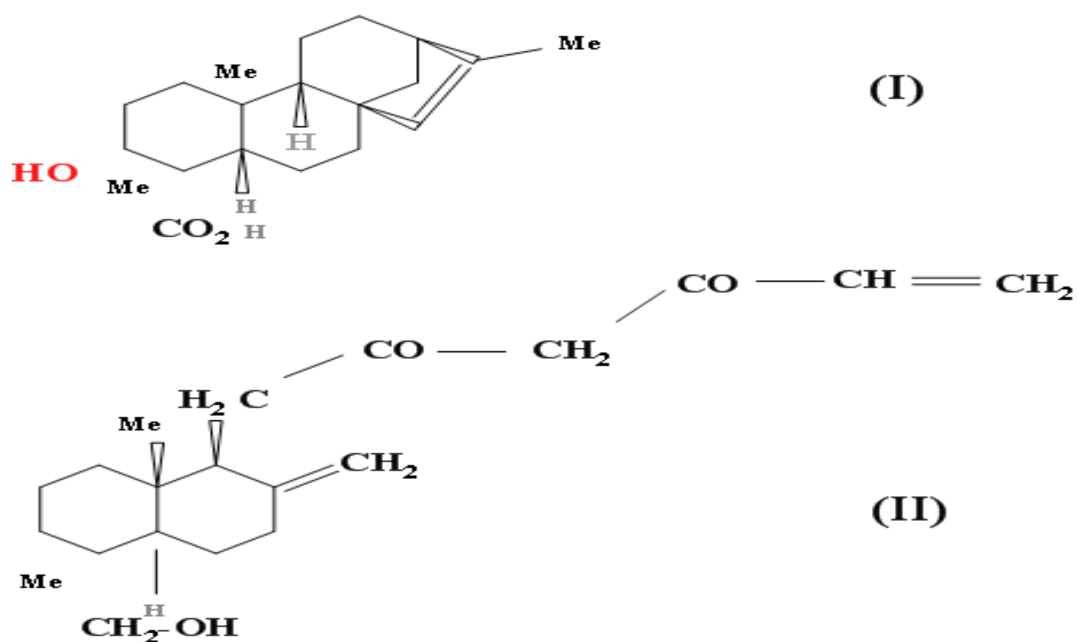


Figure I.8 : (I) la verbénacine ; (II) la salvinine.

Tableau I.1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia verbenaca* issue de la Grèce avec modification [31].

Composés	Nature	IR	%
α -Pinène	monoterpène	918	T
Sabinène	monoterpènes	955	T
β -Pinène	monoterpènebicyclique	958	T
Myrcène	monoterpène	961	T
β -Phellandrène	hydrocarbure monocyclique	999	30.3
δ -3-Carène	monoterpènes bicycliques	1001	T
(Z)- β - Ocimène	monoterpènes	1009	6.6
(E)- β -Ocimène.	monoterpènes	1017	T
Fenchone	Terpène polycyclique	1052	9.4
Camphre	monoterpénols	1110	7.0
(E)-Caryophyllène	sesquiterpène	1382	16.1
Aromadendrène	sesquiterpène	1405	4.0
α -Humulène	sesquiterpène	1418	3.7
<i>Allo-Aromadendrène</i>	sesquiterpène	1423	T
D- Germacrène	sesquiterpène	1451	T
Oxyde de caryophyllène	sesquiterpène	1551	T
Viridiflorol	sesquiterpénole	1560	T
Isopropyl ester de l'acide laurique	Acide gras	1574	7.8
Méthyle ester de l'acide 6-Octadécénoïque	Acide gras	2198	15.0

t:trace. **IR**: indice de rétention.

I.4.2. Les composés phénoliques

La détermination qualitative et quantitative des polyphénols dans l'extrait méthanolique de *S. verbenaca* évaluée par RP-HPLC couplée à un détecteur UV multi-longueurs d'onde a révélé un profil chimique composé de 18 composés phénoliques individuels. Ces composés ont été répartis dans trois classes: **1)** Sous forme d'acides phénoliques (acide p-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique, acide férulique et acide rosmarinique), **2)** Des diterpènes phénoliques (acide carnosique, carnosol, méthylcarnosate) et **3)** Sous forme de Flavonoïdes: Flavanones (naringénine, naringine), flavones (lutéoline, cirsiol, apigénine, cirsilinoléol, genkwanine) et flavone glycosides (apigénine-7-glucoside)[22].

I.4.3. Activités biologiques

Des études biologiques ont montré que l'extrait méthanolique de *Salvia verbenaca* provenant de la Tunisie, possède des activités antibactériennes et antioxydantes modérées par rapport à d'autres espèces du genre *Salvia*[33].

I.4.4. Activités antileishmanienne

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que les extraits de n-hexane et le dichlorométhane de la plante *Salvia verbenaca* ont montré qu'ils induisaient une activité d'inhibition importante et dépendante de la dose contre les promastigotes de *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum* promastigotes souches[34].

I.5. Quelques substances actives de la plante (Principales classes des composés phénoliques)

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par :

- La complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées).
- Le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, déméthylation, ...).
- Les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines ou autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques).

I.5.1. Les acides phénols

Les acides phénols sont des dérivés de l'acide cinnamique, et l'acide benzoïque. Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques urinaires, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétique, et immunostimulants [35].

I.5.2. Les coumarines

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels et donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont : les Légumineuses, les Rutacées, les Apiécées et les Thymelacées. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines.

Les coumarines sont des composés phénoliques végétaux, portant un groupement benzopyrone dans leur structure [36].

Les coumarines sont des molécules biologiquement actives ayant diverses activités : antiagrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante (au niveau du cœur), anti tumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique. Pour leur activité antibactérienne, elles sont efficaces contre les bactéries à gram positif [37].

I.5.3. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux et surtout les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (Figure 11) [38]. Caractérisées par leur astringence, ils ont la propriété de précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides. Ils sont abondants dans les organes végétaux jeunes. Deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique sont distingués : les tanins hydrolysables et les tanins vrais (non hydrolysables). Certains tanins auraient des propriétés antioxydantes et bactériostatiques [39].

I.5.4. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde signifie jaune en latin (= *flavus* en latin), il désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols

Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [37;38].

La plupart des flavonoïdes ont une structure de base relativement simple. Ils sont composés de deux cycles aromatiques de type phényle (A et B) liés par une chaîne de trois (3) atomes de carbone généralement cyclique, soit un système C6–C3–C6 dont la configuration est la suivante [44].

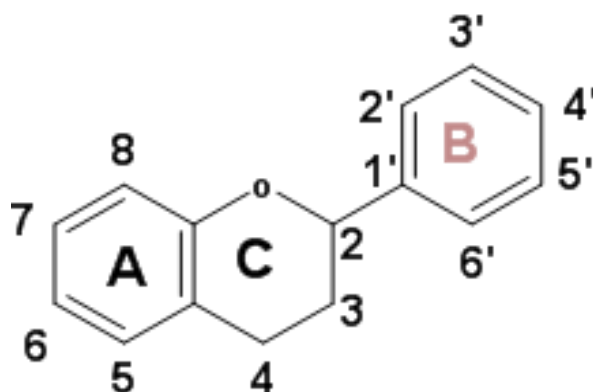


Figure I.9 : Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes se répartissent en fonction de la structure de molécules. En effet, plus de 6400 structures ont été identifiées, les plus importantes sont les flavones, isoflavandiol, flavanols, flavonols, aurones, chalcones, anthocyanins [40].

Tableau I.2 : Principales classes des flavonoïdes [32].

Classe	Structure	R3	R4	R5	Exemple
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Isoflavones		R5	R7	R4	
		OH	OH	OH	Genistine
		H	O-Glu	OH	Daidezine
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Narigénine

Les flavonoïdes sont des molécules de défense contre les organismes pathogènes, leurs propriétés ont été exploitées pour leur un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes.

On leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anticancéreuses. Ils ont également des actions positives sur le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [31].

I.5.4.1. Propriétés des flavonoïdes

I.5.4.1.1. Propriétés anticancéreuses

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation. De nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains [44 ; 45]. La plupart des flavonoïdes sont *in vitro*, antimutagènes ; à contrario, quelques flavonols sont sur les mêmes modèles mutagènes et un petit nombre d'entre eux sont anticancérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales *in vitro* [35].

Des études montrent que certains flavonoïdes, particulièrement, la lutéoline, la quercétine, le kaempférol, l'apigénine, et la taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose montrant que la curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement. Ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement la quercétine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal, tandis que l'apigénine avec la quercétine ont la capacité à inhiber la phase de métastase. Toutefois, il signalait que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes tel que : le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de la biosynthèse de l'acide arachidonique, l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses soit par arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, et la formation d'un complexe inactif avec le carcinogène.....etc. [46].

I.5.4.1.2. Propriétés antibactériennes

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [47].

I.5.4.1.3. Activité antileishmanienne

En 2006, Tasdemir et al. ont procédé à l'étude *in vitro* et *in vivo* de plus d'une centaine de flavonoïdes et composés dérivés. 21, d'entre eux sur les 105 étudiés, présentaient une IC₅₀ inférieure à 3 µg/ml sur les amastigotes axéniques de l'espèce *L. donovani*. Parmi ces composés, seule la quercétine a montré une activité *in vivo* sur les souris BALB/c, elle entraîne une diminution modérée de l'infection de 15,3 %. Deux glycosides de la quercétine (le 3-O- α -L-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside de quercétine, et le 3-O- α -L-rhamnopyranoside de quercétine ainsi que l'aglycone ont été isolés de *Kalanchoe pinnata* au Brésil [48]. Ces composés ont été évalués *in vivo* sur des souris BALB/c infectées par *L. amazonensis* [49]. La dose de flavonoïdes (per os) était de 16 mg/kg/jour. À cette dose, l'activité est équivalente à celle du Pentostam R en terme de charge parasitaire et meilleure quant au diamètre des lésions. L'action de ces flavonoïdes (les deux premiers étant vraisemblablement métabolisés en aglycone active) se fait par inhibition de la topoisomérase II parasitaire. Les résultats contradictoires obtenus par voie intrapéritonéale, ou voie orale sont révélateurs des difficultés rencontrées lors de l'évaluation pharmacologique. Le tableau ci-dessous montre quelques exemples des composés phénoliques et quelques flavonoïdes isolés à partir de produits naturels ou des plantes, qui présentent une activité antileishmanienne testés sur les deux formes parasitaires promastigote et amastigote de diverses espèces de *leishmania sp*, Ces données sont collectées à partir des études antérieures [50].

Tableau I.3 : Quelques polyphénols et flavonoïdes antileishmaniens.

Polyphénols	Naturedu polyphénol	Espèce	Référence
Amentoflavone	Flavonoïdes	<i>L.donovani</i>	Chan-Bacaband Pena-Rodriguez
Betuletol	flavonoïdes	<i>Leishmaniasp.</i>	Moralesetal.(2000)
Brachycoumarinone,2-cycloepoxide	Coumarine	<i>L.major</i>	Oketch-Rabahetal. (1998)
Brachycoumarinone,2-epicycloepoxid	Coumarine	<i>L.major</i>	Oketch-Rabahetal. (1997)
Bracteine	Flavonoïde	<i>L.donovani</i>	Kayseretal.(1999)
Chalcone,20,60-dihydroxy-40-methoxy	Flavonoïde	<i>L.amazonensis</i>	Torres-Santosetal. (1999)
Coumarine	Coumarine	<i>L.amazonensis</i>	Bravoetal.(1999)
LicochalconeA	Flavonoïde	<i>L.donovani</i> <i>L.major</i>	Chenetal.(1993) (1994)(1995)
Lutéoline	Flavonoïde	<i>L.donovani</i>	Mittraetal.(2000)
PodocarpusflavoneA	Flavonoïde	<i>L.donovani</i>	Chan-Bacaband Pena-Rodriguez (2001)
PodocarpusflavoneB	Flavonoïde	<i>L.donovani</i>	Chan-Bacaband Pena-Rodriguez
Quercétine	Flavonoïde	<i>L.donovani</i>	Mittraetal.(2000)
Sulfuretine	Flavonoïde	<i>L.donovani</i>	Kayseretal.(1999)
La2',6'-dihydroxy-4'-	Flavonoïde	<i>L.amazonensis</i>	Torres- Santosetal.,1999

I.5.4.1.4. Activité antioxydante

Les flavonoïdes sont connus pour leur pouvoir anti-radicalaire très puissant. Ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette activité dépend de plusieurs caractéristiques structurales [51, 52].

- Une double liaison en C2-C3 avec un groupement oxo en C-4, et une hydroxylation en C-3 sur le cycle C
- Une dihydroxylation en C-5 et C-7 du cycle A+
- Une ortho-dihydroxylation du cycle B

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut s'expliquer par leur capacité à chélater les ions métalliques grâce à leur structure chimique spécifique [53]. Il apparaît que les principaux sites de chélation se localisent entre :

- L'hydroxyle en C-5 et le carbonyle en C-4
- L'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en C-4
- Les deux hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B

Les flavonoïdes peuvent également inhiber certains enzymes de type oxydases et enzymes pro-oxydantes notamment la NADPH oxydase enzyme clé du stress oxydatif [54].

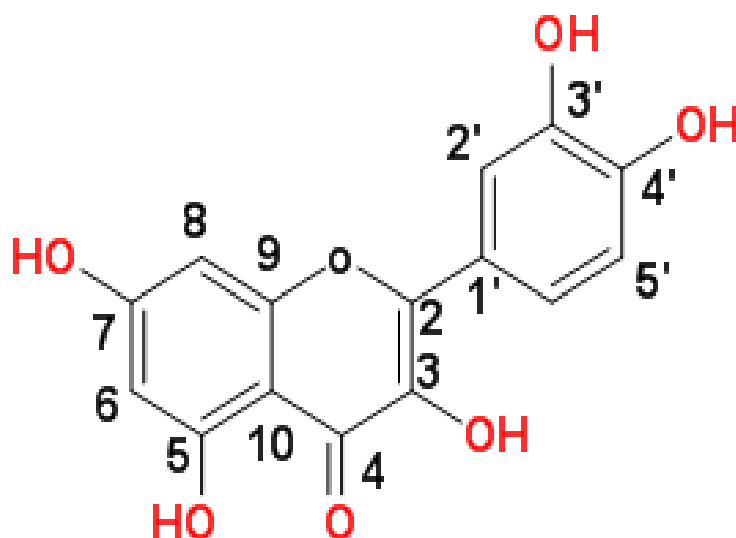


Figure I.10 : Sites caractéristiques structuraux des flavonoïdes

Chapitre II

La leishmaniose cutanée

II.1. Introduction

La leishmaniose cutanée fait partie des premières parasitoses qui ont été décrites. Cette description remonte à l'antiquité. Ainsi, la leishmaniose tégumentaire de l'Ancien Monde est connue depuis le X^{ème} siècle. C'est Al Boukhari, médecin arabe, qui la décrivait en premier, et pendant la même époque, Avicenne l'attribuait à une piqûre de moustique[55].

L'historique de la leishmaniose cutanée en Algérie remonte à 1860 quand Hamel découvrit la maladie à Biskra. Après la création de l'Institut Pasteur d'Algérie en 1905 et la mise en place de ces différentes antennes, plusieurs autres cas de Bouton d'orient furent publiés. Dès lors qu'on pensait que la maladie était inféodée au Sahara, des cas autochtones de leishmaniose cutanée furent signalés au Nord du pays, dans le littoral algérien à Ténès, et à Boumerdes en 1909 [56].

II.2. Définition des leishmanioses

Les leishmanioses sont des parasitoses communes à l'homme et à certains animaux ; les anthroponoses. Elles sont causées par des protozoaires flagellés appelés leishmanies, transmises par la piqûre infectante de la femelle hématophage d'un insecte dénommé phlébotome [57].

Les leishmanioses représentent un ensemble d'affections parasitaires avec un spectre clinique allant d'une simple lésion cutanée spontanément résolutive, aux formes diffuses et viscérales mortelles en l'absence du traitement. Cette variabilité de l'expression clinique dépend de l'existence d'espèces parasitaires distinctes mais également de la réponse immunitaire de l'hôte infecté [58].

II.3. Les différentes formes de la leishmaniose

On décrit trois formes principales de leishmaniose : la forme viscérale (LV), la forme cutanéomuqueuse (LCM) et la forme cutanée (LC) ou Bouton d'Orient [57].

II.3.1. La forme viscérale (LV)

Un cas de leishmaniose viscérale se définit comme une personne présentant des symptômes cliniques principalement fièvre irrégulière prolongée, splénomégalie et perte de poids accompagnés de la confirmation du diagnostic par voie sérologique et/ou parasitologique. Forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100% en l'absence de traitement. 90% de cette forme sont recensés dans cinq pays : Bangladesh, Brésil, Inde, Népal et Soudan [59].

II.3.2. La forme cutanéomuqueuse (LCM) ou Espundia

Elle débute aussi par une lésion devenant ulcéreuse à l'endroit de la piqûre. Les lésions ulcéreuses s'étendent aux muqueuses du nez, de la bouche et du pharynx pour aboutir à une destruction tissulaire ou totale, 90% des cas de LCM se produisent en Bolivie, au Brésil et au Pérou [60 ; 59].

II.3.3. La forme cutanée (LC) ou Bouton d'Orient

Se traduit par des ulcérations cutanées uniques ou multiples sur les parties découvertes du corps, comme le visage, les bras ou les jambes. La forme diffuse ne guérit jamais spontanément et il existe une tendance aux rechutes après le traitement. Elle est souvent associée à un déficit immunitaire, notamment l'infection par le VIH [60;61]. Les formes cutanées sont les plus courantes avec 50 à 75% des cas de leishmaniose [63]. Le nombre de cas de leishmaniose cutanée qui ne sont ni signalés ni diagnostiqués est probablement élevé, et les statistiques officielles ne permettent guère de connaître le nombre réel des malades [60].

II.3.4. Formes cliniques de la leishmaniose cutanée

Le terme Leishmaniose Cutanée (LC) correspondent à des atteintes exclusives de la peau, sans extension aux organes profonds ni aux muqueuses [61].

II.3.4.1. La leishmaniose cutanée localisée (LCL)

Elle résulte du parasitisme par n'importe quelle espèce anthropophile de *Leishmania*, y compris les espèces couramment viscérotropes *L. donovani* et *L. infantum*. Mais les espèces les plus constamment dermatotropes sont représentées dans l'ancien monde, par *L. tropica* et *L. major* en Asie centrale, Afrique del'Ouest, du Nord et de l'Est et le Proche et Moyen-Orient, *L. aethiopica* en Afrique de l'Est [62].

Dans le Nouveau Monde, elles comprennent des espèces à large distribution sud américaine tel que *L. amazonensis* et à un degré moindre *L. guyanensis*, des espèces plutôt localisées à l'Amérique centrale tel que *L. mexicana*, *L. panamensis* ou d'autres à territoire géographique restreint tel que *L. peruviana*, *L. venezuelensis*, *L. naiffi* et les deux espèces brésiliennes *L. shawi*, et *L. lainsoni* [62].

II.3.4.1.1. Incubation

La période de temps séparant la piqûre infectante de la lésion varie entre 1 et 4 mois. Ceci n'exclut pas toutefois que, dans des cas isolés, ce délai est réduit à quelques jours ou, à l'inverse, s'allonge à 1 an ou plus [62].

II.3.4.1.2. Invasion

La lésion cutanée débute par une petite papule inflammatoire, à peine surélevée, ou franchement vésiculaire, recouverte de fines squames blanchâtres, et qui augmente régulièrement de taille, pour atteindre en quelques semaines une taille définitive [62].

II.3.4.1.3. Évolution

La lésion de LC évolue de façon torpide, durant plusieurs mois, voire une ou plusieurs années. La lésion finit cependant par guérir spontanément, en laissant une cicatrice indélébile, déprimée parfois rétractile, rosée ou blanchâtre en peau claire, hyper pigmentée sur peau noire. La guérison clinique ne correspond pas toujours à une disparition totale des parasites. Dans environ 10 % des cas, elle est en effet suivie, dans les semaines ou les mois ultérieurs, par une résurgence in situ, avec réapparition d'une lésion active directement sur la cicatrice de la lésion antérieure [62].

II.3.4.1.4. Formes cliniques de (LCL)

D'autres formes cliniques peuvent se rencontrer, dont la forme sèche, due principalement aux espèces *L. tropica* et *L. peruviana*, caractérisée par des lésions papulonodulaires de taille volontiers réduite, recouvertes de nombreuses squames blanchâtres, sèches et fines.

La forme tuberculoïde, en général due à *L. tropica*, est constituée de lésions cutanées saillantes, non ulcérées, recouvertes de squames minces (**Figure. 12**). Ces lésions ont parfois une distribution faciale symétrique en « loup » [62].

II.3.4.2. La leishmaniose cutanée diffuse (LCD)

Il s'agit d'une forme de LC particulière et rare, qui correspond au parasitisme de sujets anergiques par les espèces *L. aethiopica* dans l'Ancien Monde et *L. amazonensis* dans le Nouveau Monde. Mais depuis que les états d'immunodépression acquise se sont multipliés, quelques cas de LCD ont également été signalés avec des espèces telles que *L. major* ou *L. braziliensis*, voire *L. infantum*, habituellement responsables des lésions localisées. Dans la LCD, la lésion élémentaire est un nodule non ulcéré. Les nodules sont, au début de petite taille, isolés, très nombreux et disséminés sur l'ensemble du corps, aussi bien sur le visage que sur les membres ou le tronc (**Figure II.1**). Le nodule est riche en parasites et sa lésion histologique est un infiltrat homogène de l'épiderme et du derme composé d'histiocytes vacuolisés riches en parasites. Au fur et à mesure de l'évolution de l'affection, les nodules augmentent de taille, deviennent confluents et forment de larges plaques infiltrées. L'aspect du malade s'apparente dès lors à celui d'un lépreux lépromateux, en particulier le visage a un aspect léonin typique (**Figure II.2**) [62].



Figure II.1 : Leishmaniose cutanée diffuse [63].



Figure II.2 : Aspect léonin typique [63].

Cette forme de leishmaniose est rebelle aux anti-leishmanies classiques. Elle évolue vers l'aggravation, par poussées successives entrecoupées de phases de rémission.

La forme pseudo sporotrichosique est une leishmaniose cutanée de dissémination lymphatique, décrite dans le nouveau monde, due à *L. braziliensis*, à différencier de la sporotrichose. Elle est caractérisée par l'association aux lésions primitives d'inoculation de nodules dermo-hypodermiques secondaires mesurant entre 0,5 et 1 cm de diamètre, étagés linéairement [62].

II.3.4.3. La leishmaniose cutanéomuqueuse

La LCM ou « espundia » est une entité nosologique particulière due principalement à l'espèce *L. braziliensis*, largement répandue du sud du Mexique au nord de l'Argentine. Zoonose selvatique, ses réservoirs sauvages demeurent mal connus. Cette affection évolue en deux temps : une primo-invasion cutanée pouvant être ultérieurement suivie par une atteinte muqueuse secondaire.

L'atteinte cutanée initiale n'est pas différente des lésions de LCL et son évolution se fait en général vers la guérison spontanée. La guérison de la (ou des) lésion(s) cutanée (s) une fois acquise.

L'atteinte muqueuse, lorsqu'elle se produit, débute à la muqueuse nasale (**Figure II.3, Figure II.4**). Le malade se plaint de congestion nasale avec gêne nocturne. Les nécroses et les mutilations qui apparaissent dans les stades avancés sont particulièrement graves. Elles se traduisent par d'importantes pertes de substance, avec des mutilations faciales défigurantes. Le retentissement sociopsychologique est considérable : le malade isolé et exclu, est parfois conduit au suicide. Il peut mourir en outre de détresse respiratoire aiguë ou de surinfection bronchopulmonaire [62].



Figure II.3 : Espundia « Nez de tapir » [63]



Figure II.4 : Lésion débutante de la muqueuse nasale [63]

II.3.4.4. Formes évolutives de la leishmaniose cutanée

II.3.4.4.1. Leishmaniose cutanée récidivante

Connue aussi comme leishmaniose lipoïde ou tuberculoïde, elle est presque exclusivement associée à l'infection par *L. tropica*. Des lésions papuleuses caractéristiques peuvent apparaître plusieurs mois ou années après la guérison clinique, dans ou autour de la cicatrice de la lésion guérie (**Figure II.5**). La leishmaniose récidivante peut durer de nombreuses années[58].



Figure II.5 : Leishmaniose récidivante [58]

II.3.4.4.2. Leishmaniose cutanée avec lymphangite nodulaire

La leishmaniose cutanée avec lymphangite nodulaire est une forme rare de la maladie. Les nodules sous-cutanés sont généralement discrets, indolores et à proximité des lésions cutanées primaires. Lorsqu'il y en a plusieurs, ils montrent souvent une configuration linéaire (**Figure II.6**) [58].



Figure II.6 : Leishmaniose cutanée avec lymphangite nodulaire [58]

II.3.4.4.3. Leishmaniose cutanée chronique

Les infections persistant pendant plus de 1 à 2 ans sont considérées comme LC chronique, à différencier de la LC aiguë qui dure d'habitude moins de 1 an. La lésion est d'habitude une plaque érythémateuse indurée avec des degrés variables de changements.

II.4. Les types de la leishmaniose cutanée en Algérie

En général, les caractéristiques cliniques de la leishmaniose cutanée ne sont pas uniformes dans toutes les régions ni même à l'intérieur d'une région donnée, par suite de différences touchant à l'espèce parasitaire ou aux types zoonotiques en cause.

En Algérie, la Leishmaniose cutanée (LC) évolue selon un mode endémoépidémique ; 4450 cas ont été annoncés en 2000, doublant en 2002 avec 8049 cas, puis quadruplant presque en 2004 avec 14822 cas, enfin pour atteindre un pic d'alerte en 2005. En 2010 le nombre de victimes a dépassé le chiffre de 10.000 cas au niveau de la wilaya de M'sila, et la répartition des cas de LC selon l'âge montre que toutes les tranches d'âge sont touchées ; la leishmaniose cutanée existe en Algérie sous deux entités épidémiologiques distinctes : la leishmaniose cutanée-zoonotique (LCZ), et la leishmaniose cutanée sporadique du Nord (LCS) [64].

II.4.1. La leishmaniose cutanée zoonotique

Elle est dite leishmaniose cutanée humide des zones rurales due à *L. major* [65]. Après une incubation courte, apparaît la lésion caractéristique : ulcération cutanée à bords surélevés, avec une croûte centrale adhérente, indolore, de taille variable habituellement de 1 à 4 cm de diamètre, d'évolution chronique [66]. Les lésions évoluent spontanément vers la guérison en 3 à 5 mois au prix d'importantes cicatrices disgracieuses ou invalidantes. A côté de cette forme la plus fréquente, s'observent les formes ulcéro-végétantes, verruqueuses et plus rarement lupoïdes (**Figure II.7**) [65].



Figure II.7 : Cas de leishmaniose cutanée zoonotique [64]

II.4.2. La leishmaniose cutanée sporadique du Nord

Elle s'oppose à la leishmaniose cutanée zoonotique en tout point de vue. Sur le plan clinique, elle se présente sous forme d'une petite lésion unique, siégeant au niveau de la face, très inflammatoire, sans ulcération et sans croûte épaisse. Sa durée d'incubation est longue tout comme sa durée d'évolution [65].

La leishmaniose cutanée du Nord nécessite souvent un traitement afin d'accélérer le processus de cicatrisation qui ne se fait spontanément qu'au-delà d'un an [67].

II.5. Distribution géographique de la leishmaniose cutanée

À l'exception de l'Antarctique, les leishmanioses sont signalées sur tous les continents : Asie, Amérique, Europe et Afrique au niveau des régions tropicales et subtropicales de 88 pays dont 72 pays en voie développement. On distingue deux grandes situations géographiques : l'Ancien Monde : sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie et le Nouveau Monde : Amériques du Nord, du Sud et Centrale.

Jusqu'à 90% des cas de leishmaniose cutanée se produisent en Afghanistan, en Algérie, en République Islamique d'Iran, en Arabie Saoudite, en République Arabe Syrienne, en Bolivie, au Brésil, en Colombie, au Nicaragua et au Pérou.

La distribution de la leishmaniose est dynamique: la Colombie et le Nicaragua a récemment signalé une augmentation importante de l'incidence de la leishmaniose cutanée [64].

II.6. Diagnostic des leishmanioses

Le diagnostic des leishmanioses repose sur la mise en évidence du parasite, ou de son acide désoxyribonucléique (ADN), et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection anticorps circulants ou hypersensibilité retardée [71].

II.6.1. Techniques modernes permettant la détection du parasite

Elles permettent de mettre en évidence d'infimes quantités de matériel génomique parasitaire dans un prélèvement (ponction ou biopsie). Elles permettent aussi de déterminer avec précision l'espèce de *Leishmania* responsable. La détection des antigènes excrétés par les amastigotes se fera par des anticorps monoclonaux et celle des acides nucléiques du parasite, par hybridation moléculaire (sondes marquées aux isotopes) ou amplification des séquences identifiées (PCR) suivie d'hybridation [72].

II.6.2. Examens sérologiques

De nombreuses techniques immunologiques sont utilisées dans le diagnostic de la LV. Elles font appel à des antigènes de nature et de modalités de préparation variées. Les préparations contiennent soit des antigènes figurés, soit des extraits antigéniques.

De nombreuses réactions immunologiques ont été utilisées. Les plus courantes sont les réactions d'immunofluorescence indirecte (IFI), d'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), d'électrosynérèse (ES), d'agglutination indirecte (DAT) et d'hémagglutination indirecte (HAI) le Western Blot (W.B.) [73].

II.7. Traitement des leishmanioses

II.7.1 Aperçu bibliographique sur les plantes médicinales ayant une activité antileishmanienne

Le traitement de la leishmaniose est très difficile à cause de la localisation intramacrophagique de la forme infectieuse de la maladie. Les victimes de cette maladie, présentant généralement une immunodéficiência, sont incapables d'éliminer le parasite à travers un mécanisme naturel de défense. En outre la mauvaise nutrition est associée dans certains cas avec la leishmaniose [74].

EN l'absence d'un vaccin ou d'un traitement médicamenteux efficace approprié, il y a un besoin urgent d'avoir recours à des drogues pour remplacer et/ou compléter ceux qui sont utilisés pour traiter la maladie. La majorité des drogues utilisées cliniquement pour le traitement de la leishmaniose se basent sur les molécules de l'antimoine pentavalent qui ont

été développés avant 1959. La toxicité de ces agents et la persistance des effets secondaires (malgré la modification des doses et la durée de traitement) présentent des inconvénients sévères. Les alternatives qui ont été découvertes après, tel que l'Amphotéricine B et la pentamidine, ont aussi donné des effets secondaires indésirables pour les malades [74 ;75]. Par ailleurs, les extraits des plantes ou les molécules dérivées des plantes semblent être une source de valeur pour l'élaboration des nouveaux agents médicaux, ainsi que pour la recherche de nouveaux mécanismes d'action [76]. Le besoin urgent de traitements alternatifs a conduit à un programme de screening des produits naturels à usage potentiel, dans la thérapie de la leishmaniose [77].

Notre recherche bibliographique, nous a permis d'établir une liste des produits naturels évalués pour leur activité antileishmanienne et qui sont présentés dans le tableau 04. Ce dernier met en exergue, les familles des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, et les espèces leishmaniennes ciblées par l'effet antileishmanien des extraits ou des produits bioactifs.

Tableau II.4 : Quelques plantes antileishmaniennes.

Famille	Espèce	Fraction /molécule	Espèce leishmanienne	Référence
Lamiaceae	Salvia cilicica	7-hydroxy-12-methoxy-20-norabieta-1,5(10),7,9,12-pentaene-6,14-dione abieta-8,12-dien-11,14-dione oleanolic acid ursolic acid ferruginol inuroyoleanol cryptanol	Lesihmania sp	Tan et al., 2002.
	Salvia verbinaca.	non connu	L.major L.tropica	El Rhaffari et al., (2002)

	Ajuga iva L. Schreb Lavandula multifida L. Marrubium vulgare L. Mentha pulegium L. Ocimum basilicum L. Oreganum compactum Benth. Rosmarinus officinalis L. Thymus satureioides Hyptis lacustris A.			Estevez, (2009)
Fabaceae	Crotalaria barbata R. Grah. . Desmodium gangeticum L. Periandra mediterranea Taub.	Extrait éthanolique Extrait méthanolique Fraction de saponine	L.donovani	Singha et al., (1992) Iwu et al., (1992) Santo et al., (1997)
Fagaceae	Quercus rotundifolia Lamk	Non connu	L.major L .tropica	El Rhaffari et al., (2002)
Gentianaceae	Swertia chirata Buch.Ham. Ex Wall.	Extrait éthanolique	L. donovani	Singha et al., (1992)
Meliaceae	Azadirachta indica	Extrait méthanolique	L. major	Tahir et al., (1998)
Oleaceae	Olea europea L.	Non connu	L.major L .tropica	El Rhaffari et al., (2002)
Papaveraceae	Bocconia integrifolia H and B. Bocconia pearcei Hutch.	Fraction alcaloide	L. amazonensis L. braziliensis L. donovani	Fournet et al., (1994)
Rubiaceae	Faramea Guianensis	Fractions acétate d'éthyle et chlorure de méthylène	L.mexicana L.amazonensis	Sauvain, (1989)

II.7.2. Traitement de première intention

Les traitements de premières intentions font appel à des sels d'antimoine : le Nméthyl glucamine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostan®) dont les teneurs en antimoine pentavalent (SbV) sont respectivement de 8,5% (85 mg/ml) et 10% (100 mg/ml), la dose prescrite par l'O.M.S de SbV est de 20 mg/Kg/jour. A cette dose, le SbV peut provoquer des problèmes de santé comme la cardio-toxicité et la néphro-toxicité. De plus, certaines souches de *Leishmania* responsables de leishmaniose cutanée et mucocutanée ont démontré des résistances à ces médicaments [78].

Ces produits ont une action inhibitrice sur la formation de l'ATP et nécessitent une conversion intracellulaire en SbIII (antimoine trivalent) pour être actif. Il vient d'être démontré que l'antimoine trivalent est un inhibiteur de la trypanothione réductase du parasite, enzyme présente seulement chez le parasite [79].

II.7.3. Traitement de seconde intention

Les traitements de seconde intention sont l'usage de l'amphotéricine B ou de la pentamidine. C'est un puissant antifongique capable de modifier la perméabilité de la membrane parasitaire en agissant sur l'ergostérol par affinité permettant la formation de pores aqueux, mais aussi capable de stimuler la production d'IL en agissant sur les récepteurs Tolllike. La pentamidine bloque, quant à elle, la thymidine synthétase et par conséquent la synthèse de l'ADN parasitaire et se fixe sur l'ARN de transfert. Il semblerait que la cible de la pentamidine soit un composant de la mitochondrie. Ces médicaments présentent une toxicité supérieure à celle des sels d'antimoine et nécessitent une prise en charge hospitalière. Le traitement par Ambisome, amphotéricine B liposomale, moins toxique, ne présente quasiment pas d'effet.

De nouveaux produits ont montré récemment des résultats très intéressants, notamment la miltéfosine dont le mode d'action n'est pas encore totalement déterminé mais qui laisse supposer une action sur la biosynthèse de la phosphatidylcholine. Généralement, la miltéfosine est employée contre les LV.

L'avantage de ce médicament est qu'il permet un traitement oral (2,5 mg/kg/jour) avec des effets secondaires négligeables et qu'il présente des taux de réussite élevés[64].

Partie II :

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériels et Méthodes

III.1. Matériels

- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de la partie aérienne de la plante "*Salvia Verbenaca*" (feuilles, tiges, fleurs et les grains). La plante a été récoltée en période de la floraison au mois de mars à avril 2022 dans la région de "Maadhid" wilaya de M'sila.

La détermination botanique a été faite par Dr.K. Rebbas (Département des Science de la nature et de la vie, Université de M'sila).

Après récupération de la plante, elle a été bien nettoyée. Le séchage a été effectué naturellement dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, à une température ambiante sur des papiers durant presque de 15 jours en moyenne, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Le matériel végétal a été broyé dans un moulin électrique en une poudre fine, pour augmenter la surface d'échange entre le solvant, et faciliter l'extraction. Par la suite la poudre a été conservée dans un flacon hermétiquement fermé et isolé de la lumière, et enfin a servi à la préparation des extraits.



Plante fraîche



Plante sèche



Plante broyée

Figure III.1 : Photo de la plante *Salvia verbenaca* fraîche, sèche, et broyée.

III.2. Méthodes

III.2.1 Méthodes d'extraction

III.2.1.1 Extraction par décoction

Nous avons effectué une décoction aqueuse à 10%. 25g de poudre de la plante *Salvia verbenaca* ont été mis dans 250mL d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1h dans un système fermé. Le décocté refroidi a été filtré et desséché dans l'étuve à 45°C.

L'extrait obtenu a été pesé et conservé dans un flacon stérile.

III.2.1.2 Extraction par infusion

A une quantité de 25g de poudre de la plante, nous avons ajouté 250mL d'eau bouillante. Le mélange a été ensuite filtré après 3h de contact. L'infusé refroidi a été filtré et desséché dans l'étuve à 45°C.

III.2.1.3 Extraction par macération

L'extrait hydroéthanolique est préparé par macération de 50g de poudre dans 500mL d'éthanol dilué à 70% (70/30 ; v/v) pendant 24h à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. L'opération a été répétée une fois avec 250mL de solvant (éthanol/eau) pendant 48h. L'extrait obtenu a été filtré à l'aide d'un carré de tissu blanc. Puis une fois sur du coton hydrophile, l'éthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur à 50°C, ensuite le filtrat a été placé dans l'étuve à 45°C pour obtenir un extrait sec brute.

III.2.1.4 Extrait d'éther de pétrole

60g de poudre de la drogue ont été extraits avec 600mL d'éther de pétrole pendant 3 jours. L'extrait obtenu a été évaporé à sec et pesé.

III.2.1.5 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Les parties aériennes broyées de *Salvia verbenaca* L. sont soumise à l'hydrodistillation en se servant d'un dispositif d'extraction type Clevenger. Cela consiste à introduire 100g de la masse végétale dans un ballon de 1000mL contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir complètement le ballon, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures à l'aide d'un chauffe ballon, en ajoutant l'eau distillée de temps en temps pour éviter la dessiccation du mélange. Les vapeurs chargées des huiles essentielles traversant le réfrigérant où aura lieu la condensation-en raison de le différence de densité-, l'huile surnage à la surface de l'eau et elle est récupérée, puis séchée par un déshydratant (sulfate de sodium) pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile.



Figure III.2 : Montage d'extraction d'huile essentielle par Clevenger

III.2.2 Screening phytochimique

Le screening est un test qualitatif qui permet de mettre en évidence les métabolites primaires et secondaires de notre plante. Ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et/ou de précipitation, ainsi que des examens en lumière ultraviolette.[80;81;82].

III.2.2.1 Substances polyphénoliques

III.2.2.1.1 Les tanins

A 5mL d'infusé à 5%, nous avons ajouté 1ml de solution aqueuse de FeCl_3 à 1%.Le développement d'une coloration verdâtre ou bleu noirâtre indique la présence de tanins

III.2.2.1.2 Les flavonoïdes

a) Flavonoïdes totaux

On prend 2mL d'extrait hydroéthanolique et on le rend basique par l'ajout de NH_4OH . L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.

b) Les anthocyanes

A5ml d'extrait hydroéthanolique, on ajoute 5mL d' H_2SO_4 à 10% puis 5mL de NH_4OH dilué (10%).

En présence d'anthocyanes, la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu violacé en milieu basique.

c) Réaction à la cyanidine

5mL d'extrait alcoolique ont été introduits dans un tube à essai, ajoutés à 5mL d'alcool chlorhydrique (5mL éthanol à 95°alcoolique + 5mL eau distillée + 5mL HCl concentré à partie égale en volume), puis 1ml d'alcool iso amylique (3-methyl butanol)et quelques copeaux de magnésium.

L'apparition au niveau de la couche surnageant d'alcool iso amylique d'une coloration :

- Rose orangée, indique la présence de flavones.

- Rose violacée, caractérise la flavanones.
- Rouge, indique la présence de flavonols et de flavanols.

d) Leuco anthocyanes

Nous avons repris la réaction à la cyanidine sans ajouter de magnésium. La solution a été chauffée au bain marie pendant 15 minutes. En présence de leuco anthocyanes, il apparaît une coloration rouge cerise ou violacée.

III.2.2.2 Les coumarines

10mL d'extrait éthériques sont évaporés à l'air libre, puis repris avec 2mL d'eau chaude. La présence de coumarines est révélée après ajout de 0,5mL de NH₄OH à 25 % et observation de la fluorescence sous une lampe UV à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté l'ammoniaque, indique la présence de coumarines.

La caractérisation des coumarines glycosidées est réalisée sur 1mL d'extrait hydroéthanolique

III.2.2.3 Les saponosides

La présence de saponosides a été mise en évidence par l'obtention de mousses (saponines) dans un décocté 10%.

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, nous avons reparti le décocté respectivement de 1mL à 10mL puis complété le volume à 10mL dans chaque tube qui a été agité ensuite dans le sens de la longueur pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde. Les tubes ont été laissés au repos pendant 15 minutes. La hauteur de la mousse a été ensuite mesurée dans chaque tube.

La valeur de l'indice de mousse (IM) a été indiquée par le tube dans lequel la hauteur de mousse a été de 1 cm selon le rapport : **IM = 1000/ numéro de tube.**

III.2.2.4 Les mucilages

Nous avons introduit 1mL du même décocté 10% dans un tube à essai dans lequel nous avons ajouté 5mL d'éthanol 95°. En présence de mucilages, il se forme des précipités floconneux.

III.2.2.5 Les stérols et triterpènes

- *Solution à analyser*

Nous l'avons préparé en introduisant dans un tube à essai 1 g de drogues et 20mL d'éther éthylique. L'ensemble a été agité et laissé en contact pendant 24 heures au frigo. Le filtrat obtenu a été complété à 20mL avec de l'éther.

Ces 20mL sont partagés entre deux capsules à raison de 10mL pour les stérols et terpènes, 10mL pour les coumarines et évaporés à sec.

- *Caractérisation*

Après avoir évaporé à sec 10mL de l'extrait, nous avons dissout le résidu dans 1mL d'anhydride acétique puis 1mL de chloroforme. Nous l'avons ensuite partagé dans deux tubes à essai, l'un servant de témoin. Nous avons mis dans le fond du second tube à essai à l'aide d'une pipette 1 à 2mL de H₂SO₄ concentré. A la zone de contact des deux liquides, il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageant devenant verte ou violette révèle la présence de stérols et terpènes

III.2.2.6 Les alcaloïdes

- *Solution à analyser*

Elle a été obtenue en introduisant dans un erlenmeyer 5g de poudres de drogues, 25mL d'acide sulfurique concentré dilué à 10% avec de l'eau distillée. L'ensemble a été agité et laissé en macération pendant 24 heures à la température du laboratoire. La solution a été filtrée sur papier, et le résidu a été lavé à l'eau distillée de manière à obtenir 25mL de filtrat.

- *Caractérisation*

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1mL de filtrat et ajouté 5 gouttes de réactif de Dragendorff dans le second. S'il apparaît un précipité, la présence d'alcaloïdes est confirmée par leur extraction.

III.2.3 Analyse quantitative des composés phénoliques

III.2.3.1 *Dosage des polyphénols*

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué au moyen du réactif de Folin-ciocalteu.

Le réactif est constitué d'un mélange d'acides phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il réduit en milieu alcalin, lors de l'oxydation par les groupements oxydable des composés phénoliques, conduisant à la formation de produit de réduction de couleur bleu (oxyde de tungstène et de molybdène). Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765nm est proportionnel à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

Pour évaluer la teneur en polyphénols des extraits, 200µl de chaque extrait convenablement dilué est ajouté à 1000µl du réactif de Folin ciocalteux (dilué 10 fois dans l'eau distillée). Après 4mn, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (7,5% dans l'eau distillé) sont ajoutés, après 2 heures d'incubation à température ambiante. L'absorbance est lue à 765nm par un spectrophotomètre UV.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (10-140µg/ml). La concentration des polyphénols est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligrammes d'extrait (µg EAG / mg d'extrait) [83; 84;85].

III.2.3.2 *Dosage des flavonoïdes*

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium. Le principe de la méthode est la formation d'un complexe jaune, qui absorbe à 430nm. Cette méthode consiste à ajouter 1ml d'une solution d' $AlCl_3$ (2% dans de méthanol absolu) à 1mL de chaque extrait convenablement dilué. Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 430nm est mesurée. Une droite d'étalonnage réalisée par le quercétine à différentes concentrations (1-40µg/ml) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires, a servi pour la quantification des flavonoïdes. La teneur est exprimée

en microgramme équivalents de quercétine par milligrammes d'extrait ($\mu\text{g EQ} / \text{mg d'extrait}$) [86 ;87 ;88].

III.2.4 L'activité antioxydante par le test au DPPH (effet scavenger)

Le composé chimique 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure/ activité antioxydant des composés phénoliques. La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie visible, en mesurant la diminution de l'absorbance provoquée par la présence des extraits à 517nm.

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violet, il est réduit à la diphényl picryl-hydrazine de couleur jaune [89].

La réaction peut être représentée par l'équation suivante :

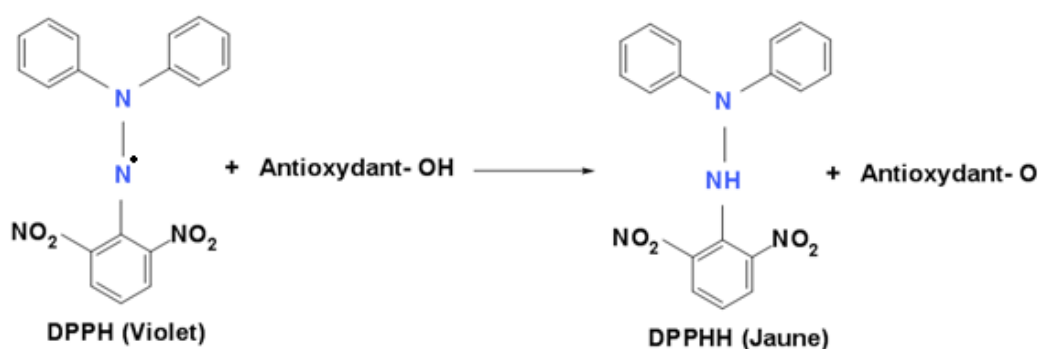


Figure III.3 : Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant[90]

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire, des différents extraits, 100 μl de chacune des différentes concentrations d'extraits ou de standard ont été incubés avec 2.50mL d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004%. Après une période d'incubation de 30 minutes, la réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH est suivie par spectroscopie visible, en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH à 517nm. La capacité antioxydante d'extraits, est déterminée en évaluant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH.

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance sans antioxydant

A échantillon : Absorbance avec antioxydant

IC₅₀ : Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante [91;92;93;94].

III.2.5 L'activité antibactérienne

III.2.5.1 Souches utilisées

Les extraits de *Salvia verbenaca* ont été testés contre des souches référencées. Ces souches obtenues de l'institut de Pasteur en M'sila pour les deux bactéries pathogènes à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, une bactérie de Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Elles sont conservées à 5°C dans des tubes préalablement stérilisés et remplis de 10mL de gélose nutritive inclinée.

III.2.5.2 Antibiotique (ATB) en disque

Pour valoriser l'activité antibactérienne, on utilise l'antibiotique GENTAMYCINE (10µg/disque) pour faire le contrôle positif, et le DMSO pour contrôle négatif.

III.2.5.3 Repiquage des espèces bactériennes

Dans des conditions stériles dans un tube à essai, on prélève une quantité de la souche bactérienne, en milieu de culture contenant de la gélose nutritive liquide à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. On laisse cette quantité dans l'étuve à 37°C pendant 24h. Après 24 heures, on prend un échantillon de bactéries cultivées et on le place dans une boîte de gélose nutritive à l'état solide, et on le laisse une autre fois dans l'étuve pendant 24 heures à 37°C- pour faire la culture des nouvelles souches- pour la préparation de l'inoculum.

III.2.5.4 Préparation des milieux de culture

On fait couler le milieu de culture gélosé (Muller Hinton) en surfusion dans les boîtes de Pétri, de façon à obtenir une épaisseur de 4mm (20mL) pour les boîtes d'un diamètre de 90mm. Ensuite on laisse refroidir et solidifier le milieu gélosé en plaçant les boîtes avec les couvercles en place sur une surface fraîche.

III.2.5.5 Préparation de l'inoculum

Un échantillon des nouvelles bactéries est prélevé et placé dans un volume d'eau physiologique 0.9%. Puis on mesure la concentration nécessaire pour évaluer l'activité anti

bactérienne entre de 0,08 - 0,1 évaluée à une longueur d'onde $\lambda=625$ nm. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, il consiste à tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, et on ensemence la boîte afin d'obtenir une culture de colonies confluentes.

III.2.5.6 Préparation des disques

Des disques de papier filtre d'un diamètre de 6 mm ont été préparés par de papier wathman, stérilisés puis déposés à la surface des boîtes ensemencées.

III.2.5.7 Dilution des extraits

La solubilisation des différents extraits est faite dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Ce dernier a été testé vis-à-vis de chaque type de souche bactérienne, et aucune inhibition n'a été observée.

Pour la préparation des différentes concentrations d'extraits, 200mg de chaque extrait (infusion, décoction, hydroéthanolique et éther de pétrole) est introduit dans un tube à essai stérile, auquel 1mL de DMSO sont additionnés. Les tubes sont énergétiquement agités au vortex jusqu'à ce que la solution préparée devienne homogène. Pour chacun des quatre extraits, une solution mère à 200mg/ml est obtenue. Ces solutions mères sont diluées progressivement dans le DMSO, afin de préparer, pour chaque extrait, une gamme de solutions ayant des concentrations de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 et 1.5 mg/ml. Les quatre solutions issues de chaque type d'extrait, ainsi que les solutions mères sont ensuite utilisées pour la détermination de leurs activités antibactériennes. Après la dilution, chaque extrait est déposé à la surface des disques par des micropipettes (15 μ l), et les boîtes de pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant quelques temps, et mises dans l'étuve (incubée pendant 24h à 37°C).

Remarque : la dilution des extraits aqueux est 40% DMSO et 60% eau, par contre les autres extraits la dilution est dans le DMSO seul.

III.2.5.8 La lecture

L'activité antibactérienne de chaque extrait de la plante testé, est évaluée par l'apparition des zones d'inhibition autour les disques[95].

Chapitre IV

Résultats et Discussion

III.1. Procédés d'extraction

Plusieurs méthodes d'extractions sont utilisées dans notre étude pour obtenir des extraits à partir de la partie aérienne de la plante *Salvia verbenaca*.

Cinq extraits ont été obtenus, à savoir :

- L'extrait de l'infusion (E Inf)
- L'extrait de décoction (E Déc)
- L'extrait hydroéthanolique (E Héth)
- L'extrait éther de pétrole (E Ep)
- Huile essentielle (HE)

Le rendement est la quantité d'extrait obtenu à partir d'une matière végétale ; Il est exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche.

Le rendement de chaque extrait a été calculé selon la relation suivante :

$$R_{\text{extrait}} \% = (M_{\text{extrait}} / M_{\text{plante}}) * 100$$

R_{extrait} : le rendement d'extrait

M_{extrait} : la masse d'extrait en gramme

M_{plante} : la masse de la plante de départ en gramme

Les rendements d'extraction des différentes méthodes sont reportés dans la figure suivante :

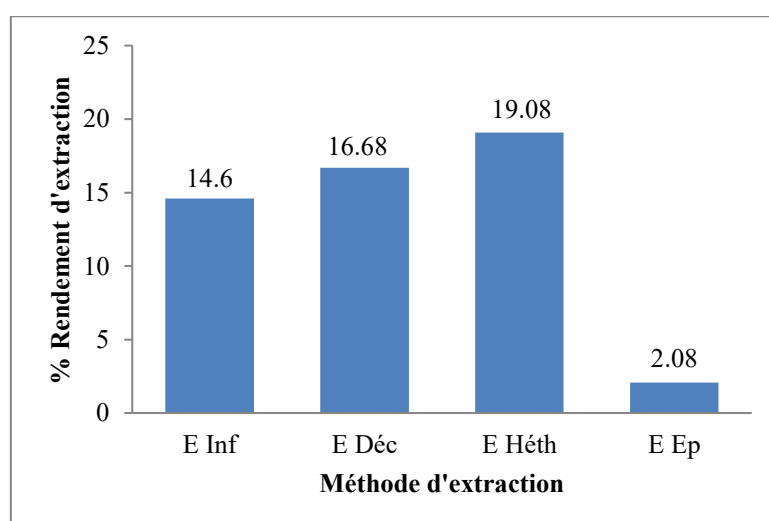


Figure IV.1 :Rendements des extraits de *Salvia verbenaca* exprimés en pourcentage

Les rendements d'extraction varient entre 2,08 et 19,08%. Le meilleur rendement est obtenu avec l'extrait hydroéthanolique avec une valeur de 19,08%, suivi par l'extrait de décoction et l'extrait d'infusion avec des rendements de 16,68% et 14,60% respectivement. Tandis que le plus faible rendement, est celui de l'extrait d'éther de pétrole soit 2,08%.

D'après nos résultats, nous constatons que le taux d'extraction varie en fonction de la méthode d'extraction et du solvant utilisé. Ces résultats nous indiquent aussi, que les extraits sont riches en composés polaires.

De l'extraction de l'huile essentielle de la plante de *Salvia verbenaca* par hydrodistillation, nous avons obtenu que des traces de l'huile essentielle.

Tableau IV.1 : Comparaison des rendements en huile essentielle d'espèce étudié avec ceux des travaux antérieurs

Plante	Type d'extraction	Rendement %	Référence bibliographique
Salvia verbenaca	Hydrodistillation	0,15	Pitarokili et al., 2006
	Entrainement à la vapeur d'eau	0,09	Belmekki Nacera 2009
	Hydrodistillation	Traces	Nos travaux

De ces résultats, on peut déduire que la quantité d'huile essentielle contenue dans la plante *Salvia verbenaca* est très faible, et le rendement en huile essentielle d'une même plante peut varier, et ceci en fonction de plusieurs paramètres, dont la méthode d'extraction.

IV.2 Résultats de screening phytochimique

Les tests phytochimiques (réalisés sur les parties aériennes de *Salvia verbenaca*) ont permis de détecter les différentes familles de composés, par des réactions qualitatives de caractérisation.

Les résultats de la mise en évidence de quelques métabolites secondaires dans notre extraits (aqueux, hydroéthanolique) se traduisent dans le tableau et la figure suivants :

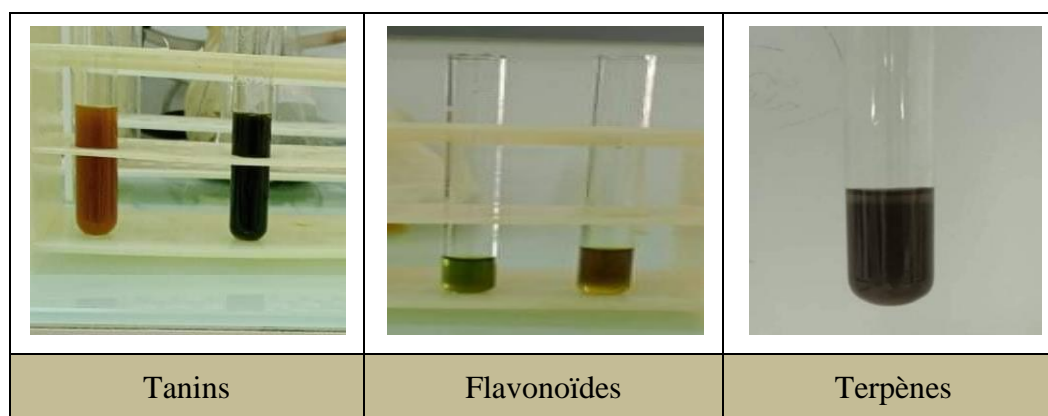
Tableau IV.2 : Résultats de screening phytochimique

Métabolites secondaires		Résultats de présence
Les tanins		+++
Les flavonoïdes	Totaux	++
	Les anthocyanes	-
	La cyanidine	-
	Leuco-anthocyanes	-
Les coumarines		-
Les mucilages		+
Les terpènes		++
Les saponosides		-
Les Alcaloïdes		-

(+++): Réaction très positive.

(++): Réaction moyenne positive.

(-): Réaction négative.

**Figure IV.2:** Les images des quelques résultantes de la réaction de caractérisation

Les résultats de criblage chimique sont obtenus à partir de poudre épuisée par l'eau et l'éthanol. D'après les résultats trouvés, notre plante est riche en flavonoïdes et tanins, même les mucilages et les terpènes. D'autre part les alcaloïdes, les coumarines, les saponosides et les stéroles sont des classes de familles chimiques totalement absentes.

Donc cette plante est riche en polyphénols, ce qui confirme son utilisation dans la médecine traditionnelle.

IV.3 Résultats d'analyse quantitative des composés phénoliques

IV.3.1 Dosage des polyphénols

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits des plantes étudiées ont été déterminées par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteux. Cette méthode a été choisie en vue de sa fiabilité, reproductibilité et disponibilité du réactif de Folin. Les résultats ont été déduits de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage, réalisée à base d'acide gallique, et sont exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$).

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour déterminer la quantité des polyphénols, est représentée ci-dessous.

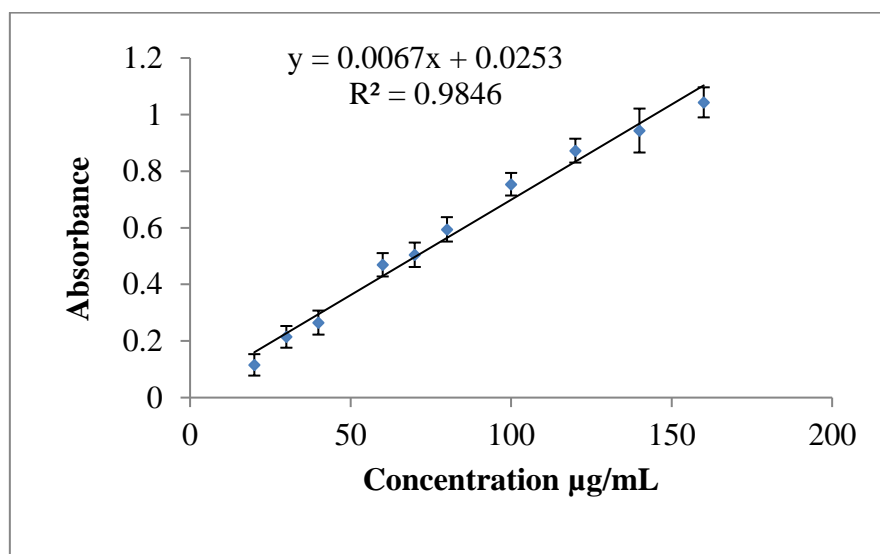


Figure IV.3 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec l'acide gallique ($y=0,006x+0,25$) et $R^2=0,984$.

Les résultats de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits de *Salvia verbenaca* sont représentés dans la figure suivante :

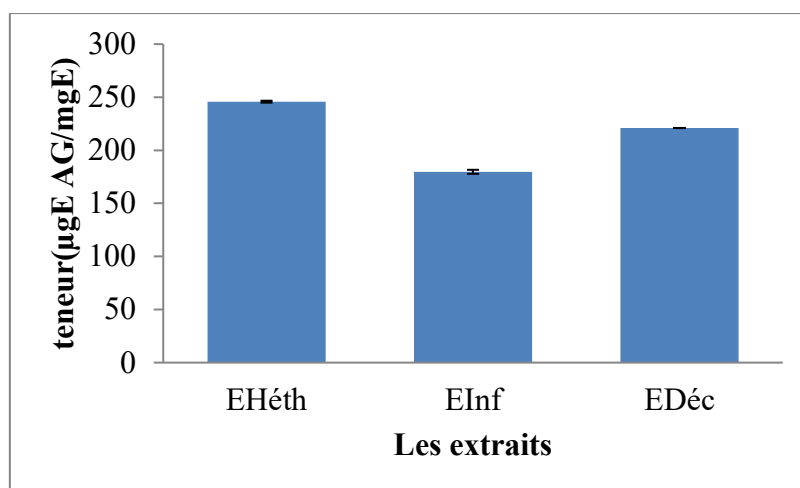


Figure IV.4 : Les valeurs de teneurs en polyphénols.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux des différents extraits a révélé que l'extrait hydroéthanolique est riche en polyphénols avec un teneur de 245,79µg EAG/mg d'extrait, suivi par les extraits aqueux (EDéc et EInf) qui sont respectivement 221µg EAG/mg d'extrait et 179,74µg EAG/mg d'extrait.

IV.3.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et l'étalon été la quercétine. La teneur est exprimée en µg EQ/mg d'extrait. Les taux des flavonoïdes des trois extraits de plante étudiée ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage, qui suit une équation de type : $y=0,021x+0,019$ sachant que $R^2=0,998$.

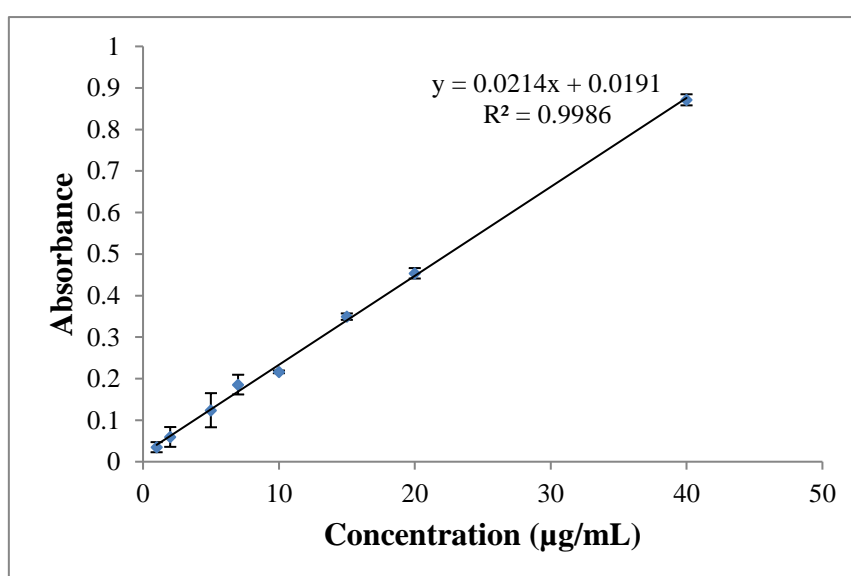


Figure IV.5 : Courbe d'étalonnage de Quercétine

Les résultats de la teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits de *Salvia verbenaca* sont représentés dans la figure suivante :

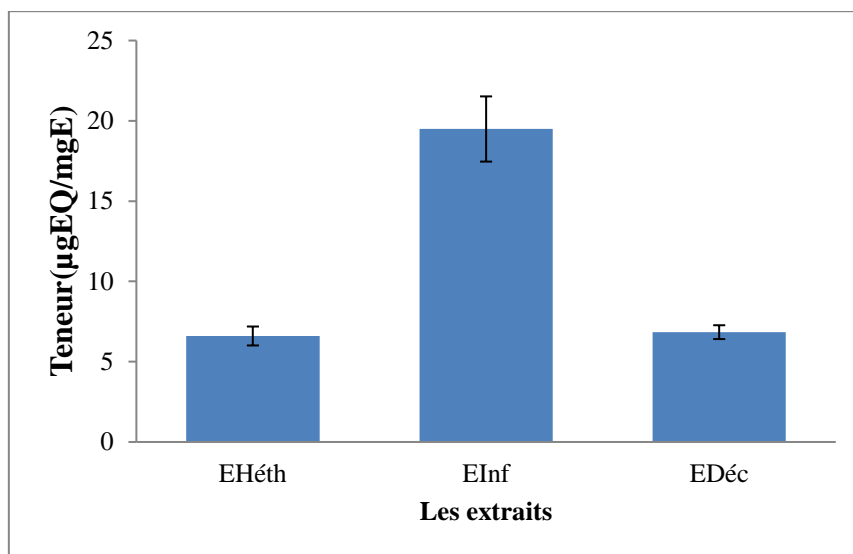


Figure IV.6 : Les valeurs des teneurs des flavonoïdes

L'analyse des résultats du dosage des flavonoïdes montre que l'extrait de l'infusion est le plus riche en flavonoïdes (19,49µg EQ/mg d'extrait). Par la suite vient EDéc et EHéth qui représentent presque la même quantité avec des teneurs de 6,84µg EQ/mg d'extrait et 6,61µg EQ/mg d'extrait, respectivement.

La teneur en flavonoïdes varie en fonction de polarités des solvants utilisés dans la préparation des extraits, et selon la méthode d'extraction.

Il est apparu que la plupart des flavonoïdes de *Salvia verbenaca* sont des flavonoïdes triglycosylés mieux solubilités dans les solvants très polaires.

IV.4 Résultats d'activité antioxydante par les tests au DPPH

Dans notre étude, nous avons choisi la méthode de DPPH pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, en raison de sa stabilité, sa rapidité et son efficacité.

L'activité scavenging du radical des différents extraits, est exprimée en pourcentage d'inhibition, et est illustrée dans les figures suivantes :

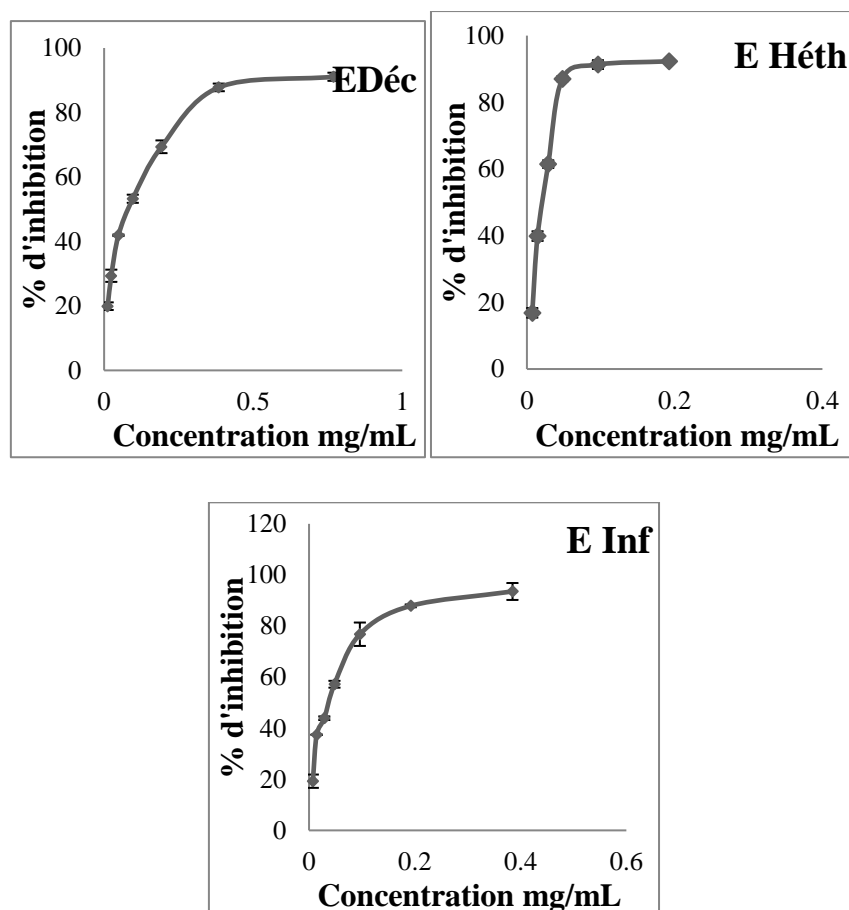


Figure IV.7 : Activité inhibitrice du radical DPPH par les extraits de *Salvia verbenaca*.

A partir des courbes des pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées, nous avons déterminé les valeurs d'IC₅₀.

L'IC₅₀ c'est la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH, une valeur d'IC₅₀ très faible correspond à l'activité antiradicalaire très importante.

Les résultats obtenus sont représentés dans figure (IV.8), où l'efficacité de l'activité antiradicalaire est exprimée en concentration d'extrait végétal capable de piéger 50% du radical libre DPPH (IC₅₀).

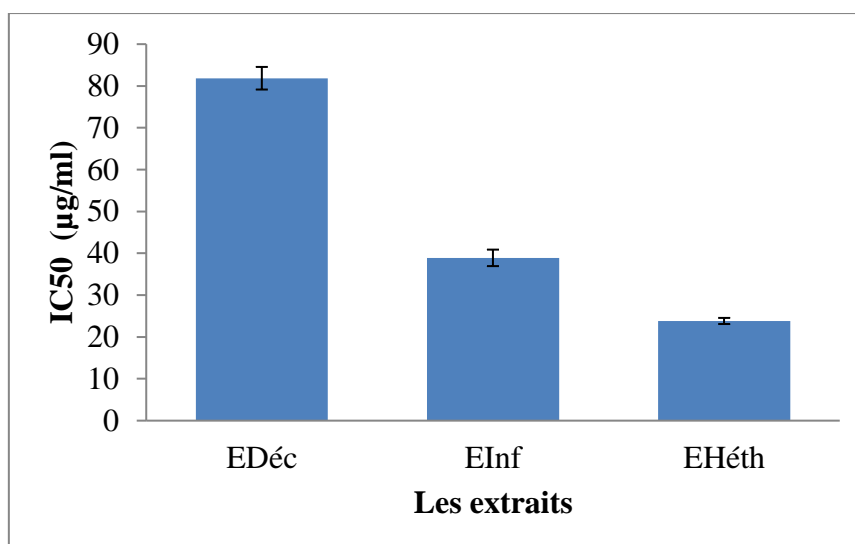


Figure IV.8 : Valeurs des IC₅₀ de différents extraits de *Salvia verbenaca*.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le paramètre IC₅₀ est inversement proportionnelle à l'action antiradicalaire (anti DPPH), un IC₅₀ faible correspond à une activité antioxydante élevée et vice-versa.

Nos résultats montrent que l'extrait hydroéthanolique le plus actif, leur IC₅₀ est de 23,83µg/ml, suivi par l'extrait d'infusion avec une IC₅₀ de l'ordre de 38,91µg/ml, puis il vient enfin l'extrait de décoction d'ordre 81,85µg/ml.

La forte activité d'extrait hydroéthanolique s'expliquer par la présence des polyphénols et des flavonoïdes qui sont détectés dans cet extrait.

IV.5 L'activité antibactérienne

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien de nos quatre extraits préparés à partir de la partie aérienne de la plante *Salvia verbenaca* par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé solide (Muller Hinton).

Cette activité est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant les échantillons à tester (EHéth, E Déc, EInf, EEp) vis-à-vis d'une souche bactérienne à Gram positive (*Staphylococcus aureus*) et deux autres à Gram négative (*Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux (IV.3), (IV.4) et sur les figures (IV.9) :

Tableau VI.3 :Activité antibactérienne des extraits de *Salvia verbenaca*

Les extraits Les souches Bactériennes	E Héth	E Inf	E Déco	E Ep
<i>E.coli</i>	–	–	–	+
<i>Pseudomonas</i>	–	–	–	+
<i>Staphylococcus</i>	–	–	–	+

Tableau IV.4: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus avec différentes concentrations dans EEP

Concentration mg /ml Les souches	SM	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	10	10	–	6.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	–	–	10.5	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	–	9	7.5	–	7

SM : Solution mère

d : Concentration

Tableau IV.5 : Résultats de l'antibiogramme de l'antibiotique Gentamycine (mm)

Les souches \ L'antibiotique	E.coli	Staph.	Pseud.
Gentamycine (10mg)	31	34	26.5

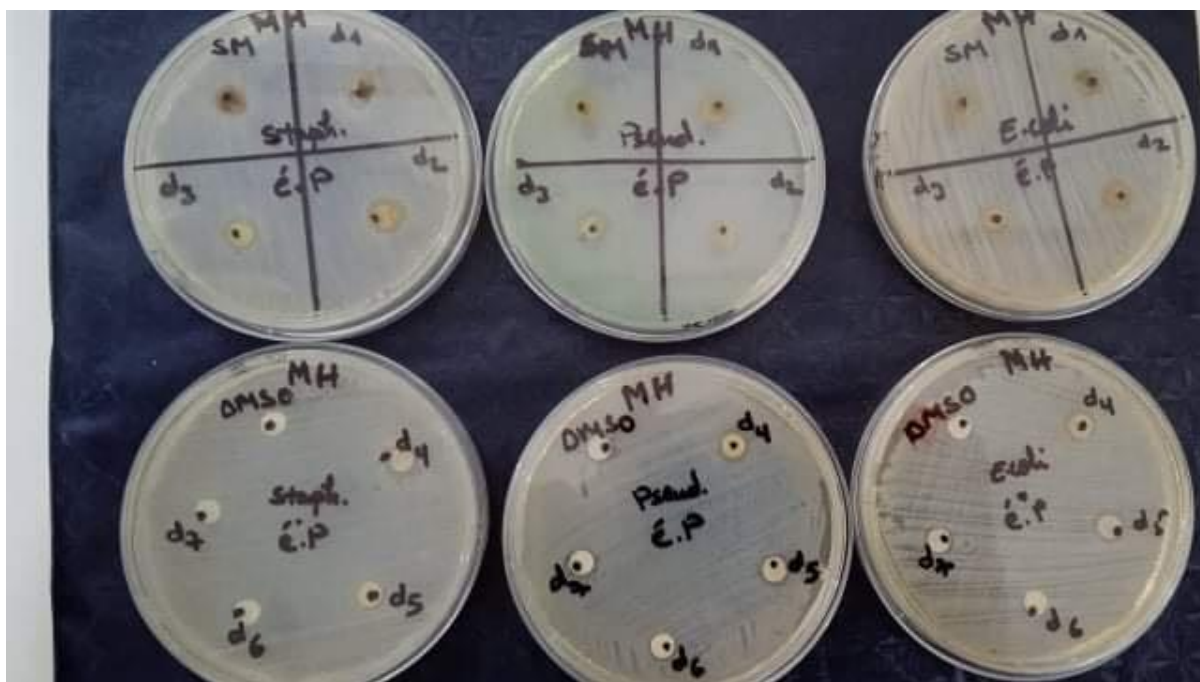


Figure IV.9 : Les résultats de l'extrait d'éther de pétrole

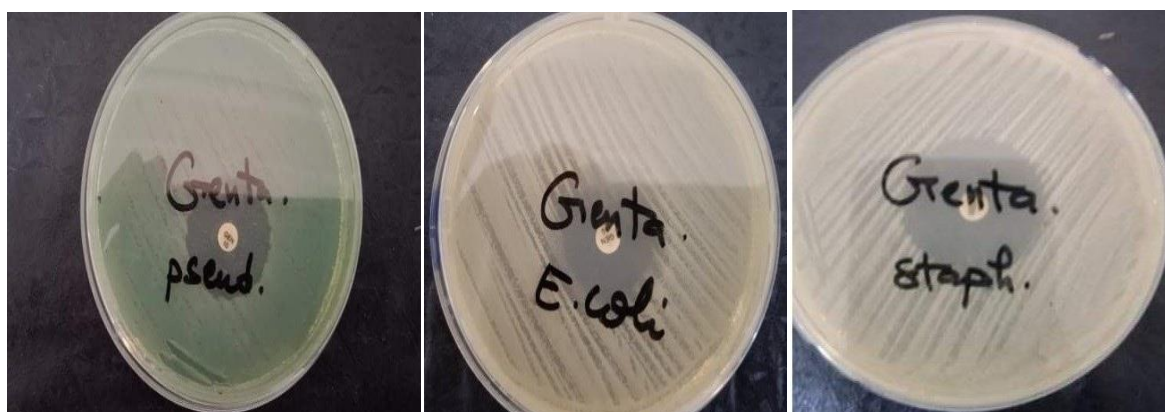


Figure IV.10 : Résultats de l'antibiotique

Au regard de ces résultats, nous avons observé que l'extrait de l'éther de pétrole est manifesté une activité modérée vis-à-vis les trois bactéries par rapport à la gentamycine (antibiotique standard).

La plus forte activité a été obtenue contre l'*E.coli* avec une zone d'inhibition entre 6.5 et 10 mm, Pour les deux bactéries:*Staph.etPseud.* la zone d'inhibition est de 10.5mm et entre 7 et 9mm respectivement.

Les extraits (Inf, Déc et Héth) sont complètement inactifs contre les bactéries testées.

A Krayi et Tawffeq (2012), ont mentionné que les résultats négatifs n'indiquent pas que les constituants bioactifs sont absents ou que la plante est inactive. Ceci est expliqué par l'insuffisance de la dose utilisée, et que l'activité antibactérienne peut être obtenue avec des doses plus élevées. En effet, le doublement de la quantité des extraits et également le volume dans les disques, a permis d'obtenir une bonne activité antibactérienne.

Sur la base des travaux de Dela housse (2003), les extraits de *Salvia verbenaca* ont montré deux niveaux d'activité antibactérienne, une activité faible exprimée par les zones d'inhibition inférieure à 10mm et une activité moyenne exprimée par les zones d'inhibition entre 10 et 14mm. Par contre la Gentamycine était plus active, et a donné une activité très forte avec une zone d'inhibition entre 31 et 34mm, et une activité forte avec une zone d'inhibition 26.5mm.

D'après ces résultats, l'extrait d'éther de pétrole (non polaire) est plus actif que l'E Héth, E Inf et E Déc qui sont polaires.

L'extrait d'éther de pétrole a une activité antibactérienne. Cette bioactivité due principalement à la richesse de cet extrait en terpènes, qui sont connues pour son efficacité contre les agents microbiens.

Même résultat est obtenu par Belkhiri F. (2018) : Les différents extraits de *Salvia verbenaca*, sont actifs contre ensemble des souches bactériennes testées.

Parmi les extraits les plus actifs contre les 10 souches en produisant des diamètres d'inhibition (DI) compris entre 8 et 11mm, la fraction de chloroforme (apolaire), a donnée une activité antibactérienne modérée, tandis que la fraction aqueux (polaire) était complètement inactive contre les bactéries testées.

Nous concluons donc de ces résultats qu'il ya une bonne corrélation entre l'activité antibactérienne et la polarité de solvant utilisé.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

L'Algérie dispose d'une diversité floristique exceptionnelle. Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacopée traditionnelle comme remède pour soigner les différentes infections et maladies. Notre travail a porté sur la partie aérienne de l'espèce *Salvia verbenaca* de la famille des lamiales, une des familles les plus importantes dans la flore en l'Algérie. Les études phytochimiques, ont permis de caractériser les principaux groupes chimiques à savoir les flavonoïdes, les tanins, les triterpènes et les mucilages.

La détermination du rendement en huiles essentielles a montré des traces dans *Salvia verbenaca*. Les tests quantitatifs montrent la richesse de la plante en polyphénols et en flavonoïdes. Le potentiel antioxydant des extraits a été déterminé par la méthode DPPH. Les résultats montrent que ces extraits ont une bonne activité antioxydante.

L'évaluation de l'activité biologique d'extraits d'éther de pétrole, manifeste une activité antibactérienne modérée vis-à-vis des différentes souches testées.

Faute de moyens -même au niveau de l'institut Pasteur- nous n'avons malheureusement pas pu continuer les tests antileishmaniens de nos extraits, pourtant connus pour être très efficaces selon des études expérimentales étrangères, contre la leishmaniose cutanée.

En conclusion, l'utilisation de cette plante peut consolider et assister le traitement conventionnel. Et on peut donc l'allier à la glucan time avec bien sûr une étude sur le dosage et la manière d'utilisation, ou mieux encore reconnaître les molécules (flavonoïdes) responsables de l'effet thérapeutique et peut être pouvoir les synthétiser en grande quantité industrielle par voie chimique notamment .

Toute fois des études complémentaires pourraient être envisagées, notamment :

- ✚ L'activité antileishmanienne
- ✚ L'activité anticicatrisante
- ✚ L'activité antifongique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

- [1] Lee K. H. (2004). Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead, *Journal of Natural Products*, **67**: 273-283.
- [2] World Health Organisation (WHO). (2000). A report of the consultation meeting on traditional and modern medicine. *Harmonizing two approaches, Beijing, China*. p 22-26.
- [3] Cordell G.A., et Colvard M.D. (2005). Some thoughts on the futures of ethnopharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*. **100**: 5-14.
- [4] Heywood V. H., Brumitt R. k., Culham A., Seberg O. 2007. Flowering plant families of the world. Royal botanic Gardens, Kew.
- [5] Grayer R. J., Eckert M. R., Veitch N. C., Kite G. C., 2003. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, Nepetoidins A and B, in the Lamiaceae.
- [6] Guignard J. L., Pelt J. M., 2001. Botanique Systematique moleculaire. 12e edition. Masson, Paris
- [7] Guignard J. L., Dupont F., 2004. Botanique Systematique moleculaire. 13e edition. Masson, Paris
- [8] Abedini, A. (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes (Doctoral dissertation, Université du Droit et de la Santé-Lille II).
- [9] Mahfouf, N. (2018). Étude de l'espèce *Origanum vulgare* L (Doctoral dissertation, Université Chadli Benjedid-El Tarf (Algérie)).
- [10] Bendif, H. (2017). Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae. *Ajuga iva*.
- [11] ADJOUJ, A. (2019). Auto écologie et biologie de la conservation de *Phlomis crinita* (Lamiaceae) des monts de Tessala, Algérie occidentale (Doctoral dissertation).
- [12] HAMMOUDI, R., & Mahfoud, H. M. (2015). Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional Algérien (Doctoral dissertation).
- [13] Bektas, T., Dimitra, D., Atalay, S., Munevver, S., & Moschos, P., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller. *Food Chemistry*, **90**, pp 333-340
- [14] Standley, P., And Williams, L., 1973. Labiateae. *Fieldiana Bot.* **24**: 237-317
- [15] Kabouche, A., 2005. Étude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiacées. Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine, 389p.
- [16] Quezel, P. et Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. C.N.R.S. Paris, p603, 781-793

- [17] **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
- [18] **Szentmihályi, K., Then, M., Csedő, C., 2004.** Comparative study on tannins, flavonoids, terpenes and mineral elements of some *Salvia* species. *Acta Hort*, 629: 463-470
- [19] **MECHIKI Imane, LAËLA Ihsen, BOUGUERRA Ibtissem,** Etude Phytochimique et Extraction des huiles essentielles de l'espèce *Salvia Aegyptiaca* (2019).
- [20] **Blumenthal M. (2000).** Herbal medicine, expanded commission E monographs in Integrative Medicine Communications, Newton.
- [21] **Kamatou G.P.P., Makunga N.P., Ramogola W.P.N., Viljoen A.M. (2008)** South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of ethnopharmacology*, 119(3): 664-672.
- [22] **BenFarhat M.B., Landoulsi A., Hamada R.C., Sotomayor J.A., Jordan M.J. (2013)** Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of by-products of *Salvia verbenaca* L. growing wild in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49: 373-379.
- [23] **Khlifi S., El Hachimi Y., Khalil A., Es-Safi N., Belahyan A., Tellal R., El Abbouyi A. (2006)** In vitro antioxidant properties of *Salvia verbenaca* L. hydromethanolic extract. *Indian journal of pharmacology*, 38(4): 276-280.
- [24] Selon **Bonnier, (1990),**
- [25] **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P. (2002)** Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. 1ère Ed : Paris et Bruxelles. pp. 369-384.
- [26] **DEEDI, 2016.** (Department of Employment, Economic Development and Innovation) Special edition of Environmental Weeds of Australia for Biosecurity Queensland. www.biosecurity.qld.gov.au
- [27] **Khosravi Dehaghi N., Ostad S. N., Maafi N., Pedram S., Ajani Y., Hadjiakhoondi A., Khanavi M. (2014)** Cytotoxic activity of the essential oil of *Salvia verticillata* L. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(3): 27-33.
- [28] **Taarit M. B., Msaada K., Hosni K., Amor N. B., Marzouk B., Kchouk M. E. (2010)** Chemical composition of the essential oils obtained from the leaves, fruits and stems of *Salvia verbenaca* L. from the northeast region of Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(5): 449-453.
- [29] **Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., Hseini S. (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (maroc occidental). *Revue de botanique. Les Editions De LEJEUNIA, Institut de Botanique, B22, Sart Tilman, B-4000 Liège (Belgique). Série N°186.*
- [30] **Holeman M., Berrada M., Bellakhdar J., Iidrissi A., Pinel R. ; (1985).** Comparative chemical study on essential oils from *Salvia officinalis*, *S. aucheri*, *S. verbenaca*, *S. phiomoides* and *S. argentea*. *Chim. Org. Struct.*, 55(3); 143-8
- [31] **Pitarokili D., Tzakou O., Loukis A. ; (2006).** Essential oil composition of *Salvia verticillata*, *S. verbenaca*, *S. glutinosa* and *S. candidissima* growing wild in Greece. *Flavour and Fragr. J* ; 21; 670-673.

- [32]Bahar A., Al-Howiriny T., Al-Rehaily A. J., Mossa J. s. ; (2004).Verbenacine and salvinine: two new diterpenes from *Salvia verbenaca*.Journal of Biosciences ; 59L21; 9-14.
- [33]Bel Hadj Salah K., Mahjoub M. A. , Ammar S., Michel L., Millet-Clerc J., Chaumont J. P., Mighri Z., Mahjoub A. ; (2006).Antimicrobial and antioxidant activities of the methanolic extracts of three *Salvia* species from Tunisia.Natural Product Research ; 203; 1110 — 1120.
- [34]2016 Et-Touys et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited
- [35] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal plants (second ed.). Paris: Lavoisier Publishing.
- [36]Mapola, G. (2003). Variation individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition chimique des huiles essentielles de *E. citriodora* acclimaté à Pointe-Noire(Congo-Brazzaville). Mémoire de DEA
- [37] Khan, I. A., Kulkarni, M. V., Gopal, M., Shahabuddin, M. S., & Sun, C. M. (2005).Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins.Bioorganic & medicinal chemistry letters, 15(15), 3584-3587.
- [38] Hemingway R.W. (1992) Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives.In: Lpantpolyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.
- [39]Nacoulama-Ouedraogo O. G. (1996) Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles auBurkina Faso, cas du plateau central, Tome I et II Thèse de Doctorat d'Etat. Université deOuagadougou.
- [40]Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M., & Orecchioni, A. M. (2001). Le préparateur en pharmacie dossier. 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275
- [41]Alignan, M. (2006). Phoma du tournesol: déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie (Doctoral dissertation).
- [42]Leonard, E., Yan, Y., & Koffas, M. A. (2006).Functional expression of a P450flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*.Metabolic engineering, 8(2), 172-181.
- [43]Saffidine, K., (2015). Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L.Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas-Sétif.
- [44]Decloitre F. (1993) Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. Cahiers de Nutrition et de diététique 28 (2):85-95.
- [45]Hertog M. G. (1996) Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids.Proceeding of the nutrition society 55 (1B):385-397.
- [46]Depeint F., Gee J. M., Williamson G., Johnson I. T. (2002) Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities.Proceeding of the Nutrition Society 61:97-103.
- [47]Cowan M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews ; 12(4): 564-570.

- [48] Mr M. Merghem .RAMLI Imene. ETUDE, IN VITRO, DE L'ACTIVITE ANTI LEISHMANIENNE DE CERTAINES PLANTES MEDICINALES LOCALES :CAS DE LA FAMILLE DES LAMIACEES (2013).
- [49] Muzitano M. F., Tinoco L. W., Guette C., Kaiser C. R., Rossi-Bergmann B., Costa, S. S.(2009) The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry* 67:2071-2077.
- [50] Tasdemir D., Kaiser M., Brun R., Yardley V., Schmidt T. J., Tosun F., Ruedi, P. (2006) Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(4):1352-1364
- [51] Halbwirth H., (2010). The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *Int. J. Molec. Sci.* 11:595–621,
- [52] Kale A., Gawande S., Kotwal S., (2008). Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*, 22, 567–577.
- [53] Leopoldini M., Russo N., Toscano M., (2010). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125, 288–306,
- [54] Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T., Hrdina R., (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*. 49, 963–975.
- [55] Dedet J. P. (1999). Leishmaniasis. *Leishmanioses clinique et thérapeutique*. Encycly Méd chir (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses : 8-506- A-20, 1995, 6p.
- [56] Sergent, E., Donatien A., et Beguet M. (1926). Transmission expérimentale du bouton d'Orient (clou de Biskra) à l'homme par *Phlebotomus papatasi* (Scop.). *Arch Inst Pasteur*, 40, 411-430.
- [57] Samake S. (2006). Épidémiologie de la leishmaniose cutanée à Kemena et Sougoula (cercle de baroueli). Thèse de Doctorant en pharmacie. Université de Bamako 86 p: 05-21.
- [58] OMS. (2014). La leishmaniose dans les pays à forte charge de morbidité : mise à jour épidémiologique à partir des données notifiées en 2014. *REH* 2016 ; 91 : 287-296.
- [59] OMS. (2002). Organisation Mondiale de la Santé. Stratégies recommandées par l'OMS contre les maladies transmissibles - prévention et lutte. [En ligne] 2002. http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CPE_SMT_2001.13.pdf.
- [60] OMS. (2000). Leishmanioses et les co-infections *Leishmania/HIV*. Aide-mémoire N°116 Révisé mai 2000 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/fr/>).
- [61] Salman S. M., Rubeiz N. G., Kibbi A. G., Dedet J. P. (1999). Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clinics in Dermatology*, 17: 291-6.
- [62] Dedet J.P. (2009). *Leishmaniasis, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique*. Elsevier Masson SAS, 8-506-A-10.
- [63] Meksi S. G. (2012). Les leishmanioses. Cours de collège de maladies infectieuses, microbiologie-parasitologie (Power Point en ligne).
- [64] Bouzeriba S., et Rouaiguia I. (2017). La leishmaniose cutanée dans la région de Guelma : Epidémiologie et diagnostic. Mémoire de master. Université 8 Mai Guelma.
- [65] Bachi F. (2001). Amélioration des moyens diagnostique des leishmanioses en Algérie. Thèse de Doctorat en Sciences Médicales. Faculté de Médecine. Université d'Alger.

- [66]Marty P. et Rosenthal E. (2002). Treatment of visceral leishmaniasis : a review of current treatment practices. *Expert Opin.Pharmacother.*3(8): 1101-1108.
- [67]Rioux J. A., Lanotte G., Petter G., Dereure J., Akalay O., Pratlong F., Velez I. D., Fikri N. B., Maazoun R., Denial M., Jarray D., Zahaf A., Ashford R.W., Cadi-Soussi M., Killick-Kendrick R., Ben Mansour N., Moreno G., Périères J., Guilvard E., Zribi M., Kennou M.F., Rispail P., Knechtli R. et Serres E. (1986). Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse écoépidémiologique, l'exemple de trois foyers : Tunisien, Marocain et Français. Coll Inter CNRS/INSERM1984, IMEEE Montpellier: 365-395.
- [68]Izri M.A., Belazzoug S., Pratlong F. et Rioux J. A. (1992). Isolement de *L. major* chez *Phlebotomus papatasi* à Biskra (Algérie). *Ann Parasitol Hum Comp*, 67: 31-32.
- [69]Harrat Z., Boubidi S. C., Pratlong F., Benikhlef R. et Selt B. (2009). Description of a dermatropic leishmania close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte et Pratlong 1986) in Algeria.*Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103: 716–720.
- [70]Boubidi S. C. (2006). Les phlébotomes vecteurs de leishmanioses. Edition plan national de lutte contre les leishmanioses. Atelier de formation sur les techniques d'échantillonnage,
- [71]Le Fichoux Y., Marty P., Kubar J. (1999) Diagnostic des leishmanioses. In : Dedet J.P. Ed. Lesleishmanioses. Paris : Ellipses, p190-203.
- [72]Mihoubi I. (2006) Etude des Leishmanioses Diagnostiquées au centre hospitalo universitaire BenBaddis De Constantine. Thèse de doctorat de l'université de Mentouri Constantine.
- [73]Dedet J.P. (2001) Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. Encyclopédie Médico-Chirurgical 8:506-510.
- [74]Carvalho P.B., Arribas M.A.G., Ferreira E.I. (2000) Leishmaniasis What do we know about itschemotherapy? *The Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 36(Suppl. 1):69–96.
- [75]Balana F.R., Reguera R., Cubria J.C., Ordonez D. (1998) The pharmacology of leishmaniasis. *Genetic and Pharmacology* 30:435–443.
- [76]Carvalho P.B., Ferreira E.I., (2001) Leishmaniasis phytotherapy.Nature's leadership against an ancient disease review. *Fitoterapia* 72:599–618.
- [77] Tahir A.E., Ibrahim A.M., Satti G.M.H., Theander T.G.,Kharazmi A., Khslid A.S. (1998) The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytotherapy Reseach* 12:576–579.
- [78]Grogl M., T.N. Thomason., E.D. Franke. (1992) Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *American journal of tropicalmedicine and hygiene*, 47(1):117-26.
- [79]Baiooco P. (2009) Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *Journal of Medicine and Chemistry* 52(8) :2603-12.
- [80]Sanhaji O, Farid M, Ellyachiwoui M. (2005). Etude de l'activité antifongique de divers extrait de canelle ; *journal de Micrologai Médicale* ;(15) :220-229.
- [81] Bruneton J(2009). Pharmacognosie, (Phytochimie, Plantes médicinales). . 4th édition. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Paris.
- [82] Harborne JB (1984). Phytochemical methods, 2nd ed. Springer. Chapman and Hall, New York, London. P. 288.

[83] Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.

[84] Boumerfeg, S., Baghiani, A., Messaoudi, D., Khennouf, S., & Arrar, L. (2009).

Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytotherapy Research : An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(2) : 283-288.

[85] Baghiani, A., Ameni, D., Boumerfeg, S., Adjadj, M., Djarmouni, M., Charef, N., & Arrar, L. (2012). Studies of antioxidants and xanthine oxidase inhibitory potentials of root and aerial parts of medicinal plant *Capparis spinosa* L. *American journal of medicine and medical sciences*, 2(1) : 25-32.

[86] Boumerfeg, S., Baghiani, A., Messaoudi, D., Khennouf, S., & Arrar, L. (2009).

Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytotherapy Research : An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(2) : 283-288.

[87] Baghiani, A., Ameni, D., Boumerfeg, S., Adjadj, M., Djarmouni, M., Charef, N., & Arrar, L. (2012). Studies of antioxidants and xanthine oxidase inhibitory potentials of root and aerial parts of medicinal plant *Capparis spinosa* L. *American journal of medicine and medical sciences*, 2(1) : 25-32.

[88] Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dîner T, Luyckx M, Vasseur J, Cazin M, Cazin JC, Pinkas M. (1996). Activité de piégeage des espèces d'oxygène d'extraits phénoliques d'organes de plantes fraîches d'aubépine et de préparations pharmaceutiques., *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089

[89] Prior, R.L. Wu, X. Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290-4302.

[90] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2): 211-219.

[91] Boumerfeg, S., Baghiani, A., Messaoudi, D., Khennouf, S., & Arrar, L. (2009).

Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytotherapy Research : An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(2) : 283-288.

[92] Baghiani, A., Ameni, D., Boumerfeg, S., Adjadj, M., Djarmouni, M., Charef, N., & Arrar, L. (2012). Studies of antioxidants and xanthine oxidase inhibitory potentials of root and aerial parts of medicinal plant *Capparis spinosa* L. *American journal of medicine and medical sciences*, 2(1) : 25-32.

[93] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1) : 25-30.

[94] Sharififar, F., Moshafi, M. H., Mansouri, S. H., Khodashenas, M., & Khodshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food control*, 18 (7): 800-805.

[95]NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Performance Standards for Anti-Microbial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement. Wayne, PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standard (2001).NCCLS. Document M100-S11

