

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

N° Ref :.....



**Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF-Mila**

Institut des Sciences et de la Technologie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

**Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de  
Master**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Biotechnologie  
Spécialité : Biotechnologie Végétale

**Thème :**

**Caractérisation biochimique et évaluation des  
activités biologiques des extraits phénoliques  
de l'espèce *salvia officinalis* L.**

**Préparé par:** KASRANI Khawla  
MOUHOUB Ilhem

**Devant le jury composé de :**

<b>Président :</b> HIMOUR Sara.	(MCB)	Centre universitaire de Mila. .
<b>Examineur :</b> YAHIA Abdelouhab.	Professeur	Centre universitaire de Mila.
<b>Promoteur :</b> Boukeria Sabah.	(MCB)	Centre universitaire de Mila.

**Année Universitaire: 2018/2019**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## *Remerciement*

*Avant tout chose, nous remercions Dieu ,le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage , la volonté et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*On exprime d'abord nos profonds remerciements à notre encadreur **M<sup>me</sup>BOUKERIA Sabah** ; pour l'honneur qu'il nous a fait de nous encadrer, pour son soutien, son attention, ses encouragements et ses bons conseils. Pour tout cela on tient à lui exprimer toute notre gratitude*

*Nous tenons également mes vifs remerciements aux membres de jury:*

***M<sup>me</sup> HIMOUR Sara** , d'avoir accepté de présider ce travail.*

***M<sup>er</sup> YAHIA Abed elouheb**, d'avoir examiné ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à Dr.MIROUH .A; pour son aide inestimable, ces efforts avec nous et sa gentillesse ; à tout le personnel du laboratoire d'analyses médicale : Dr. Mirouh.A à Ferdjioua.*

*Nous remercions également tous les membres de laboratoire de centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila. Merci pour le soutien et pour vos efforts avec nous.*

*nous voulons dire merci à tous les enseignants et les administrateurs du département des Sciences de la Nature et de la Vie , pour l'aide pendant ma formation d'étude*

*Enfin nos remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.*

***Merci***



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa patience.*

*A mon très cher père pour tous ce qu'il a fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour ses encouragements et ses orientations.*

*Je dédie aussi ce modeste travail :*

*A mon cher frère **Salah Eddine** et ma chère sœur **Manel**. Je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur.*

*A toute ma famille.*

*A mes amies plus chères : Sara ; Imane ; Aicha ; Noussaiba; Houda ; et Yasmine*

*A mon beau binôme Khawla.*

*Et a tous mes collègues de promotion 2019.*



**ILHEM**



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes chers parents qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance , : Mon cher papa **Amer** et ma tendre maman **Djamila** ,pour leurs sacrifices, leurs conseils et leurs encouragements durant toute ma période d'étude*

*merci d'être là, Sans vous, rien n'aurait été possible, Merci pour votre soutien et votre confiance...*

*Je souhaite une longue vie et que le Dieu me la garde.*

*A mes chers soeurs : **Nassima**, **Nawal**, **Wided**, **Rabia**, **Sabah** et **Madiha** ; à leur encouragements dans les moments difficiles ; merci pour votre amour.*

*A mes chers frères qui ont toujours été présents pour moi ; **fateh** et sa marie **Bouchra** ,**imad** et sa marie **Nadia**, et **houcin**, . Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur.*

*A mes fidèles amies : **Ilhem** ,**Noussaiba** , **Yasmin** , **Houda** et **Aicha**; merci pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.*

*A toute ma famille du petit au grand.*

*A mes collègues.*

*A tous mes enseignants.*

*A tous ceux qui me sont chers.*



**KHAWLA**

### Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de l'une des plantes de la famille des Lamiacées réputées pour leurs vertus thérapeutiques, nous sommes intéressés à l'étude de la plante *salvia officinalis* connue par sa richesse en matière active utilisée par la population locale dans différents thérapies.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante, anticoagulante et antibactérienne des polyphénols obtenus à partir des extraits de feuilles de *S.officinalis*.

Cette étude est initiée par un screening phytochimique réalisés sur différentes extraits des feuilles de SO, qui nous a permis d'avoir une idée générale sur les différents groupes chimiques qu'elles contiennent.

Les résultats de dosage des polyphénols, montrent que les extraits méthanolique et aqueux de SO, sont riche en polyphénols totaux mais avec des quantités différentes. L'extrait méthanolique, présente une teneur en polyphénols totaux plus importante que l'extrait aqueux avec des valeurs ( $30.378 \pm 0.0467$  mgEAG/g) et ( $19.896 \pm 0,1176$  mgEAG/g) respectivement.

L'évaluation in vitro de l'activité antioxydante de nos extraits méthanolique et aqueux de SO ,utilisant le radical DPPH , révèle que *S. officinalis* possède de bonne activité antioxydante particulièrement pour l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux . Avec des IC50 de 0.119 mg /ml et de 0.196 mg/ml respectivement.

L'activité anticoagulante des polyphénols de SO a été également évaluée in vitro en utilisant les tests du temps de Quick (TQ) et du temps de céphaline-kaolin (TCK).Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence de ces polyphénols exercent une activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation.

Le temps de coagulation le plus élevé pour les deux tests est obtenu par le volume 30 $\mu$ L,ce dernier est capable d'allonger le temps de coagulation de TCK avec un valeur de 130.4s pour l'extrait méthanolique et un valeur de 36.4s pour l'extrait aqueux . Tandis que le temps d'allongements de TQ est de 107.67s pour l'extrait méthanolique et 15,67s pour l'extrait aqueux.

L'activité antibactérienne des deux extraits étudiés (méthanolique et aqueux) a été déterminée in vitro sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion sur disque. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique exerce un effet très puissant à inhiber

l'ensemble des souches testées particulièrement *S aureus* une zone d'inhibition de  $21,01 \pm 0,97$  mm a été mesurée. Alors que l'extrait aqueux ne présente aucun effet antibactérien vis-à-vis toutes les souches testées.

**Mots clés:** *salvia officinalis*, screening phytochimique, polyphénols, activité antioxydante, activité anticoagulante, activité antibactérienne.

## الملخص

هذا العمل هو جزء من استغلال أحد النباتات الطبية التي تنتمي الى العائلة الشفوية المعروفة بخصائصها العلاجية ، ونحن مهتمون بدراسة نبات الميرمية *Salvia officinalis* المعروف بغناه بالمواد الفعالة المستخدمة من طرف السكان المحليين في مختلف العلاجات.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة ، المضاد للتخثر والمضاد للبكتيريا لعديدات الفينول المستخلصة من أوراق الميرمية .

بدأت هذه الدراسة من خلال حصر كيميائي نباتي أجري على مستخلصات مختلفة من أوراق SO، مما سمح لنا بتكوين فكرة عامة عن المجموعات الكيميائية المختلفة التي تحتوي عليها.

بين التقدير الكمي لعديدات الفينول أن المستخلص المائي و الكحولي للميرمية غني بالمركبات الفينولية لكن بكميات مختلفة. يحتوي المستخلص الكحولي على محتوى إجمالي أكبر من عديدات الفينول مقارنة بالمستخلص المائي بقيم (0.0467±30.378 ملغم / غ) و (0.1176±19.896 ملغم / غ) على التوالي.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال اجراء دراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الكحولي و المائي للميرمية بواسطة ازالة الجذور الحرة DPPH، أن للميرمية نشاط مضاد للأكسدة جيد وخاصة بالنسبة لمستخلص الكحولي مقارنة بالمستخلص المائي. مع IC50 من 0.119 ملغ / مل و 0.196 ملغ / مل على التوالي.

النشاط المضادة لتخثر الدم لمستخلصات عديدات الفينول للميرمية تم تقديرها باستعمال اختبارين : اختبار زمن كويك (TQ) و اختبار céphaline kaolin (TCK) أزمنة التخثر المتحصل عليها في بلازما عادية بوجود هذه المستخلصات تظهر بأن مواد الأيض هذه تمارس نشاط مضاد لتخثر الدم على كل مسرى التخثر الدموي.

يتم الحصول على أعلى وقت للتخثر لكلا الاختبارين من خلال الحجم 30µL ، وهذا الأخير قادر على تمديد فترة التخثر TCK بقيمة 130.4 ثانية للمستخلص الكحولي وقيمة 36.4 ثانية للمستخلص مائي. في حين أن وقت استتالة TQ هو 107.67 ثانية للمستخلص الكحولي و 15.67 ثانية للمستخلص المائي.



تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا في المستخلصين المدروسين في المختبر على أربع سلالات بكتيرية ، وفقاً لطريقة انتشار القرص حيث. أظهرت النتائج أن مستخلص الكحول يمارس تأثيراً قوياً للغاية في تثبيط جميع السلالات التي تم اختبارها ، خاصة في حالة S aureus بمنطقة تثبيط قدرها  $\pm 21.01$  مم. في حين أن المستخلص المائي ليس له أي تأثير مضاد للبكتيريا.

**الكلمات المفتاحية :** الميرمية, معاينة بيو كيميائية ,عديدات الفينول, النشاط المضاد للأكسدة , النشاط المضاد للتخثر , النشاط المضاد للبكتيريا.

### Abstract

This work is part of the valorization of one of the Lamiaceae plants famous for their therapeutic virtues, we are interested in the study of the plant *salvia officinalis* known for its rich active ingredient used by the local population in different therapies.

The objective of this study is to evaluate the antioxidant, anticoagulant and antibacterial activity of polyphenols obtained from leaf extracts of *S.officinalis*.

This study is initiated by a phytochemical screening carried out on different extracts of SO leaves, which allowed us to have a general idea about the different chemical groups that they contain.

The polyphenol assay results show that the methanolic and aqueous extracts of SO are rich in total polyphenols but with different amounts. The methanolic extract has a greater total polyphenol content than the aqueous extract with values ( $30,378 \pm 0.0467$  mgEAG / g) and ( $19,896 \pm 0,1176$  mgEg / g) respectively.

The in vitro evaluation of the antioxidant activity of our methanolic and aqueous SO extracts, using the DPPH radical, reveals that *S. officinalis* has good antioxidant activity particularly for the methanolic extract relative to the aqueous extract. With IC<sub>50</sub> of 0.119 mg / ml and 0.196 mg / ml respectively.

The anticoagulant activity of SO polyphenols was also evaluated in vitro using the tests of the time of Quick (TQ) and the time of cephalin-kaolin (TCK). The coagulation times obtained on a normal plasma in the presence of these polyphenols exert anticoagulant activity on both ways of coagulation.

The highest coagulation time for both tests is obtained by the volume 30 $\mu$ L, the latter is able to extend the TCK coagulation time with a value of 130.4s for the methanolic extract and a value of 36.4s for the aqueous extract. While the elongation time of TQ is 107.67s for the methanolic extract and 15.67s for the aqueous extract.

The antibacterial activity of the two extracts studied (methanolic and aqueous) was determined in vitro on four bacterial strains, according to the disk diffusion method. The results show that the methanolic extract exerts a very powerful effect in inhibiting all the strains tested, particularly in the case of a zone of inhibition of  $21.01 \pm 0.97$  mm. when the aqueous extract has no antibacterial effect vis-à-vis all strains tested.

**Key words:** *salvia officinalis*, phytochemical screening, polyphenols, antioxidant activity, anticoagulant activity, antibacterial activity.

**Liste des Abréviations**

<b>%</b> : Pourcentage	<b>I%</b> : pourcentage d'inhibition
<b>(-)</b> : négatif	<b>IC50</b> : Concentration inhibitrice à 50%
<b>(+)</b> : positif	<b>KOH</b> : Hydroxyde de potassium
<b>AAO</b> : Activité antioxydante	<b>l</b> : litre
<b>Abs</b> : Absorbance	<b>m</b> : mètre
<b>ADN</b> : acide désoxyribo nucleotide.	<b>Me</b> : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant
<b>AlCl3</b> : Chlorure d'aluminium	<b>mg</b> : milligramme
<b>ASC</b> : Acide ascorbique	<b>mg EAG/gES</b> : mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec
<b>ATCC</b> : American type culture collection	<b>Mg<sup>2+</sup></b> : Magnésium
<b>AVK</b> : anti vitamine k	<b>MH</b> : Muller-Hinton
<b>BHA</b> : le butylhydroxyanisol,	<b>min</b> : minute
<b>BHT</b> : butylhydroxytoluène,	<b>ml</b> : millilitre
<b>BN</b> : Bouillon nutritif	<b>mm</b> : millimètre
<b>CaCl<sub>2</sub></b> : chlorure de calcium	<b>Mo8023</b> : molybdène.
<b>CHCl<sub>3</sub></b> : Chloroforme	<b>MS</b> : Matière sèche pour l'extraction
<b>cm</b> : centimètre	<b>Mv</b> : Masse de la matière végétale utilisée
<b>CMI</b> : Concentration Minimale Inhibitrice	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> : carbonate de sodium
<b>CN<sub>10</sub></b> :Gentamicine	<b>NaOH</b> : Hydroxyde de sodium.
<b>D</b> : Diamètre	<b>NH<sub>4</sub>OH</b> : Hydroxyde d'ammonium.
<b>DO</b> : densité optique	<b>nm</b> : Nanomètre.
<b>DPPH</b> : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle)	<b>O<sub>2</sub></b> : L'oxygène
<b>DRO</b> : Les dérivés réactifs de l'oxygène	<b>°C</b> : Degré Celsius
<b>DZI</b> : diamètre de la zone d'inhibition	<b>OMS</b> : organisation mondiale de la santé
<b>E-AQ</b> : Extrait aqueux	<b>pH</b> : Potentiel d'hydrogène
<b>E-meth</b> : Extrait méthanolique	<b>PPP</b> : plasma pauvre en plaquettes
<b>ERN</b> : Espèces libres non oxygénées	<b>ROS</b> : réactifs oxygènes species
<b>ERO</b> : Espèces réactives oxygénés	<b>Rpm</b> : Rotation par minute

## *Liste des Abréviations*

<b>F3P</b> : facteur 3 plaquettaire	<b>S</b> : Secondes
<b>FECL3</b> : Chlorure ferrique	<b>SO</b> : <i>Salvia officinalis</i>
<b>g</b> : gramme	<b>SXT25</b> : cotrimoxazol
<b>g/l</b> : Rapport gramme par litre	<b>TBHQ</b> : le tertbutylhydroquinone
<b>g/mol</b> : Rapport gramme par mol	<b>TCK</b> : temps de céphaline-kaolin
<b>h</b> : heure	<b>TP</b> : taux de prothrombine
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : Peroxydes d'hydrogène	<b>TP</b> : taux de prothrombine
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> : Acide phosphorique	<b>TQ</b> : Temps de Quick
<b>H3 PMO12 O40</b> : Acide phosphomolybdique.	<b>UFC</b> : units forming colony
<b>H3 PW12 O40</b> : Acide phosphotungstique.	<b>v/v</b> : rapport volume par volume
<b>HBMP</b> : les héparines de bas poids moléculaire	<b>W8O23</b> : Oxyde bleu de tungstène.
<b>HBMP</b> : Héparines de bas poids moléculaire	<b>µg</b> : microgramme.
<b>HCL</b> : Acide chlorhydrique	<b>µl</b> : microlitre
<b>HE</b> : Les huiles essentielles	<b>R %</b> : Rendement en %
<b>HNF</b> : l'héparine non fractionnée	<b>AAB</b> : Activité antibactérienne

**Liste des figures**

<b>N° de la figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 01</b>	Structure de base des composés phénoliques	<b>04</b>
<b>Figure 02</b>	Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols	<b>05</b>
<b>Figure 03</b>	Structure de base des acides benzoïques cinnamique	<b>06</b>
<b>Figure 04</b>	Structure de base des flavonoïdes	<b>07</b>
<b>Figure 05</b>	structure de base des coumarines	<b>07</b>
<b>Figure 06</b>	Structures chimiques (a) d'un tanin condensé et (b) d'un tanin hydrolysables	<b>08</b>
<b>Figure 07</b>	Structure chimique de l'isoprène	<b>09</b>
<b>Figure 08</b>	Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant	<b>14</b>
<b>Figure 09</b>	Cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène	<b>19</b>
<b>Figure 10</b>	Feuilles de la sauge officinale	<b>29</b>
<b>Figure 11</b>	Fleurs de la sauge officinale	<b>29</b>
<b>Figure 12</b>	Fruits de la sauge officinale	<b>29</b>
<b>Figure 13</b>	Les feuilles de salvia officinalis	<b>36</b>
<b>Figure 14</b>	La poudre de salvia officinalis	<b>37</b>
<b>Figure 15</b>	Les étapes de la macération éthanolique	<b>38</b>
<b>Figure 16</b>	Test des alcaloïdes	<b>39</b>
<b>Figure 17</b>	Test des polyphénols	<b>40</b>
<b>Figure 18</b>	Test des glycosides	<b>41</b>
<b>Figure 19</b>	Test des saponosides	<b>42</b>
<b>Figure 20</b>	Les étapes de préparation de l'extrait méthanolique	<b>43</b>

<b>Figure 21</b>	Les étapes de préparation de l'extrait aqueuse	<b>43</b>
<b>Figure 22</b>	Les étapes de dosage des polyphénols totaux	<b>45</b>
<b>Figure 23</b>	Protocole de dosage des polyphénols totaux	<b>45</b>
<b>Figure 24</b>	Structure chimique du radical DPPH et de sa forme réduite	<b>46</b>
<b>Figure 25</b>	Préparation de la solution DPPH	<b>47</b>
<b>Figure 26</b>	Les étapes de test DPPH	<b>48</b>
<b>Figure 27</b>	Protocole d'évaluation de l'activité antioxydant	<b>48</b>
<b>Figure 28</b>	Les étapes de préparation d'un pool de plasma	<b>50</b>
<b>Figure 29</b>	préparation d'un pool de plasma	<b>50</b>
<b>Figure 30</b>	L'évaluation de TQ par coagulomètre	<b>51</b>
<b>Figure 31</b>	L'évaluation manuelle de TQ	<b>52</b>
<b>Figure 32</b>	Protocole d'évaluation de l'activité anticoagulante (TQ)	<b>52</b>
<b>Figure 33</b>	L'évaluation de TCK par coagulomètre	<b>53</b>
<b>Figure 34</b>	Protocole d'évaluation de l'activité anticoagulante (TCK)	<b>54</b>
<b>Figure 35</b>	Préparation de milieu de culture	<b>56</b>
<b>Figure 36</b>	Les différentes concentrations des extraits	<b>57</b>
<b>Figure 37</b>	La préparation de l'inoculum	<b>57</b>
<b>Figure 38</b>	L'ensemencement des boites	<b>58</b>
<b>Figure 39</b>	La lecture des résultats	<b>59</b>
<b>Figure 40</b>	Résultat du test des alcaloïdes	<b>62</b>
<b>Figure 41</b>	Résultat du test de coumarines	<b>62</b>
<b>Figure 42</b>	Résultat du test des tannins	<b>63</b>
<b>Figure 43</b>	Résultat du test des substances polyphénoliques	<b>63</b>
<b>Figure 44</b>	Résultat du test des anthraquinones	<b>64</b>
<b>Figure 45</b>	Résultat du test des anthocyanes	<b>64</b>

<b>Figure 46</b>	Résultat du test des glycosides	<b>65</b>
<b>Figure 47</b>	Résultat du test des stérols et triterpènes	<b>65</b>
<b>Figure 48</b>	Résultat du test des quinones	<b>66</b>
<b>Figure 49</b>	Résultat du test des quinones libres	<b>66</b>
<b>Figure 50</b>	Résultat du test des Saponines	<b>67</b>
<b>Figure 51</b>	Résultat du test des Flavonoïdes	<b>67</b>
<b>Figure 52</b>	Rendement en extrait : méthanolique et aqueux de l'espèce <i>Salvia officinalis</i> L.	<b>68</b>
<b>Figure 53</b>	Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique	<b>69</b>
<b>Figure 54</b>	Teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>Salvia officinalis</i>	<b>69</b>
<b>Figure 55</b>	Capacité anticoagulante des extraits méthanolique et aqueux de <i>S officinalis</i> vis-à-vis de la voie exogène	<b>80</b>
<b>Figure 56</b>	Capacité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de <i>S officinalis</i> vis-à-vis de la voie endogène	<b>81</b>
<b>Figure 57</b>	Diamètre des zones d'inhibition des deux antibiotiques testés et de témoins négatif	<b>85</b>
<b>Figure 58</b>	Représentation graphique de diamètre des zones d'inhibition des deux antibiotiques sur les différentes souches testées	<b>86</b>
<b>Figure 59</b>	Effet des extraits méthanolique et aqueux de SO sur les bactéries étudiées	<b>88</b>
<b>Figure 60</b>	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de SO avec différentes bactéries	<b>88</b>
<b>Figure 61</b>	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait aqueux de SO avec différentes bactéries	<b>88</b>



Liste des tableaux

N° de tableau	Titre	Page
<b>Tableau 01</b>	Structure des squelettes des polyphénols	09
<b>Tableau 02</b>	Classification des terpènes	11
<b>Tableau 03</b>	Facteurs de la coagulation plasmatique	18
<b>Tableau 04</b>	classification taxonomique de <i>Salvia officinalis</i>	28
<b>Tableau 05</b>	Principales classes de composés phénoliques identifiées dans les feuilles de <i>Salvia officinalis</i>	32
<b>Tableau 06</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	34
<b>Tableau 07</b>	Fraction de polysaccharides et autres composés identifiés dans les feuilles de <i>Salvia officinalis</i>	35
<b>Tableau 08</b>	Souches bactériennes testées	55
<b>Tableau 09</b>	Classement de la sensibilité bactérienne selon le diamètre d'inhibition	59
<b>Tableau 10</b>	résultats des tests phytochimiques	61
<b>Tableau 11</b>	Effet paramètre étudiés sur l'AAO	72
<b>Tableau 12</b>	Effet extrait sur l'AAO	73
<b>Tableau 13</b>	Effet dilution sur l'AAO	73
<b>Tableau 14</b>	Effet interaction extrait / temps sur l'AAO	74
<b>Tableau 15</b>	Effet interaction extrait / dilution sur l'AAO	75
<b>Tableau 16</b>	Effet interaction temps / dilution sur l'AAO	76
<b>Tableau 17</b>	La concentration inhibitrice (IC50) d'extrait méthanolique et aqueux de SO et d'ASC	77

<b>Tableau 18</b>	Activité antibactérienne des antibiotiques vis-à-vis des souches étudiées.	84
<b>Tableau 19</b>	Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait méthanolique et aqueux de SO.	86
<b>Tableau 20</b>	Valeurs des concentrations minimales inhibitrices de l'extrait méthanolique de SO	89

**Table des matières**

**Remerciment**

**Dédicaces**

**Résumé**

**الملخص**

**Abstract**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction générale**

***Partie 1 : Synthèse bibliographique***

**✚ *Chapitre I : Les plantes médicinales et les métabolites secondaires***

1. Plantes médicinales.....	3
2. Phytothérapie.....	3
3. Métabolites secondaires :.....	3
<b>3.1. Composés phénoliques</b> .....	<b>4</b>
3.1.1. Acides phénoliques : .....	6
3.1.2. Flavonoïdes .....	6
3.1.3. Coumarines.....	7
3.1.4. Tanins .....	8
3.1.5. Quinones.....	8
3.1.6. Saponines .....	9
3.2. Alcaloïdes.....	9
3.3. Huiles essentielles .....	10
3.3.1. Composés terpéniques.....	10
3.3.2. Phénylpropanoïdes .....	11

**✚ *Chapitre II : Les activités biologiques***

1. Activité antioxydant .....	13
1.1. Stress oxydatif .....	13
1.1.1. Définition .....	13
1.1.2. Conséquence de stress oxydatif.....	14
1.2. Radicaux libres .....	15

1.2.1. Définition .....	15
1.2.2. Nature des radicaux libres :.....	15
1.2.2.1. Espèces réactives dérivées de l’oxygène (ERO) .....	15
1.2.2.2. Espèces libres non oxygénées (ERN).....	15
1.3. Antioxydants : .....	16
1.3.1. Définition .....	16
1.3.2. Types d’antioxydants .....	16
1.3.2.1. Antioxydants de synthèse .....	16
1.3.2.2. Antioxydants naturels .....	16
1.3.3. Utilisation des antioxydants .....	16
2. Activité anticoagulante : .....	17
2.1. Coagulation du sang .....	17
2.2. Facteurs de la coagulation .....	17
2.3. Voies de la coagulation : .....	18
2.3.1. Voie endogène.....	18
2.3.2. Voie exogène.....	19
2.4. Anticoagulants :.....	20
2.4.1. Héparines :.....	20
2.4.2. Anti vitamines K .....	20
2.4.2. Nouveaux anticoagulants .....	21
3. Activité antibactérienne.....	21
3.1. Description des bactéries étudiées.....	21
3.2. Antibiotiques .....	23
3.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques :.....	23
4. Activité antibactérienne des polyphénols.....	23
3.5. Modes d’action des composés phénoliques sur les bactéries.....	24
3.6. Méthodes d’évaluation de l’activité antibactérienne.....	25

 **Chapitre III : Etude de la Sauge (*Salvia officinalis*)**

1. Généralités .....	27
2. Classification taxonomique .....	27
3. Description Botanique .....	28
4. Origine et répartition géographique.....	30
5. Ecophysiologie .....	30
6. Propriétés de la sauge .....	30

6.1. Propriétés médicinales.....	30
6.2. Propriétés culinaires .....	31
6.3. Propriétés en phytocosmétologie .....	32
7.Composés chimiques : .....	32
7.1.Composés phénoliques.....	32
7.2. Huile essentielle .....	33
7.3. Polysaccharides et autres constituants.....	34

## ***Partie 2:Etude expérimentale***

### ***✚ Chapitre I : Matériel et méthodes***

1. Matériel.....	36
1.1. Matériel végétal.....	36
1.2. Matériel de laboratoire .....	36
1.3. Produits chimiques et réactifs .....	36
2. Méthodes .....	36
2.1. Préparation du matériel végétal.....	36
2.2. Préparation des extraits .....	37
2.2.1. Protocole de la macération éthanolique .....	37
2.2.2. Protocole de la macération aqueuse .....	38
2.3. Screening phytochimique.....	38
2.4.Extraction des polyphénols .....	42
2.4.1.Préparation de l'extrait méthanolique .....	42
2.4.2. Préparation de l'extrait aqueux .....	43
2.4.3.Détermination du rendement de l'extraction.....	43
3.5. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de FolinCiocalteu) .....	44
2.5.1. Mode opératoire .....	44
3.6. Activité antioxydant .....	46
2.6.1. Piégeage du radical DPPH .....	46
2.6.1.1. Mode opération.....	47
2.7. Activité anticoagulante.....	49
2.7.1. Préparation du pool plasmatique.....	49
2.7.2.Test de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène (TQ) .....	51
2.7.2.1. Mode opératoire.....	51
2.7.3.Test de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène (TCK) .....	52

2.7.3.1. Mode opératoire.....	53
2.8.Activité antibactérienne : .....	54
2.8.1. Aromatogramme (Méthode de diffusion sur disque) :.....	54
2.8.2. Souches bactériennes testées .....	55
2.8.3.Choix des antibiotiques utilisés.....	55
2.8.4. Milieux de cultures utilisés .....	56
2.8.5. Mode opératoire .....	56
2.9.Analyse statistique.....	60

 **Chapitre II : Résultats et discussion**

1. Résultats de screening phytochimique .....	61
2.Résultats de rendement des extraits bruts.....	67
3. Résultats de dosage des polyphénols totaux ( <i>salvia officinalis</i> L.).....	68
4. Discussion.....	70
5. L'activité antioxydante .....	71
5.1. Résultats .....	72
5.1.1. Analyse des effets des paramètres étudiés sur l'AAO .....	72
5.1.2. Valeurs d'IC50 .....	76
5.2 Discussion .....	78
6. Activité anticoagulante .....	79
6.1. Résultats .....	79
6.1.1. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène .....	79
6.1.2. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène .....	81
6.2. Discussion .....	82
7. Activité antibactérienne.....	83
7.1. Résultats .....	83
7.1.1. Résultats de l'effet antibactérien des antibiotiques .....	84
7.1.2. Résultats de l'activité antibactérienne des deux extraits bruts (méthanolique et aqueux) et de leurs dilutions.....	86
7.1.3. Détermination de la CMI.....	89
7.2. Discussion .....	89

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes



***Introduction générale***

Depuis longtemps, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, pour traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (**Zeghad, 2009**). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que près de 80 % habitants qui peuplent la planète a essentiellement recours aux médecines traditionnelles (**Moutinho, 2013**).

Dans ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressaient aux composés des plantes qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Guiné et Goncalves, 2016**), il est d'abord intéressant de remarquer qu'environ 25% des médicaments prescrits dans le monde proviennent de plantes. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires (**Ongilagha et al., 2003**).

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante (**Buchanan, 2007**).

Beaucoup de plantes sont particulièrement riches en composés phénoliques, ces composés présentent le groupe de métabolites secondaires le plus important à cause de leurs structures chimiques diversifiées. Les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes, possèdent des propriétés antioxydants, anticoagulantes, antimicrobiennes, hépato-protectrices, gastro-protecteur et anticancéreuses...etc. (**Hammoudi et al., 2012**).

La plante sur laquelle a porté notre choix d'étude est une espèce de la sauge (*Salvia officinalis*) de la famille des Lamiacées qui est parmi les familles de plantes les plus utilisées comme matière première en pharmacie et en industrie alimentaire grâce à sa grande teneur en composés bioactifs, (**Bektas et al., 2005; Kivrak et al., 2009**).

L'objectif de notre travail a été entrepris afin de réaliser une étude phytochimique, ainsi que d'évaluer les activités antioxydante, anticoagulante et antibactérienne des extraits phénoliques des feuilles de *S.officinalis*. Notre étude est divisée en deux parties :



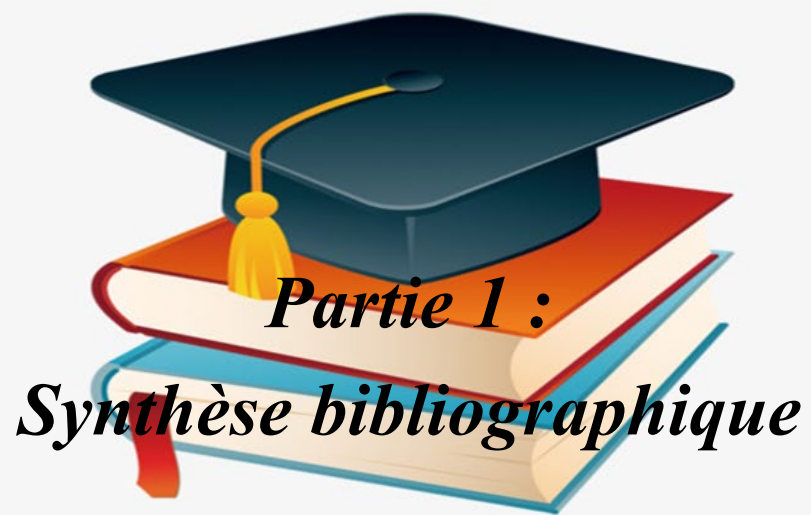
La première partie concerne la synthèse bibliographique, elle renferme trois chapitres :

- Le premier chapitre comporte des généralités sur les plantes médicinales et les métabolites secondaires.
- Le deuxième chapitre est dédié à un rappel sur les activités biologiques étudiées.
- Le troisième chapitre apporte des généralités sur l'espèce étudiée.

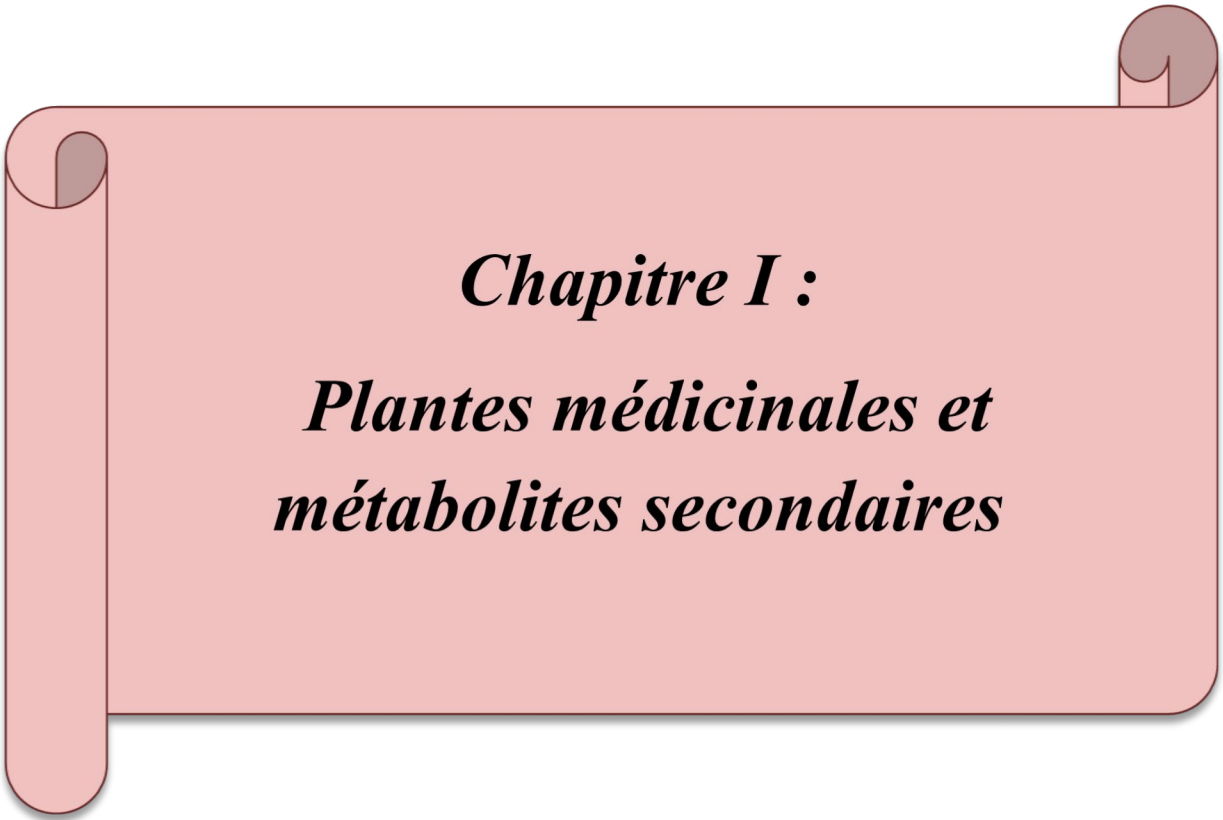
La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale, qui porte deux chapitres :

- Le premier chapitre traite le matériel et les différentes méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail.
- Le deuxième chapitre englobe l'ensemble des résultats obtenus avec leur discussion.

Enfin nous avons terminés notre travail par une conclusion et perspectives.



*Partie 1 :*  
*Synthèse bibliographique*



***Chapitre I :***  
***Plantes médicinales et***  
***métabolites secondaires***

## **1. Plantes médicinales**

L'être humain utilise des plantes depuis des milliers d'années pour traiter divers maux, le monde végétale est à l'origine d'un grand nombre de médicaments, les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important, malgré l'existence et l'influence de système sanitaire moderne, environ 35000 espèces des plantes sont utilisées dans le monde à des fins médicinales ce qui forme le plus important éventail de la biodiversité utilisé par les êtres humains (**Fransworth *et al.*, 1986**).

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schauenberg et Paris ,2006**). Les plantes aromatiques sont utilisées comme tous les végétaux en médecine, en parfumerie, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire (**El amri *et al.* ,2014**).

## **2. Phytothérapie**

Le recours à la phytothérapie s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité, non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans le système de santé (**Khalil *et al.*, 2007**).

La phytothérapie est la science qui étudie le traitement par les plantes dont une ou plusieurs parties contiennent des substances agissant sur une ou plusieurs pathologies ou sur un symptôme (**Goetz , 2013**).

## **3. Métabolites secondaires :**

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisés et accumulés en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures (**Hartmann, 2007**).

Les métabolites secondaires ont une répartition limitée, dans la plante elle-même comme parmi les différentes espèces de végétaux, Ils sont typiquement produits dans un organe, tissu ou type cellulaire spécifique à des stades particuliers du développement (**Raven *et al.*,2003**).

Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles: les polyphénols, les alcaloïdes et les huiles essentielles (**Lutge *et al.*, 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007**).

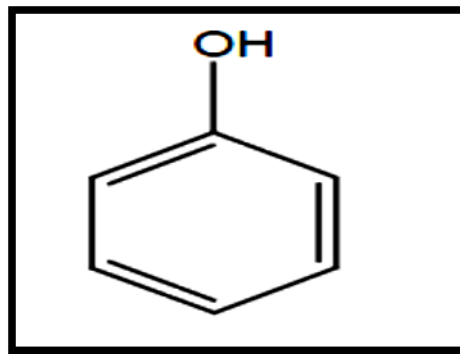
### 3.1. Composés phénoliques :

#### ❖ Définition

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques spécifique du règne végétal (**Bravo, 1998**). Elles regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules (**Hennebelle et al., 2004**).

#### ❖ Structure

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique (Figure 01) (**Bravo, 1998 ; Mompon et al., 1998**). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples comme les acides phénoliques simples vers les molécules les plus hautement polymérisées comme les tanins condensés (**Macheix et al., 2005**).



**Figure 01** : Structure de base des composés phénoliques (**Macheix et al., 2006**).

#### ❖ Biosynthèse :

Ces composés sont synthétisés par deux grandes voies métaboliques: la voie de l'acide shikimique et la voie d'acétate malonate.

##### • Voie de l'acide shikimique

C'est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes. Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont respectivement produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques (C6-C1) formant les tanins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés (**Dewick, 1995**). Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la

phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. Ce sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

- **Voie d'acétate malonate**

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Akroum , 2010) (Figure 02).

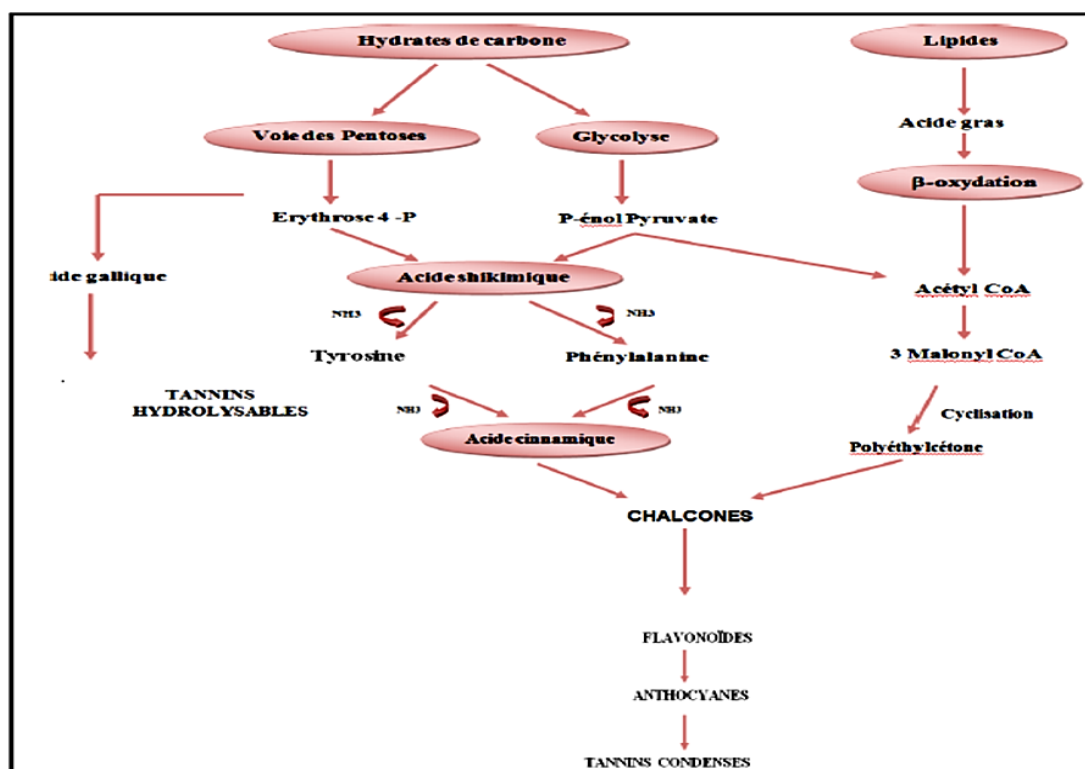


Figure 02 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Akroum, 2011).

- ❖ **Localisation dans la plante**

Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal, ils sont majoritairement présents dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles et les écorces de bois de tous les végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

- ❖ **Classification des composés phénoliques**

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs classes dont la plupart ont des représentants chez de nombreux végétaux. Les premiers critères de distinction entre ces

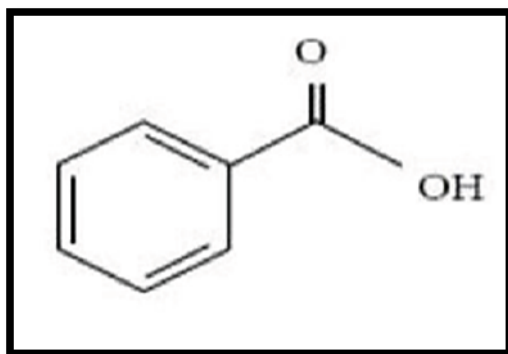
classes concernent le nombre d'atomes de carbone constitutifs et la structure de base du squelette carbone (Tableau 01) (Macheix *et al.*, 2006).

### 3.1.1. Acides phénoliques :

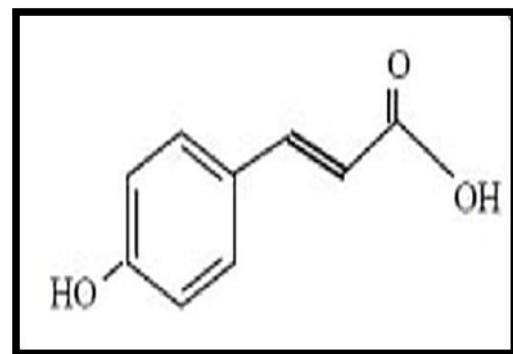
Les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Figure03) (Wichtl et Anton, 2009).

• **Acides hydroxybenzoïques** (acides phénols en C6-C1) : sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables (Manach *et al.*, 2004).

• **Acides hydroxycinnamiques** (acides phénols en C6-C3) : sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide p-coumarique, acide caféique, acide férulique et acide sinapique (El Gharras, 2009).



Acide benzoïque



Acide cinnamique

Figure 03: Structure de base des acides benzoïque cinnamique (Bruneton, 2009)

### 3.1.2. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres (Tsimogiannis et Oreopoulou, 2006). Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes peuvent se trouver sous forme d'hétérosides et dans toutes les parties des végétaux supérieurs (Ghestem *et al.*, 2001; Bruneton, 1999).

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C3-C6 et les composés de chaque sous classe des flavonoïdes se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants

sur les deux cycles aromatiques (A) et (B) et en position 3 sur l'hétérocycle oxygéné central (C) de la structure commune de type 2-phénylbenzopyrane (Figure 04) (El Gharras, 2009 ; Dacosta, 2003).

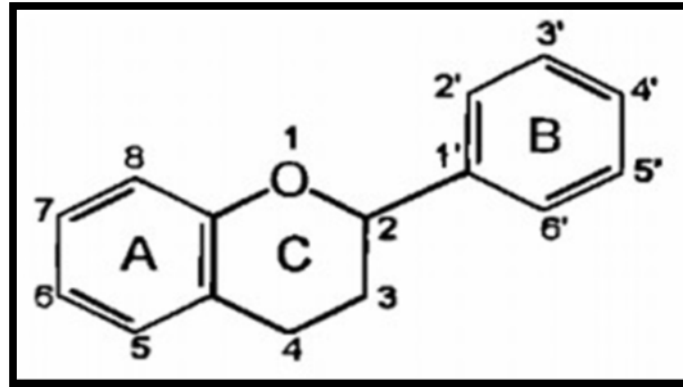


Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes (Collin et Crouzet, 2011)

### 3.1.3. Coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques non volatils, sont très répandues chez les végétaux, notamment dans les racines et les écorces; d'odeurs agréables, certaines servent en parfumerie; d'autre sont très toxiques telles que les aflatoxines des champignons inférieurs (Garabeth *et al.*, 2007).

Les coumarines ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides orthohydrocinnamiques (Collin et Crouzet, 2011). Différents dérivés coumariniques ont été isolés, habituellement, les substituants sont dans les positions C5, C6, C7 et C8. (Figure 05) (Cazes, 2001).

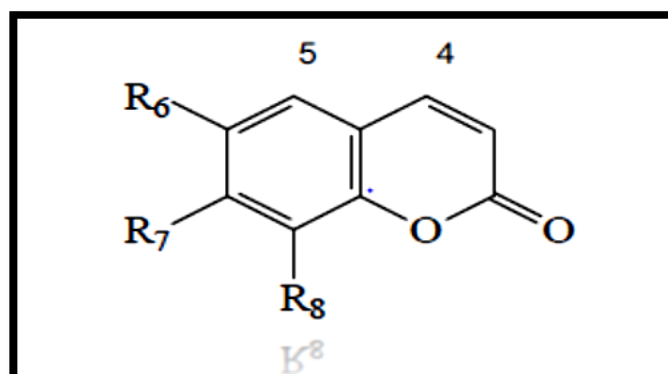


Figure 05 : structure de base des coumarines (González-Gallego *et al.*, 2007)



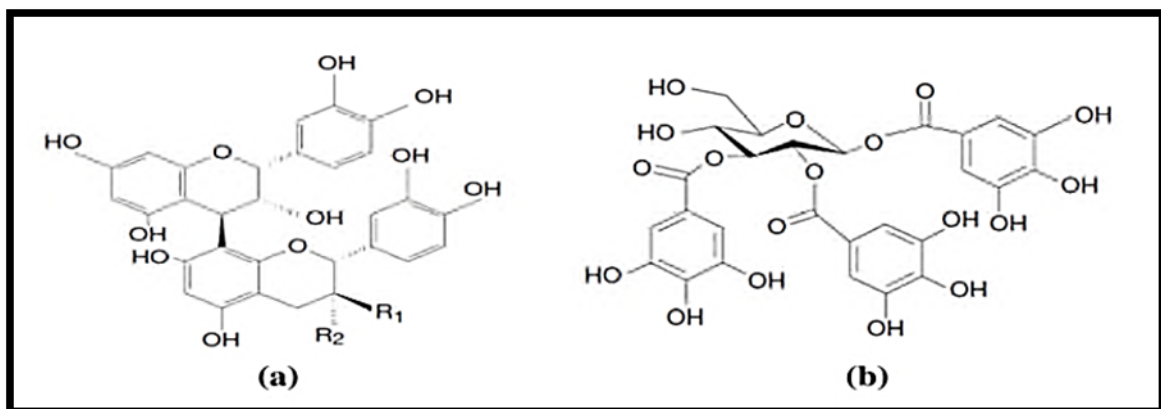
### 3.1.4. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, ayant en commun la propriété de tanner la peau. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant (Catier et Roux, 2007).

Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (Khanbabae et Ree., 2001).

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques (Bruneton, 2009).

- **Tanins hydrolysables** : ce sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acides-phénol.
- **Tanins condensés** : ce sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Figure 06).



**Figure 06:** Structures chimiques (a) d'un tanin condensé et (b) d'un tanin hydrolysables (Favier, 2003).

### 3.1.5. Quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui résultent de l'oxydation de dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diéniq (para quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinones).


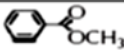


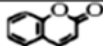

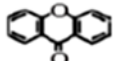
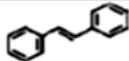
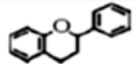
Ces substances sont souvent très réactives ; elles peuvent colorer la peau par la suite de combinaisons avec les groupes amines (NH<sub>2</sub>) libres des protéines. (Guilhou *et al.*, 1997).

### 3.1.6. Saponines

Les saponines sont des glycosides contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec l'eau (Hans, 2007). Elles sont des constituants de nombreuses plantes médicinales (Eberhard *et al.*, 2005).

Les saponines possèdent une grande variété d'activités biologiques telles que : antipyrétique, antalgique, anti-inflammatoire et anticoagulante. Ils sont utilisés dans des domaines variés tels que l'industrie, la pharmacie et la cosmétologie (Lautrette, 2004).

**Tableau 01:** Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénols	Acide gallique	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	acétophénones	Gallacetophénone	
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphénylacétique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinamiques	Acide p-coumarique	
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarines	Esculitine	
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	Juglone	
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiférine	
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resveratrol	
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes	Naringénine	

### 3.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, ils représentent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales (Omulokoli *et al.*, 2000).

La synthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentrent dans la vacuole. Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance (jeunes feuilles, jeunes racines) (Benslama, 2016).

Les drogues à alcaloïdes ont une importance considérable en thérapeutique, les plus connus sont : morphine, colchicine, l'atropine, le curare et la cocaïne (Bouhdjera, 2005). Ils sont utilisés comme anticancéreux, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (Iserin *et al.*, 2007).

### 3.3. Huiles essentielles :

#### ❖ Définition

Les huiles essentielles (HE) sont définies comme étant des liquides concentrés, très complexes et hydrophobes. Ce sont des extraits volatils et odorants qu'on obtient par extraction mécanique, distillation à la vapeur d'eau ou distillation à sec de plantes aromatiques (Möller, 2008), elles peuvent être stockées dans tous les organes des plantes aromatiques (les fleurs, les feuilles, fruits, tiges, racines, les graines, le bois et l'écorces) (Teixeira *et al.*, 2013). Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire (Kaloustian, 2008).

#### ❖ Composition chimique

Du point de vue chimique, les huiles essentielles sont constituées de mélanges extrêmement complexes. Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes (composés terpéniques) et les phénylpropanoïdes (composés aromatique) (Buchanan *et al.*, 2000).

#### 3.3.1. Composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandue dans le règne végétal. (Lamarti *et al.*, 1994). La caractéristique chimique commune aux terpènes réside dans leurs structures: ce sont des multiples d'une unité de cinq atomes de carbone à la formule générale  $(C_5H_8)_n$  ayant pour base un diène conjugué dont le nom commun est isoprène (Johnson, 2003) (Figure 07).

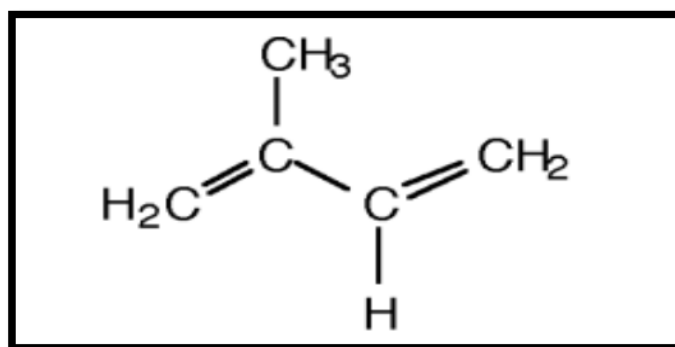


Figure 07 : Structure chimique de l'isoprène (Lamarti *et al.*, 1994).

Selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporées dans leurs structures, les terpènes sont subdivisés en plusieurs classes, (Vollhardt, 2009), nous avons rassemblé dans le tableau 02.

Tableau 02: Classification des terpènes (Robstein et Soerensen, 2011).

Classe	Nombre d'atomes de (C)	Nombre d'unités isoprène
Hémiterpènes	5	1
monoterpènes	10	2
sesquiterpènes	15	3
diterpènes	20	4
triterpènes	30	6
tétraterpènes	40	8
polyterpènes	>500	>100

### 3.3.2. Phénylpropanoïdes

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques biosynthétisés à partir de l'acide shikimique qui donnent des dérivés du phénylpropane (C6-C3) (Milpied, 2009). Ils sont moins fréquents que les terpénoïdes. Ce sont très souvent des allyles- et des propénylphénols, parfois des aldéhydes. Cette classe comprend des composés odorants comme l'avanillone, l'anéthol, l'eugénol,.. etc. (Bruenton, 1999; Bekheche et Abdelouahid, 2012; Catier et Roux, 2007).



***Chapitre II :***  
***Activités biologiques***

## **1. Activité antioxydant**

L'activité antioxydant d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (**Rice-Evans *et al.*, 1995 ;Burda et Oleszek, 2001**). Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne (**Yepez *et al.*, 2002**). Ils peuvent également causer des dommages cellulaires (**Hussain *et al.*,2002**). Notamment l'induction de ruptures et de mutations de l'ADN, la modification de structures protéiques, la peroxydation des lipides, l'inactivation de diverses enzymes et l'oxydation des sucres (**Defraigne et Pincemail, 2008**).

### **1.1. Stress oxydatif :**

#### **1.1.1. Définition**

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération de radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (**Boyd *et al.*, 2003**). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (**Morel et Barouki , 1999**). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (**Haioun et Hamoudi, 2015**).

Dans l'organisme, la production des radicaux libres est contrôlée par les systèmes de défenses. En conditions normales, on assiste à un équilibre de la balance antioxydants/prooxydants. (**Mohammedi , 2006**). Une fois cet équilibre est affecté par une augmentation de la production d'oxydants ou par une altération dans la défense antioxydant, on assiste à ce qu'on appelle « stress oxydatif » (Figure 8) (**Boutab ,2007 ; Lahoual ,2004**).

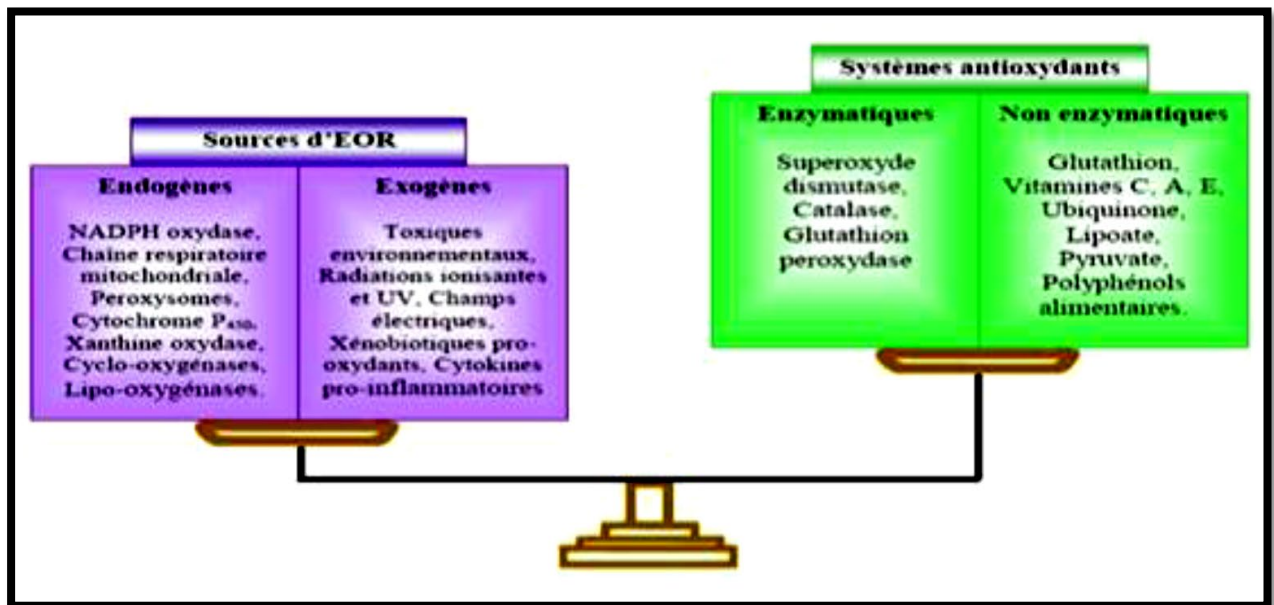


Figure 8: Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant (Shimizu,2004).

### 1.1.2. Conséquence de stress oxydatif

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (Favier, 2003).

Les réactifs oxygènes species (ROS) peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes (Ré *et al.*, 2005), il faut distinguer des maladies dont le stress oxydant est la cause principale : La première catégorie inclut les rhumatismes, l'arthrite, l'arthrose, la cataracte, le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA), l'œdème pulmonaire... etc (Favier, 2003). La deuxième catégorie inclut le diabète, la maladie d'Alzheimer, les cancers et les maladies cardiovasculaires (Georgetti *et al.*, 2003 ; Atawodi, 2005). Le problème principal est que l'organisme a des difficultés à réguler les phénomènes inflammatoires initiés par exemple par la défense contre une attaque virale ou bactérienne. (Favier, 2003).

## 1.2 Radicaux libres :

### 1.2.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié « célibataire ». Extrêmement instable, donc très réactifs et par conséquent, leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de  $10^{-4}$  secondes (Vansant, 2004), ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairier son électron (André, 1998 ; Beckman et Ames, 1998).

L'oxygène ( $O_2$ ) est une molécule bi radicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde ( $-O_2$ ), puis en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS) (Sies, 1993 ; De Leiris, 2003).

### 1.2.2. Nature des radicaux libres :

#### 1.2.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

On parle également de "radicaux oxygénés libres", L'oxygène possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme (Pastre, 2005).

a- Ion superoxyde :  $-O_2$ .

b- Radical libre hydroxyle : (OH).

c- Oxygène singulet:  $^1O_2$ .

#### 1.2.2.2. Espèces libres non oxygénées (ERN)

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène.

Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par exemple :

- ✓ Les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.



- ✓ Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives (**Pastre, 2005**).

### **1.3. Antioxydants :**

#### **1.3.1. Définition**

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation, détruisent les espèces réactives de l'oxygène et ainsi régulent l'équilibre redox cellulaire (**Al-Mamary et al., 2002 ; Boyd et al., 2003 ; Karou et al., 2005**). Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Vansant, 2004**).

#### **1.3.2. Types d'antioxydants**

Il existe deux grandes familles d'antioxydants, ceux d'origine naturelle et ceux de synthèse

##### **1.3.2.1. Antioxydants de synthèse**

Les antioxydants de synthèse habituellement utilisés sont les composés phénoliques comme le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisol (BHA), le tertbutylhydroquinone (TBHQ) et les esters de l'acide gallique,... etc. Les antioxydants phénoliques sont toujours substitués par les alkyls qui ont prouvé une plus grande solubilité dans les graisses et les huiles. (**Ribeiro et al., 2001 ; Marongiu et al., 2004**).

Le besoin de réduire l'utilisation des antioxydants synthétiques impose d'orienter le marché vers des antioxydants d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce domaine (**Herodez et al., 2003**).

##### **1.3.2.2. Antioxydants naturels**

Les antioxydants d'origines naturelles sont présents dans toutes les plantes supérieures et dans toutes les parties de la plante et sont en générales : les composés phénoliques, le bêta-carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, la vitamine E,...etc. Ils agissent par la désactivation des radicaux par création d'addition covalente, la réduction des métaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition et le captage de l'oxygène singulet (**Herodez et al., 2003**).

### **1.3.3. Utilisation des antioxydants**

Selon **Bouhadjra (2011)** les antioxydants peuvent être utilisés dans :

- ✓ **l'industrie chimique** : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- ✓ **l'industrie agro-alimentaire** : pour éviter le rancissement des corps gras.
- ✓ **l'industrie teinturerie** : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture.

## **2. Activité anticoagulante :**

### **2.1. Coagulation du sang**

Elle correspond à une cascade de réactions enzymatiques qui permettront de solidifier le clou plaquettaire par un réseau de fibrine, qui retient les globules rouges, pour obtenir le thrombus rouge (Vogler, 2009).

Ces réactions enzymatiques font intervenir les facteurs de la coagulation, des glycoprotéines synthétisées par le foie. Certains de ces facteurs ont besoin de l'intervention de la vitamine K pour leurs synthèses. Les réactions enzymatiques sont également limitées et contrôlées par des inhibiteurs physiologiques. Cette chaîne de réactions enzymatiques conduit à la formation de la thrombine, enzyme qui est responsable de la transformation du fibrinogène (protéine soluble) en fibrine (protéine insoluble) (Jobin ,1995).

### **2.2. Les facteurs de la coagulation**

Les facteurs de coagulation sont des pro-enzymes synthétisés par l'hépatocyte. Ceci explique les désordres hémorragiques chez le patient cirrhotique ou les personnes atteintes d'une insuffisance hépato cellulaire (tableau 03).

Il existe toujours au moins 2 formes pour ces facteurs: une forme non active (exemple: facteur II prothrombine) et une forme active (exemple: facteur IIa thrombine) (Samamaa *et al.*,2011). Une fois activé au cours du processus de coagulation, un facteur de la coagulation porte son nom suivi d'un suffixe « a » qui signifie que le facteur est activé (Bezeaud et Guillin, 2001).

Tableau 03: Facteurs de la coagulation plasmatique (Boisseau, 1996).

N° de facteurs	Nom de facteurs	Rôle	Lieu de synthèse
I	Fibrinogène	Substrat	Foie
II	Prothrombine	Zymogène	Foie
III	Facteur tissulaire	Cofacteur	Sous-Endothélium Cellules sanguines
V	Proéaccélérine	Cofacteur	Foie
VII	Proconvertine	Zymogène	Foie
VIII	Facteur antihémophilique A	Cofacteur	Foie
IX	Facteur antihémophilique B	Zymogène	Foie
X	Facteur STUART	Zymogène	Foie
XI	Facteur de Rosenthal	Zymogène	Foie
XII	Facteur de Hageman	Zymogène	Foie

### 2.3. Voies de la coagulation :

#### 2.3.1. Voie endogène

Tous les facteurs intervenant dans cette voie de coagulation sont des éléments appartenant au sang, à savoir des précurseurs plasmatiques ou plaquettaires. C'est le contact de ses éléments avec la paroi lésée qui est à l'origine de la voie endogène de la coagulation (Schalm *et al* .,1995).

Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII (Hageman) lors de ce contact aux structures électro-négatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes) (Renné *et al* .,2006), une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kalikriéne qui à son tour peut activer le F XII. Le F XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX (Renné *et al* .,2006). Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes (F3P) par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son co-facteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X (le facteur Stuart). Ce dernier forme avec son cofacteur, le facteur V (pro-accélérine), les phospholipides plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium le complexe

prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine (facteur II) en thrombine (Gentry, 2004 ;Caen *et al.*,1975).

2.3.2. Voie exogène

C'est la voie la plus simple et la plus rapide que la voie endogène, elle fait intervenir un nombre limité de facteurs (Caen *et al.*,1975). Dans cette voie le stimulus initial de la coagulation est le facteur tissulaire. C'est une glycoprotéine membranaire synthétisée par les fibroblastes présents dans la tunique externe (Adventice) des vaisseaux (Sébahoun, 1998 ; Bezeaud et Guillin, 2001 ; Codine *et al.*,2005).

Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui permet l'interaction avec le facteur VII (pro-convertine) pour former un complexe enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII) .Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquent de prothrombine en thrombine (Gentry, 2004 ;Colvin,2005). La thrombine formée par les deux voies catalyse la conversion de fibrinogène en monomères de fibrine qui s'associent les unes aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (Figure 09)(Gentry,2004 ;Revel et Doghmi,2004).

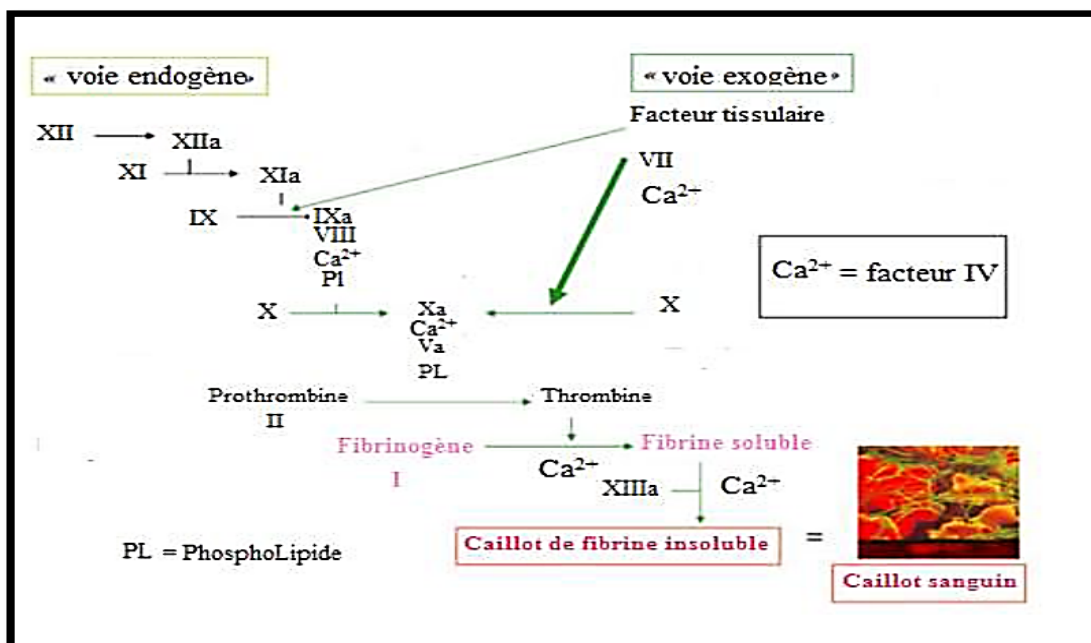


Figure 09 : Cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène (Gentry,2004 ; Vogler, 2009).

## 2.4. Anticoagulants :

Les anticoagulants sont des médicaments indiqués dans le traitement et la prévention des pathologies thromboemboliques (**Taboul et al.,2015**). Ils représentent le traitement principal de la maladie veineuse thromboembolique. De nombreux anticoagulants agissant à différents niveaux de la cascade de la coagulation sont utilisés et ils sont regroupés en trois classes ; deux classes des anticoagulants classiques (les héparines et les anti vitamines K) et la classe des nouveaux anticoagulants (**Helft et Leger,2009 ;Batty et Smith ,2010**).

### 2.4.1. Héparines :

Les héparines sont constituées d'une structure penta saccharidique associée à une chaîne polysaccharidique dont la longueur varie en fonction des héparines (**Bauersachs et al.,2010**).

Il existe deux types des héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée; l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP) (**Helft et Leger, 2009 ; Batty et Smith ,2010**).

#### ➤ Héparine non fractionnée (HNF)

Est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées de taille et de structures différentes extraites de la muqueuse intestinale de porc. Le poids moléculaire varie de 5000 à 35000 daltons. Le complexe HNF-antithrombin III inactive le plus notamment les facteurs Xa et la thrombine (facteur IIa), mais à un moindre degré les facteurs IXa, XIa et XIIa (**Shah et al.,1999**).

#### ➤ Héparines de bas poids moléculaire (HBMP)

Sont issues de la dépolymérisation des chaînes polysaccharidiques de l'HNF par des procédés chimiques ou enzymatiques, leurs poids moléculaire varient de 3000 à 5000 daltons. Le complexe HBPM-antithrombinIII inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (**Batty et Smith, 2010**).

### 2.4.2. Anti vitamines K

Les AVK ont une structure chimique proche de la vitamine K, ce qui leur confère un mode d'action commun , les AVK et vitamine K entrent en compétition au niveau des sites d'activation enzymatique de l'époxyde réductase (**Mathews et al.,2002**); les anti-vitamines K exercent leurs effets anticoagulants en inhibant le recyclage de vitamine K, ce qui conduit à la perte de

l'activité enzymatique des facteurs vitamines K dépendants et par conséquent la ralentie de la vitesse de la coagulation (**Batty et Smith,2010 ; Hirsh et al.,2001**).

Les AVK (warfarin, phenindione, acenocoumarol et phenprocoumon) ont été les premiers médicaments anticoagulants commercialisés sous forme orale et leur efficacité est dépendent de la quantité de la vitamine K ingéré quotidiennement (**Laurent et al.,2010**),

#### 2.4.2. Des nouveaux anticoagulants

Sont utilisés à côté des anticoagulants classiques. Ces anticoagulants sont subdivisés selon leur mode d'action en deux catégories, les inhibiteurs indirects qui agissent en potentialisant l'activité de l'antithrombine III, et parmi les quelles, la fondaparinux et l'idraparinux qui sont des inhibiteurs synthétiques indirects et sélectifs du facteur Xa et ils sont constitués de 5 unités saccharides capables de modifier la conformation en augmentant l'activité inhibitrice naturelle de l'antithrombine III sur le facteur Xa. Les inhibiteurs directs agissent directement sur le facteur Xa ou la thrombine, parmi lesquelles, l'hirudin, L'argatroban,...etc (**Samama et al.,2002 ; Girardel et Samama,2006**).

### 3. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne correspondant à l'activité d'une molécule ou composé présente au sein d'un végétal qui a très faible concentration, détruire les bactéries ou empêcher leur croissance. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien. Face à un antibactérien donné, la sensibilité d'une bactérie peut être très différente selon la souche d'appartenance (**Ali-Shtayeh et al.,1998**).

#### 3.1. Description des bactéries étudiées

##### ➤ *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un bacille à gram négatif (**Patrick et al.,1988**), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$  (**Steven et al., 2004**).

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales (**Bounihi, 2016**).

➤ *Klebsiella pneumoniae*

Les bactéries appartenant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, anaérobies facultatifs et appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae (El Fertas-Aissani *et al.*, 2012 ; Srinivasan *et al.*, 2012).

*Klebsiella pneumoniae* est une espèce pathogène opportuniste (Brisse, 2004). Elle est fréquemment rencontrée dans la nature : eaux de surface, du sol, du bois et des végétaux (El Fertas-Aissani *et al.*, 2012). Elle est présente dans le tube digestif de l'homme et des animaux, et elle est commensale des voies respiratoires (Joly et Reynaud, 2002).

Cette bactérie est l'une des principales espèces bactériennes impliquées dans les infections urinaires (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2010 ; Struve *et al.*, 2012). Elles peuvent également causer des bactériémies, d'abcès cérébral et des maladies chroniques comme la méningite (Botelho, 2007).

➤ *Enterococcus*

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulées qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes et dont le génome contient un faible pourcentage en G+C. Elles sont présentes dans différentes niches écologiques, plus rarement au niveau du vagin ou de la cavité buccale (Schloissnig *et al.* 2013; Beargie *et al.*, 1975).

Les entérocoques colonisent les intestins de plus de 90% des adultes sains, *E. faecalis* est plus commun qu'*E. faecium* alors que les autres espèces sont trouvées très rarement (Huycke, *et al.*, 1998).

➤ *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin) (Steven *et al.*, 2004). *S. aureus* est un pathogène important, responsable des infections des plaies, de l'ostéomyélite de l'enfant (infection de l'os), de l'arthrite (infection d'une articulation), septicémie et pneumopathies (multiples petits abcès des deux poumons) (Bounihi, 2016).

### 3.2. Antibiotiques

Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes; ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes (bactéries), dans lesquelles elles pénètrent en perturbant le métabolisme, ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle de ce dernier, mais qui sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales (**Bounihi, 2016**).

### 3.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques est un phénomène universel, qui semble plus aigu dans certains pays en voie de développement du fait de la monotonie des antibiotiques utilisables (**Bryskier, 1999**).

#### ➤ Résistance naturelle ou résistance intrinsèque

La résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce (**Faure, 2009**).

Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle (**Guinoisea, 2010**).

#### ➤ Résistance acquise

Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation ou d'une acquisition de matériel génétique étranger. La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique (**Faure, 2009**).

La résistance acquise d'une espèce bactérienne à un antibiotique se développe au fur et à mesure que l'antibiotique est administré. Elle se traduit par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice (**Guinoisea, 2010**).

### 3.4. Activité antibactérienne des polyphénols

Les plantes aromatiques et médicinales sont reconnues par la production de certaines molécules bioactives qui régissent avec d'autres organismes dans l'environnement, en inhibant la croissance bactérienne (**Boulekbache et al., 2013**).



Des inhibiteurs naturels, extraits de nombreuses plantes, pour des microorganismes pathogènes ont été explorés, parmi lesquels on trouve les polyphénols qui ont reçu beaucoup d'attention ces dernières années (Al-Zoreky, 2009).

### 3.5. Modes d'action des composés phénoliques sur les bactéries

Les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes. La force et le spectre d'activité antimicrobienne varient selon le type d'extrait et le type de bactéries (Djenane *et al.*, 2012).

#### ➤ Action sur la membrane cellulaire

Les composés phénoliques peuvent agir à deux niveaux différents: la membrane cellulaire et la paroi de la cellule des micro-organismes. Ils peuvent réagir avec les protéines membranaires de bactéries par une liaison d'hydrogène à travers leurs groupements hydroxyles et comme résultats ils entraînent une modification de la perméabilité membranaire puis la destruction cellulaire. Ils peuvent pénétrer aussi dans les cellules bactériennes et coaguler le contenu cellulaire (Boulekbache *et al.*, 2013). Cependant, les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques (Djenane *et al.*, 2012).

#### ➤ Action sur les enzymes et privation de substrat

Le mécanisme responsable à la toxicité des polyphénols sur les microorganismes inclue l'inhibition des enzymes par les composés oxydés, probablement à travers l'interaction des polyphénols, en particulier les quinones et les tannins, avec les protéines enzymatiques en se fixant sur leurs sites actifs, induisant l'inhibition de son l'activité (Cowan, 1999). En outre, les flavonoïdes ont montré une grande activité antibactérienne, la quercétine et d'autres composés réagissent essentiellement par l'inhibition de l'enzyme ADN-gyrase (Pereira, 2007).

D'autres parts, les composés phénoliques peuvent aussi se lier aux molécules substrat rendant ces dernières moins accessibles aux enzymes (Al-Zoreky, 2009).

#### ➤ Rivation des métaux

L'inhibition de l'activité bactérienne par la formation du complexe ion métallique-composé phénolique (Ksouri *et al.*, 2009).

### **3.6. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne**

#### ➤ **Méthode de diffusion en milieu solide**

Cette méthode consiste à la diffusion d'un antibiotique dans des puits de 6 mm de diamètre et 3 mm de profondeur avec un puit témoin, creusés dans des boîtes de pétri contenant le milieu Muller Hinton, après avoir été ensemencées par une suspension bactérienne. Ensuite une incubation à 37°C est faite pendant 18 à 24h. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (Menasria, 2014).

#### ➤ **Méthode de diffusion sur disque**

Cette méthode est la plus connue et la plus utilisée. Elle est basée sur l'utilisation d'un disque comme réservoir contenant la solution ou la substance à examiner, elle consiste en l'ensemencement sur un milieu gélosé, dans une boîte de Pétri, d'une suspension bactérienne. La substance à tester est ensuite imprégnée sur des disques, eux-mêmes déposés sur la boîte de pétri avec un disque imprégné d'un solvant qui servira comme témoin négatif. Durant l'incubation, la substance est alors censée diffuser dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse) ce qui crée un gradient de concentration dépendant de la substance. L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure de la zone de clarification en mm tout autour des disques (Fontanay, 2015).

#### ➤ **Méthode de dilution en milieu liquide**

La méthode par dilution a pour but d'établir la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (Freidman et al., 2002). En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble. On distribue dans un premier temps, pour la macrodilution, dans une série des tubes contenant un volume minimum de 2ml ou pour la microdilution dans les cupules d'une plaque, sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotique puis on ajoute dans chacun des tubes ou cupules sous un même volume, une culture des bactéries en phase exponentielle de croissance. La CMI de l'antibiotique sur la souche étudiée est définie comme la plus faible concentration inhibant, après 18 à 24 heures de contact à 37°C, toute croissance visible à l'oeil nu (Ndoye, 1993).



***Chapitre III :***  
***Etude de la Sauge (Salvia officinalis L.)***

## 1. Généralités

La sauge (*Salvia officinalis* L.), Son nom indique clairement l'importance de son rôle en phytothérapie .En latin « salvar », signifie sauver ou éviter et « officinalis » signifie médicinale (Bors *et al.*, 2003 ; Kennedy et Scholey, 2005 ; Tepe *et al.*, 2006), est due aux propriétés curatives de la plante, ce qui était autrefois célébré comme herbe médicinale (Grieve, 1984).

La sauge est typiquement une plante annuelle et biannuelle, d'origine méditerranéenne (Djerroumi et Nacef 2004), avec plus de 900 espèces ; est le genre le plus répandu dans la famille des lamiacées (Hohmann *et al.*, 2003 ; Kamatou *et al.*, 2005 ; Rabbani *et al.*, 2005). Elle est très populaire et largement cultivée dans plusieurs pays pour son importance économique et sa grande teneur en composés bioactifs, essentiellement pour obtenir des feuilles sèches pour les utiliser comme matière première en pharmacie et en industrie alimentaire (Santos-Gomes *et al.*, 2002).

A l'époque romaine, la sauge était véritablement considérée comme une panacée (Wichtl et Anton, 1999). Les grecs et les arabes ont utilisé la sauge comme tonique, et en compresse contre les morsures de serpent (Djerroumi et Nacef, 2004). C'est une plante sacrée des anciens, Utilisée en tisane depuis le Moyen-âge, elle facilite la digestion. On lui attribue aussi des propriétés antiseptiques, énergétiques et elle permettrait même de stimuler la mémoire (Pujuguet, 2008).

### ➤ Noms vernaculaires :

**Français** : Grand sauge, thé d'Europe, herbe sacrée (Teusher *et al.*, 2005).

**Anglais** : Sage, great, garden sage (Teusher *et al.*, 2005).

**Arabe**: Souak en nebi, salmia et maramia (Baba Aissa, 2000).

## 2. Classification taxonomique

La classification taxonomique de *Salvia officinalis*. est présentée dans le tableau suivant.

Tableau 04 : classification taxonomique de *Salvia officinalis*. (Quezel et Santa, 1963).

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Magnoliophytes
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiacées
<b>Genre</b>	<i>Salvia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Salvia officinalis</i> L.

### 3. Description Botanique

La sauge officinal est un sous arbrisseau atteignant 0.50 à 1m de hauteur, vivace très ramifié et très aromatique, devenant ligneux à la partie basale, dont les tiges forment des rameaux quadrangulaires dressés et velus. Les feuilles sont opposées, aiguës, rugueuses, finement crénelées, pubescentes-grisâtres, la base du limbe est arrondie, simplement ou doublement auriculée. La forme et la grandeur des feuilles varient selon leur position sur la tige. En général, elles ont de 3 à 10 cm de long et jusqu'à 3 à 4 cm de large (Figure10).

Les fleurs sont bleu-violacé clair en épis terminaux lâches, disposées par 3 à 6 en verticilles espacés. Calice campanulé à 5 dents longues et corolle bilabée supérieure en casque et lèvre inférieure trilobée (Figure11). Les fruits sont des tétrakènes (Figure12) (Hans, 2007).

**Floraison:** Mars-Mai (Beloued, 2005).

**Odeur:** fortement balsamique et aromatique (Wichtl et Anton, 2003).

**Saveur:** aromatique, chaude, amère et astringente (Wichtl et Anton, 2003).



**Figure 10:** Feuilles de la sauge officinale (Iserin, 2001).



**Figure 11:** Fleures de la sauge officinale (Iserin, 2001).



**Figure 12:** Fruits de la sauge officinale (Iserin, 2001).

#### 4. Origine et répartition géographique

La sauge officinale, d'origine méditerranéenne. Elle pousse sur les terres chaudes des collines rocailleuses et calcaires, d'une façon spontanée sur des terres arides aux sols bien drainés des régions méridionales tempérées et ensoleillées, et elle résiste à la sécheresse (**Haloran, 2001**). La sauge est rencontrée dans les clairières, les forêts, les broussailles, les pâturages, les steppes, les plaines, les hauts plateaux et les montagnes jusqu'à 2500 m d'altitude.

La sauge se caractérise par une aire de répartition très répandue elle se trouve essentiellement dans Yougoslavie, Bulgarie, France, Italie, USA, Inde, Espagne, United Kingdom, Turquie, Maroc, Grèce, dans les pays du pourtour méditerranéen tel que le central, l'Amérique du Sud, et l'Asie du Sud Est (**Topcu, 2006**) et (**Oana-Maria et al., 2010**). Dans le nord de l'Afrique, cette plante est assez commune en Algérie (cultivée) (**Quezel et Santa, 1963**).

#### 5. Ecophysiologie

La sauge est cultivable jusqu'à 1800 m d'altitude ; elle supporte des climats et des sols très variés, au pH allant de 5 à 9. Le plant adulte résiste à la température de -10°C, mais il est préférable de pailler le jeune plant (**Gilly, 2005**).

#### 6. Les Propriétés de la sauge

La sauge officinale est utilisée depuis l'Antiquité, elle est restée célèbre depuis des siècles. Vu ses propriétés importantes (**Wichtel et Anton, 2003**). Elle contient un fort taux en oestrogènes, des diterpènes et triterpènes, des flavonoïdes, des tanins, des principes amers ainsi que une huile essentielle à thuyone (**Iserin, 2001**).

##### III.6.1. Propriétés médicinales

La sauge est une des plantes les plus utilisées, Les feuilles de cette plante sont communément très connues, non seulement comme herbe condimentaire, mais aussi elles possèdent de nombreuses propriétés très exploitées en médecine (**Hohmann et al., 2003 ; Ninomiya et al., 2004 ; Eidi et al., 2005**).

Les effets antioxydants de la sauge, ont été attribués à l'acide rosmarinique et l'acide carnosolique (**Lu et Foo, 2001 ; Bailly et al., 2005**). La sauge est très utilisée pour ses propriétés antioxydants, retardant ou inhibant le rancissement des corps gras (**Wichtl et Anton, 2003**).

Plusieurs extraits de cette herbe sont employés dans le traitement de plusieurs types des maladies, elle est appliquée en gargarisme contre inflammation de la cavité orale, est un remède

contre les maux de gorge, du tractus digestif et intestinal et dans les gastrites, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies (**Capek et Hribalová, 2004 ; Kamatou *et al.*, 2005**).

Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux (**Radulescu *et al.*, 2004**).

À ces actions de la sauge, s'ajoutent des vertus oestrogènes, cholérétiques et une activité antigonadotrophiques, utilisées également pour traiter les symptômes de la ménopause (**Bezanger-Beauquesne *et al.*, 1990 ; Cazzavaca *et al.*, 1999**).

La sauge est considérée comme un stimulant pour les gens anémiques, aussi pour les personnes stressées et déprimées, et conseillée pour les étudiants en période d'examen (**Djerroumi et Nacef 2004**).

Elle a une activité tranquillisante qui peut calmer les crises de la maladie d'Alzheimer; elle augmente la disponibilité synaptique de l'acétylcholine, par inhibition de l'acétylcholine estérase, de ce fait, la sauge aide à améliorer les fonctions cognitives, chez les patients souffrant de cette maladie (**Mohammadi *et al.*, 2003 ; Tildesley *et al.*, 2005**).

La sauge officinale a une action antimicrobienne, soigne les lésions bénignes de la peau (coupures, acné) et favorise aussi l'hygiène buccale en limitant le développement des bactéries responsables de la formation de la plaque dentaire (**Verbois, 2003**).

En Algérie, la sauge officinale est utilisée, en médecine folklorique, comme agent naturel antidiabétique, anti hypertensif, contre l'obésité et pour traiter l'eczéma (**Boudjelal *et al.*, 2013**).

## **6.2. Propriétés culinaires**

Les feuilles ont une odeur agréable qu'ont suscitée son utilisation culinaire, son usage stimule l'appétit et améliore dyspepsies et atonies gastro-intestinales (**Colette, 2004**).

Actuellement, la sauge était vénérée comme une herbe sacrée. Elle a un parfum très prononcé, elle sert principalement en cuisine.

Seules les feuilles sont utilisées en aromate, leur gout légèrement amers, puissants et camphrés, accommodent parfaitement les viandes blanches, les plats lourds et gras (**Goutier, 2009**).



Les fleurs sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour la confection de confitures, en vinaigre odorants et la bière est aromatisée à la sauge (**Bhar et al., 2011**).

### 6.3. Propriétés en phytocosmétologique

La cosmétologie emploie les plantes depuis ses origines. Elles apportent des activités biopharmacologiques en raison des différents composants qu'ils contiennent (**Wilson et Guylaine, 2008**). L'huile essentielle de sauge sert à la fabrication de parfums, de savons, de dentifrice, et de produits cosmétiques. Elle est aussi utilisée en aromathérapie (Bains et massages...etc) (**Gotz et Busser, 2007**).

## 7. Composés chimiques :

### 7.1. Composés phénoliques

Les feuilles de sauge sont connues pour leurs propriétés médicinales et ceci revient à leur richesse en polyphénols (**Lu et Yeap, 2001**). Cependant, beaucoup d'études sur la sauge ont révélé la présence d'une série impressionnante d'oligomères d'acide caféique biologiquement actifs, plus d'autres composés phénoliques (tableau 05) (**Ninomiya et al., 2004**).

**Tableau 05 :** Principales classes de composés phénoliques identifiées dans les feuilles de *Salvia officinalis* L.

Classe	Composé	Référence
<b>Acides phénoliques</b>	Acide gallique, Acide 3-0-caffeoylquinique, Acide 5-0-caffeoylquinique, Acide caféique, Acide rosmarinique, Acide salvianolique et dérivée, Melitrate A méthylsaugecoumarine, Acide saugerinique, Tanshinone II A, Acide lithospermique, Acide yunnanéiques, Acide Amelitrique, Acide royleanonique et Acide oléanolique.	( <b>Santos-Gomes et al., 2002 ; Ninomiya et al., 2004 ; Amin et Hamza, 2005 ; Bailly et al., 2005</b> ).
<b>Diterpènes phénoliques</b>	Acide carnosolique, Rosmadials, Carnosote de méthyl, Carnosol, Epirosmanol, Epiisorosmanolmethylether et	( <b>Lima et al., 2004; Kennedy et Scholey, 2005 ; Lima et</b>

	Epiisorosmanoethylether.	<i>al.</i> ,2005)
<b>Flavonoïdes</b>		
<b>Flavones</b>	5,7,40-Trihydroxyflavone (apigénine) -7-Méthyl ether (genkwanine) -7,40-Diméthyl ether(acacétine) 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone (luteoline)	(Santos-Gomes <i>et al.</i> , 2002 ; Amin et Hamza, 2005)
<b>Flavonols</b>	Quercétine	(Kenjeric <i>et al.</i> , 2008).
<b>Flavanones</b>	5,7,30-Trihydroxy-40-méthoxyflavanone (hespétine)	(Santos-Gomes <i>et al.</i> , 2002 ; Amin et Hamza, 2005)
<b>Flavone glycosides</b>	Apigénine-7-glucoside (cosmosiine) Luteoline-7-glucoside (cinaroside) -7-Glucuronide	(Masterova <i>et al</i> 1989 Wang <i>et al</i> 1998; Lu and Foo 2000). (Lu and Foo 2000, lima <i>et al</i> 2007).
<b>Tannins</b>	Catéchine et Salviatannins.	(Lu et Foo, 2002)

## 7.2. Huile essentielle

L'analyse des extraits de *Salvia officinalis* L. a montré que cette espèce contient environ 1.0 à 2.8 % d'huile essentielle (Tableau 06) (Radulescu *et al.*, 2004 ; Kennedy et Scholey, 2005). Les principales molécules contenues dans l'huile essentielle, qui donnent à la sauge son odeur typique, sont les thuyones, qui peuvent représenter jusqu'au 50% de la Composition chimique de l'huile essentielle, et le camphre (4,5-24,5%) (Beloued, 2005).

**Tableau 06:** Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*. (Miladinović et Miladinović, 2000).

Constituant	Quantité (%)	Constituant	Quantité (%)
$\alpha$ -thuyène	0,10	$\alpha$ -thuyone	24,88
$\alpha$ -pinène	3,5	$\beta$ -thuyone	8,08
camphène	3,14	camphre	16,03
2- $\beta$ -pinène	0,58	1-bornéole	4,31
$\beta$ -murène	0,59	1,4-terpeniole	0,81
$\alpha$ -terpinène	0,89	Acetate	2,68
1,8-cinéole	9,79	d'endobornyl	0,82
$\gamma$ -terpinène	0,15	Caryophyllène	3,9
veridiflorol	7,87	$\beta$ -selinène	3,22
		manool	

### 7.3. Polysaccharides et autres constituants

L'analyse de la partie aérienne de *Salvia officinalis* L., par le spectre FT-IR, a décelé des bandes caractérisant la composition de la plante en polysaccharides, en protéines et en lipides (Ebringerova *et al.*, 2003 ; Capek et Hribalvà, 2004). Les résultats qualitatifs et quantitatifs en ces composés, sont illustrés dans le tableau suivant.

**Tableau 07:** Fraction de polysaccharides et autres composés identifiés dans les feuilles de *Salvia officinalis* L. (Capek *et al.*, 2003).

Constituant identifié	Quantité (%)
Arabinose	30,4
Galactose	17,9
3-o-méthylgalactose	3,0
Glucose	15,5
Mannose	8,3
Xylose	7,6
Fructose	2,6
Rhamnose	6,7
Acides uronique	8,0
Autres	
Groupements methoxyls	1,7
Protéines	9,4
Matières inorganiques	9,8



*Partie 2:*  
*Etude expérimentale*



***Chapitre I:***  
***Matériel et méthodes***

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les feuilles de *Salvia officinalis*, achetées d'un arboriste durant le mois de novembre 2018 (Figure 13).



**Figure 13 :** Les feuilles de *salvia officinalis* L.

### 1.2. Matériel de laboratoire

Le matériel et l'appareillage utilisés dans notre étude sont récapitulés dans l'annexe 01.

### 1.3. Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et les réactifs utilisés pour le screening phytochimique et le dosage des polyphénols totaux ainsi que ceux utilisés pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante, anticoagulante et antibactérienne sont illustrés dans l'annexe 02.

## 2. Méthodes

### 2.1. Préparation du matériel végétal

#### ➤ Broyage et tamisage des feuilles

Le matériel végétal est séché à l'abri de la lumière à une température ambiante pendant un mois, Puis broyé à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre; Cette dernière est récupérée après tamisage et conservée dans des flacons en verre fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (Figure14).



**Figure 14 :** La poudre de *salvia officinalis* L.

## 2.2. Préparation des extraits

La méthode d'extraction que nous avons utilisée est la macération, Cette étape consiste à extraire le maximum des molécules chimiques contenant dans les feuilles de la plante en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

### ❖ Principe

La macération est la méthode d'extraction solide/liquide la plus simple. Elle consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour extraire les principes actifs avec ou sans agitation, à température ambiante (à l'avantage de préserver les substances thermosensibles) ou à température élevée pour une durée déterminée.

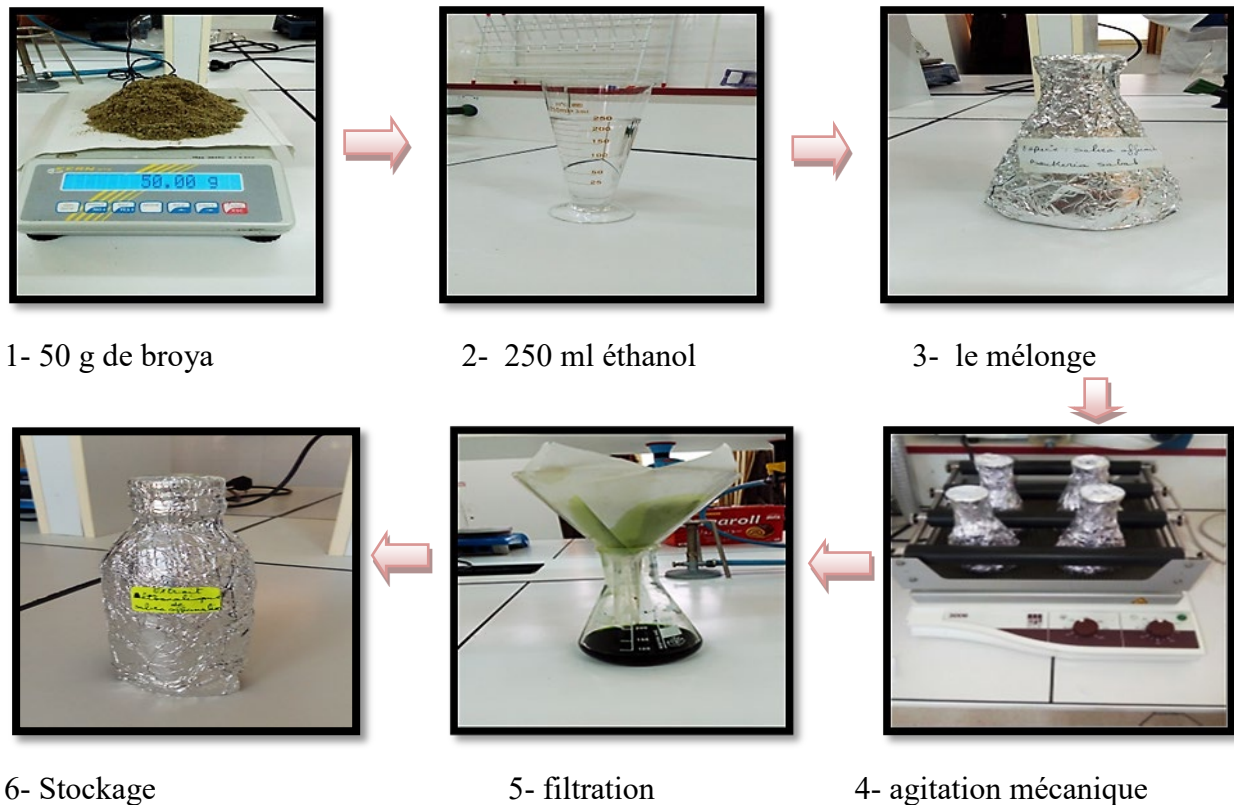
La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales, le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matière végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint (**Laneza et al., 2009**).

### 2.2.1. Protocole de la macération éthanolique

50g de broya (*S.officinalis* L.) a été macéré dans 250 ml d'éthanol (80%) sous agitation mécanique à température ambiante pendant 2 jusqu'à 3 jours de temps.

Après 3 jours ; les produits obtenues ont été filtrés à l'aide d'un papier filtre de type Whatman; les filtrats obtenus ont été conservés dans des flacons en verre fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (Figure 15) (**Talbi et al., 2015**).





**Figure 15 :** Les étapes de la macération éthanolique.

### 2.2.2. Protocole de la macération aqueuse

Les feuilles de *Salvia officinalis* L. ont été utilisées dans la préparation des extraits aqueux par macération selon la méthode décrite dans chaque test.

La conservation de l'extrait a été faite dans des tubes à vis stériles au réfrigérateur (4-6°C) pour éviter tout risque de dégradation des extraits due à l'action de l'air.

### 2.3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique consiste à détecter les différentes classes de composés chimiques existants dans l'espèce *Salvia officinalis*, par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque classe de composés.

Les tests de screening phytochimique de notre travail ont été réalisés au sein du laboratoire du Centre Universitaire Abd Elhafide Boussouf Mila.

➤ **Test des alcaloïdes**

Le test est réalisé par des réactions de précipitation avec le réactif de Wagner. 20 ml de l'extrait a été ajouté à 5 ml d'acide chlorhydrique HCl (10%), le tout est chauffé au bain marie, où un volume de solution d'hydroxyde d'ammonium (10%) a été ajouté jusqu'à obtention d'un milieu de pH = 9, une extraction avec de l'éther di éthylique est réalisée suivi d'une concentration avec un dispositif « évaporateur rotatif ». Le résidu est repris dans 5 ml de HCl (2%), est trait par quelques gouttes de réactif de Wagner. La formation d'un précipité brun révèle la présence des alcaloïdes (**Memelink *et al.*,2001**) (Figure16).



**Figure 16:** Test des alcaloïdes.

➤ **Test des coumarines**

20g de la poudre, a été mise à la macération dans 20 ml d'éthanol suivi d'une filtration sur Papier filtre, on ajoute ensuite au 5 ml du filtrat 5 ml de KOH (10%) et 5 ml de HCl (10%), la présence des coumarines est confirmée par l'apparition d'une précipitation rouge brune (**Koffi N *et al.*, 2009**).

➤ **Test des tanins**

Le test consiste à macéré 10 g de la poudre avec 80 ml d'alcool éthylique (50 %) pendant quelques minutes, Après filtration et agitation quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> permet de détecter la présence ou non de tanins. L'apparition d'une couleur verte prouve la présence des tanins (**Kalla, 2012**).

➤ **Test des polyphénols**

La caractérisation des polyphénols est basée sur une réaction au chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ). A 2 ml d'extrait une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% est ajoutée. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence des polyphénols (**Békro *et al.*, 2007**) (Figure 17).



**Figure 17:** Test des polyphénols.

➤ **Test des anthraquinones**

Pour la détection des anthraquinones, 10 ml d'extrait est ajouté à 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10%. Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par l'apparition d'un anneau rouge (**Oloyede, 2005**).

➤ **Test des anthocyanes**

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5 ml d'extrait dans un tube auxquels on ajoute 15 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à (10%) (Milieu acide). Après agitation, le mélange est additionné de 5 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  à (10%) (Milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu-violacée en milieu basique (**Bruneton, 1999**).

➤ **Test des glycosides**

Pour détecter ces molécules, un mélange constitué de 1ml de l'extrait brut avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling a été chauffé à  $70^\circ\text{C}$  dans un bain marie, l'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des glycosides (**Tresse et Evans, 1987**) (Figure 18).

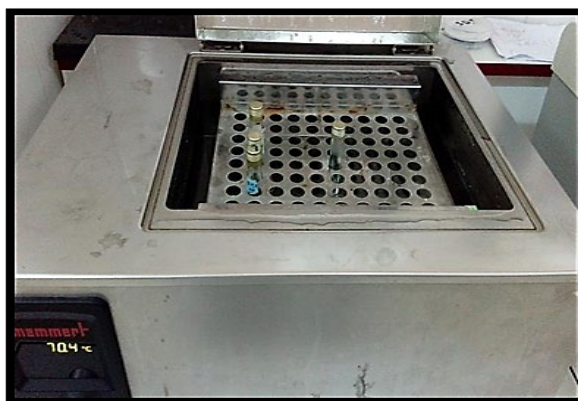


Figure 18: Test des glycosides.

➤ **Test des stérols et triterpènes**

Un extrait est tout d'abord réalisé à partir d'une macération pendant 24 heures de 1g de la Poudre dans 20 ml d'éther.

Evaporer à sec 10 ml du macéra, dissoudre le résidu dans 1 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1ml à 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré au fond du tube sans agiter.

La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides révèle la présence des stérols et triterpènes (**Diallo, 2000**).

➤ **Test des quinones libres**

Un gramme de matériel végétal sec finement broyé est placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, l'extrait est filtré et concentré au rota vapeur. La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH (1/10), lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (**Dahou et al., 2003**).

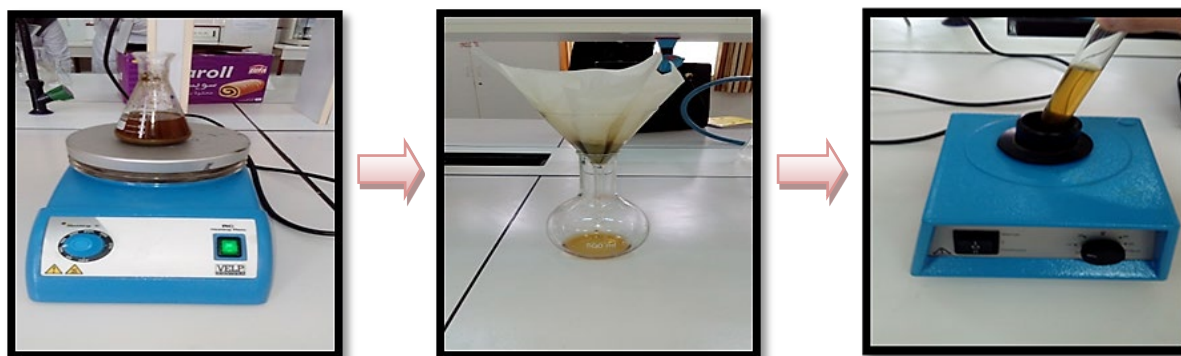
➤ **Test des Quinones**

On prend 0.5g de poudre de la plante broyée et on ajoute 1 ml de HCl (2%) puis on ajoute 5ml de Chloroforme et on laisse pendant plusieurs heures et une filtration sur Papier filtre.

On ajoute ensuite sur le filtrat 2,5ml d'ammoniaque dilué (1/2). Si on observe que la phase aqueuse ne se colore pas ceci indique l'absence des quinones (**Ribereau –Gayon J., Peynaud., E 1968**).

### ➤ Test des saponosides

2 g de la poudre de plante a été macère avec 80 ml d'eau distillée pendant quelques minutes, Le filtrat obtenu était agité pendant 2 min pour obtenir une mousse persistante stable, puis laissé au repos durant 15 min. Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse. Si elle est supérieure à 1cm dans le tube, on a donc présence des Saponosides dans la plante (**Kalla, 2012**) (Figure 19).



**Figure 19** : Test des saponosides.

### ➤ Test des flavonoïdes

1g de la poudre, a été mise à la macération dans 10 ml d'eau distillée. On prend 2ml de filtrat, puis quelques gouttes de HCl (2%) et de FeCl<sub>3</sub> (1%) sont ajoutés. En présence des Flavonoïdes, on remarque une couleur verdâtre (**Ramade.F-1993**).

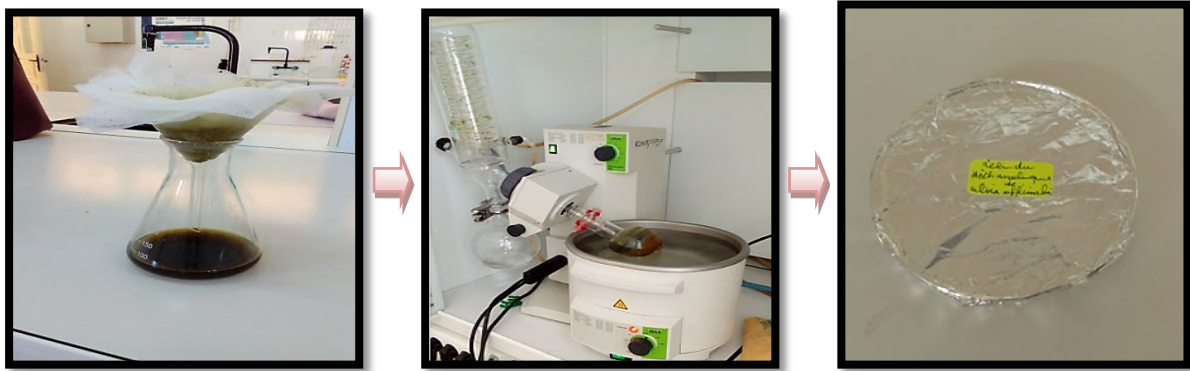
## 2.4.Extraction des polyphénols

### 2.4.1.Préparation de l'extrait méthanolique

Dans le présent travail, nous avons ciblé les composés phénoliques. Des extraits hydro alcooliques sont préparés par macération de la poudre végétale à température ambiante dans le méthanol/eau (70 : 30, V/V) pendant 72heures.

10 g de poudre végétal (SO) ont été repris avec une solution de méthanol/eau (70 : 30, V/V) dans un erlenmeyer de100 ml. Le mélange a été laissé macérer sous agitation mécanique à température ambiante pendant 3 jours.

Le macérât a été filtré à l'aide d'un papier filtre de type Whatman, le filtrat est concentré au rota vapeur à la température de 40 °C. On obtient donc l'extrait hydro-alcoolique brut; ce dernier est stocké dans des boites de Pétries en verre fermées hermétiquement à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation (**Talbi et al., 2015**) (Figure 20).



1-Filtration

2- Evaporation

3-Stockage

**Figure 20:** Les étapes de préparation de l'extrait méthanolique.

#### 2.4.2. Préparation de l'extrait aqueux

Une quantité de 10g de broya de (SO) est mise à macérer dans 100 ml d'eau distillé sous agitation mécanique pendant une nuit à une température ambiante. L'extrait aqueuse a été filtré à l'aide d'un papier filtre de type Whatman.

Le filtrat est ensuite évaporé dans une étuve à une température de 40 °C pour éliminer l'eau (Talbi et al., 2015) (Figure 21).



1- Filtration

2-Evaporation

3-Résidu

**Figure 21 :** Etapes de préparation de l'extrait aqueuse.

#### 2.4.3. Détermination du rendement de l'extraction

La production rentable d'extraits est le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé par la formule suivante :

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

**R %** : Rendement en %.

**Me**:Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant.

**Mv** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

### **I.3.5. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de FolinCiocalteu)**

#### **❖ Principe**

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub> PW<sub>12</sub> O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub> PMO<sub>12</sub> O<sub>40</sub>). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé (**kassemi,2006**).

#### **2.5.1. Mode opératoire**

Le test de dosage des polyphénols totaux de notre travail a été réalisé au sein du laboratoire du Centre Universitaire Abd Elhafide Boussouf Mila.

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2005 par Skerget et ses collaborateurs.

Un volume de 500 µl de chaque extrait (méthanolique et aqueuse) à différente concentration est mélangé avec 2.5 ml de réactif de folin ciocalteu (FCR) dilué 10 fois (1 ml de réactif de Folin Ciocalteu et 9 ml d'eau distillé). Après 15 min on ajoute 2 ml de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>) à concentration de 75g/l (Figure 22). Après une incubation du mélange réactionnel pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm contre un blanc (Figure 23).



Figure 22 : Les étapes de dosage des polyphénols totaux.

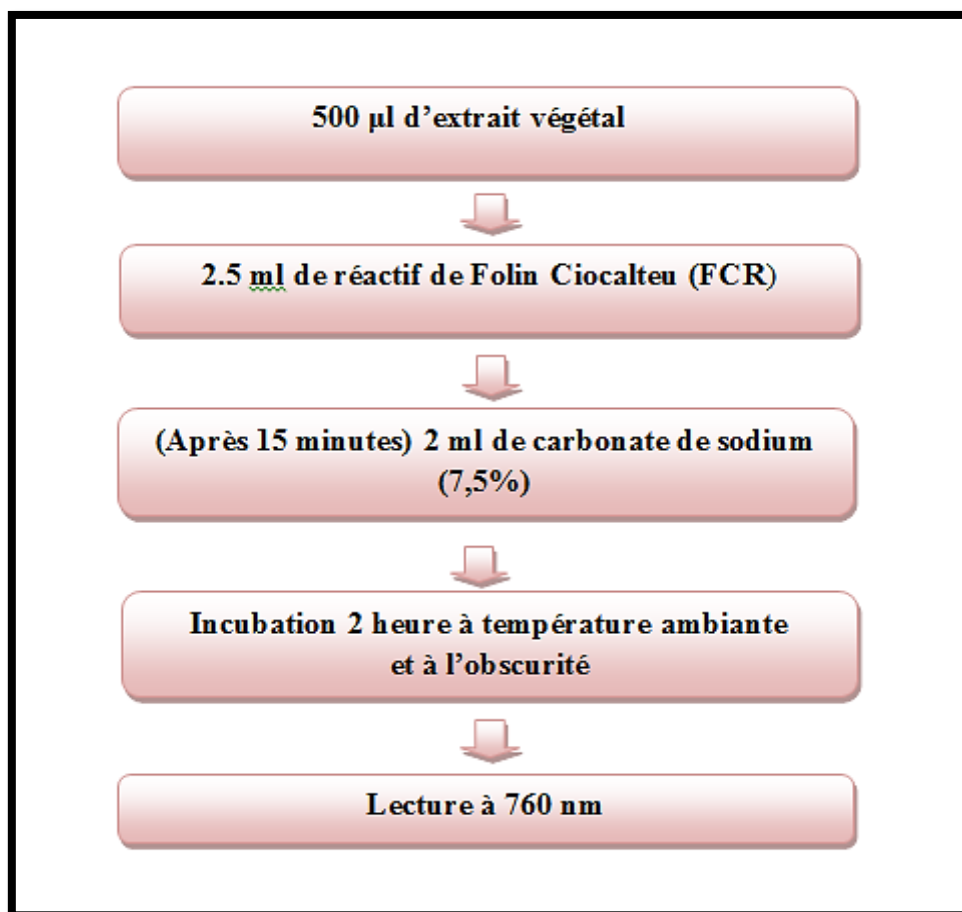


Figure 23: Protocole de dosage des polyphénols totaux.

La courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax$ ) est effectuée par l'acide gallique ; A partir d'une solution mère aqueuse préparée de l'acide gallique de concentration massique 0.75g/l dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage, des solutions filles sont ainsi préparées à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 1g du poids sec de la plante en poudre. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.



### 3.6. Activité antioxydant

Beaucoup des tests sont utilisés pour évaluer l'activité antioxydant des extraits. La plupart de ces tests sont basés sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel, dans notre étude nous avons utilisé le test DPPH.

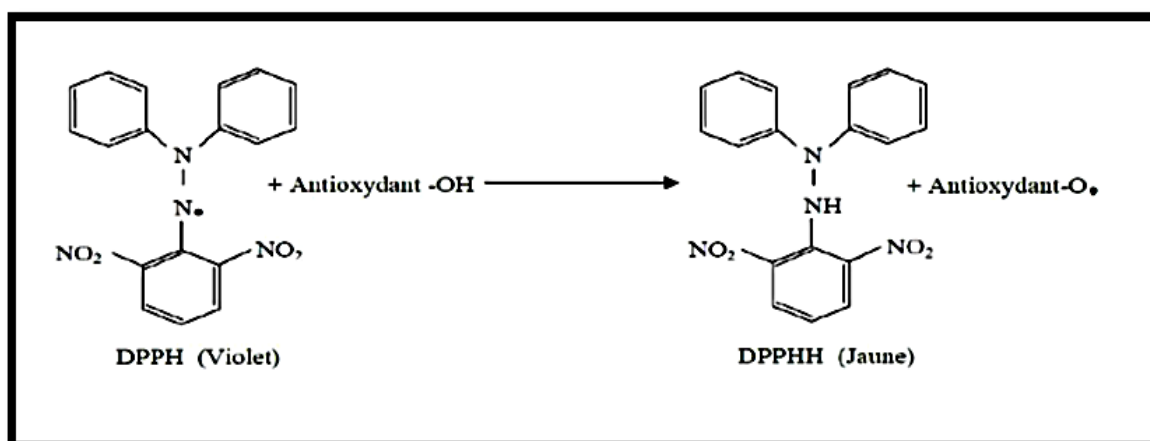
#### I.2.6.1. Piégeage du radical DPPH

##### ❖ Principe

La méthode au DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydant. Dont le composé chimique 2,2-diphényle-1 picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (**Bozin *et al.*, 2008**).

L'activité antioxydant de l'extrait de la plante étudiée a été évaluée par la mesure de piégeage du DPPH (1,1-Di-phényl -2-picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm.

Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu (**Fernandez *et al.*, 2011**) (Figure24).



**Figure 24:** Structure chimique du radical DPPH et de sa forme réduite (**Talbi *et al.*,2015**).

### 2.6.1.1. Mode opération

#### ➤ Préparation de la solution de DPPH

La solution de DPPH est obtenue en dissolvant 0.008g de la poudre dans 150 ml de la solution méthanolique (105ml méthanol + 45ml eau distillé), cette solution a été mise en agitation mécanique à l'obscurité pendant 24h (Figure 25).



**Figure 25 :** Préparation de la solution DPPH.

#### ➤ Test de DPPH

L'activité antioxydant des extraits méthanoliques et aqueux de SO; et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre au sein du laboratoire d'analyses médicales de polyclinique de frères BOUAROUGE.

Pour la mesure de cette activité, nous avons utilisé la méthode décrite par Ammar et al en 2009. Il consiste donc à préparer des dilutions pour tous les extraits des polyphénols ; pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de microgramme par ml.

Dans la première dilution ont ajouté 0.1 ml de chaque extrait à volume de 2,9 ml de solvant (méthanol +eau distillé) et 1 ml de solution de DPPH prés préparait. La lecture de l'absorbance ce faite à l'aide d'une spectrophotométrie à longueur d'onde  $\lambda = 517$  nm après l'incubation de trois temps différents (30,45 et 60 min) dans l'obscurité et à température ambiante, la même méthode s'appliqué sur la deuxième dilution, 0.2 ml d'extrait et 2.8 ml de méthanol et 1 ml de solution DPPH, et à la suite pour les autres dilutions (0.3, 0.4).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon et pour chaque concentration, le test est répété 3 fois (Ammar *et al.*,2009) (Figure 26) et (Figure 27).



Figure 26 : Les étapes de test DPPH.

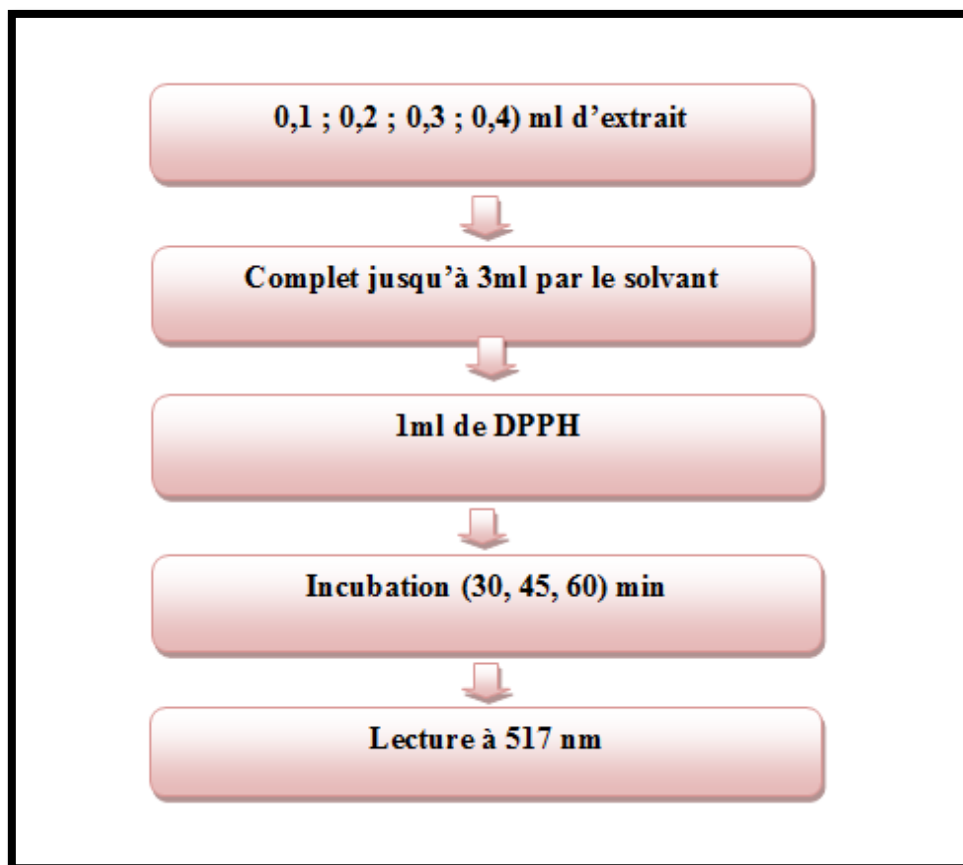


Figure 27: Protocole d'évaluation de l'activité antioxydante.

➤ **Expression des résultats**

L'activité anti-oxydante, qui exprime la capacité de piéger le radicale libre, est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH ou d'Inhibition (I%) selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Où:

**Abs** : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

**Abs contrôle** : Absorbance de la solution DPPH.

**Abs test** : Absorbance de la solution DPPH.

➤ **Calcul des EC50 (IC50)**

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC50 qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les valeurs EC50 ont été calculées par la régression linéaire est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition (I%) (**Bouras et Houchi, 2013**).

## 2.7. Activité anticoagulante

L'activité anticoagulante (tests TQ et TCK) des extraits phénoliques des feuilles de SO a été réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales : Dr.MIROUH.A à Ferdjioua. Pour le premier test est confirmée manuellement dans le laboratoire d'analyses médicales de polyclinique de frères BOUAROUE.

Cette activité a été évaluée in vitro vis-à-vis la voie exogène et endogène de la coagulation sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de deux tests chronométrique globaux, le test de temps de Quick (TQ) et le test de temps de céphalin-kaolin (TCK).

### 1.2.7.1. Préparation du pool plasmatique

Le pool plasmatique déplaquettés est un mélange de plasmas déplaquettés des 8 volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables. Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang (1 : 9, v/v).

Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes (Figure 28) et (Figure 29). Le mélange de ces plasmas déplaquetés (plasma standard) est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation (Athukorala, et al., 2007).

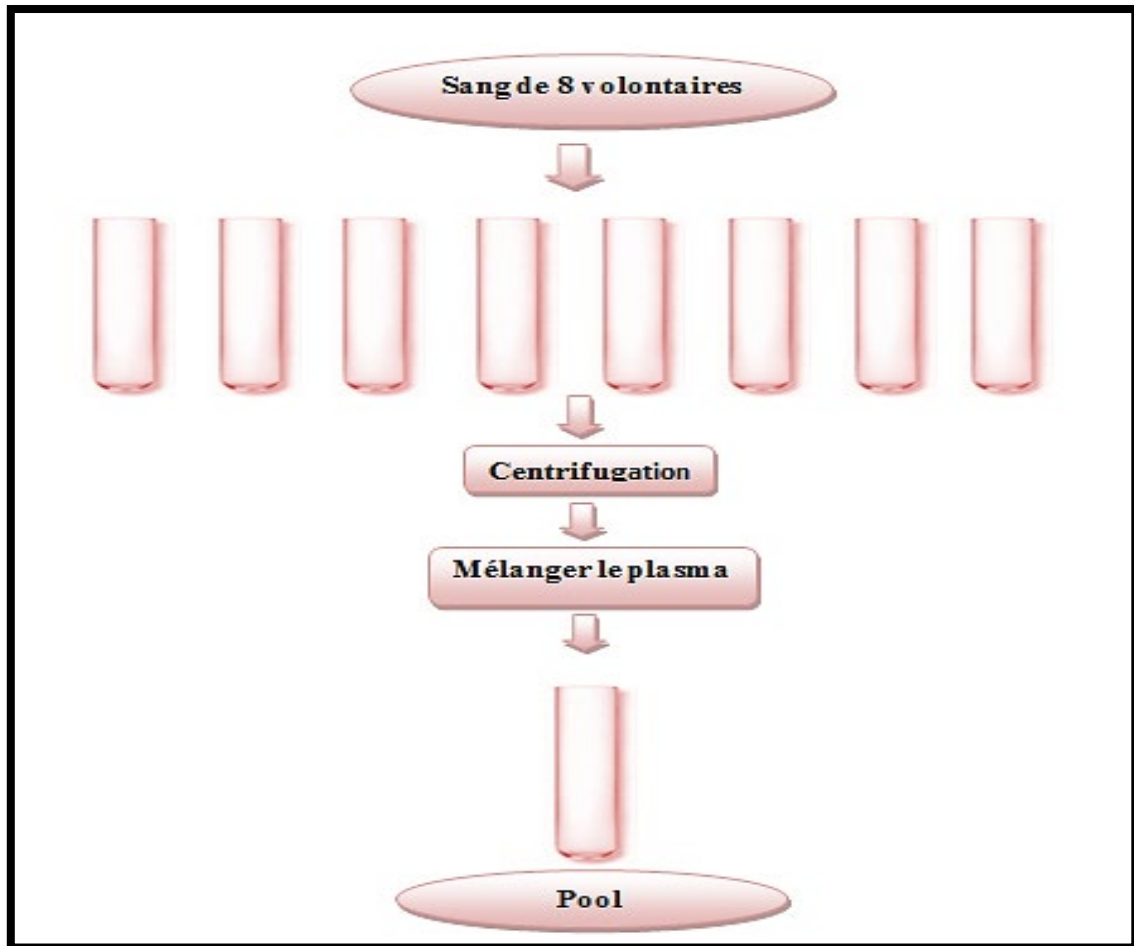


Figure 28: Les étapes de préparation d'un pool de plasma

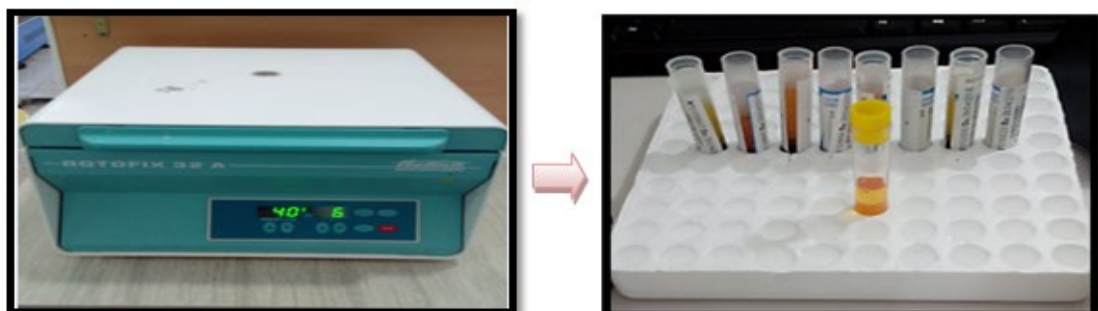


Figure 29 : préparation d'un pool de plasma

## 2.7.2. Test de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène (TQ)

### ❖ Principe

L'évaluation de l'activité anticoagulante des extraits polyphénoliques vis-à-vis la voie exogène de la coagulation a été déterminée en utilisant un test de coagulation appelé le temps de Quick ou le taux de prothrombine (TP) qui permet d'une exploration globale des facteurs II, V, VII et X de la voie extrinsèque de la coagulation (**Rizzo et al .,2009**).

Ce test consiste à mesurer le temps que met à se former un caillot de fibrine à 37°C lorsqu'on ajoute dans le plasma un excès de thromboplastine ou facteur tissulaire en présence de calcium. Normalement le caillot se forme en 12 à 13 seconds ce qui représente le temps Quick. Les facteurs de la voie exogène donc sont activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré (**Caquet, 2004**).

Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'échantillon exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

### 2.7.2.1. Mode opératoire

L'effet des polyphénols de *salvia officinalis* sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon le protocole décrit par **Athukorala et ses collaborateurs (2007)**.

Différents volumes des extraits (10, 20,30µl) ont été préparés à une concentration donnée et additionné à 100µl du plasma pauvre en plaquettes préchauffé durant 2 min à 37C°, les mélanges sont ensuite incubé à 37C° durant 15 minutes. Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200µl de thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C), et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot fibrineux est alors mesuré automatiquement à l'aide d'un coagulomètre (Figure 30) et manuellement à l'aide d'un chronomètre (Figure 31) et (Figure 32).



**Figure 30:** Evaluation de TQ par coagulomètre



Figure 31: Evaluation manuelle de TQ

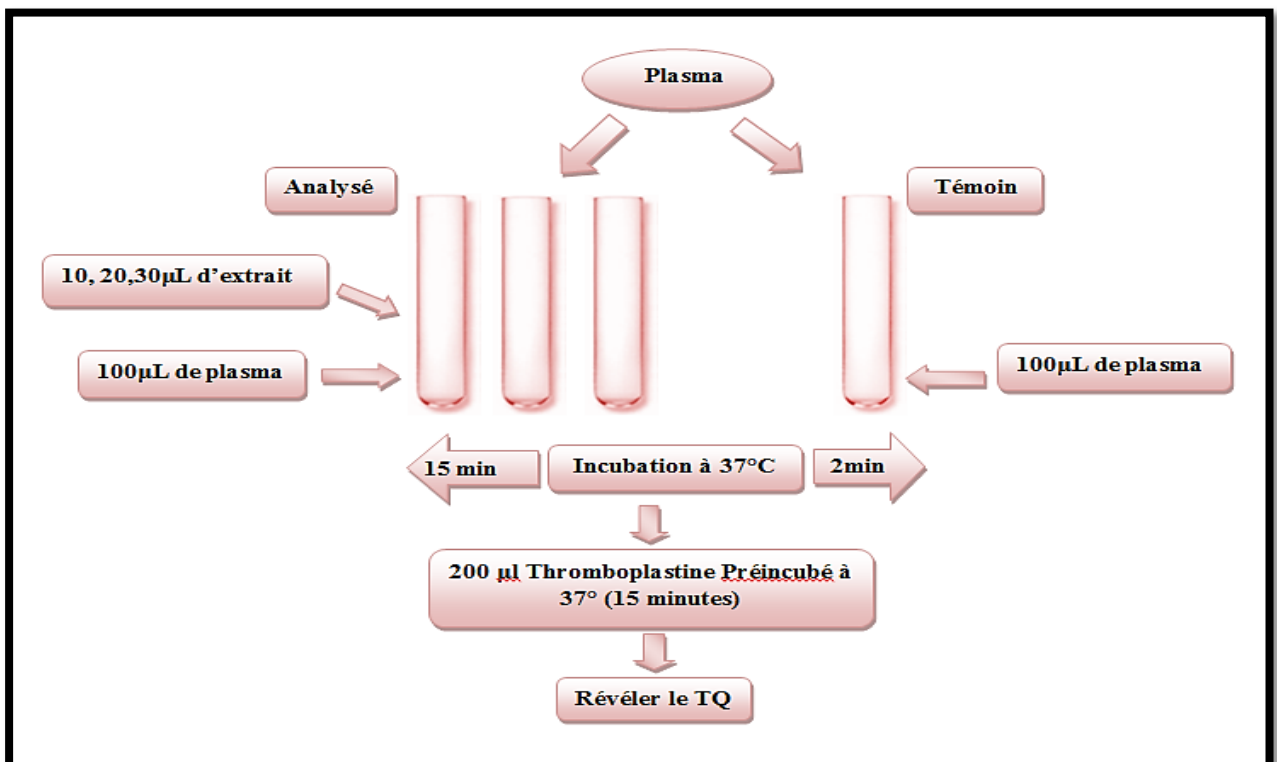


Figure 32: Protocole d'évaluation de l'activité anticoagulante (TQ).

### I.2.7.3. Test de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène (TCK)

#### ❖ Principe

L'activité anticoagulante des extraits polyphénoliques vis-à-vis la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le test du temps de céphaline-kaolin (TCK), qui permet d'une exploration globale des facteurs II, V, VIII, IX, X, XI et XII de la voie intrinsèque de la coagulation (Rizzo *et al.*, 2009).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) et citrate mis en présence de phospholipides (la céphaline) substitut du facteur 3 plaquettaire (F3P) d'un activateur du système contact (Prékalikriène, Kininogène de haut poids

moléculaire et le facteur XII) qui est généralement le Kaolin et de calcium comme un facteur déclenchant (Caquet, 2004).

### 2.7.3.1. Mode opératoire

Dans un premier temps, afin de déterminer le temps d'incubation qui permet d'obtenir une activité anticoagulante optimal des extraits et de certains de leurs composés, 100  $\mu$ l de plasma pauvre en plaquettes est mélangé avec différents volumes de ces solutions (10, 20, 30  $\mu$ l), préparées à une concentration donnée. Après 15 min d'incubation à 37°C, 100  $\mu$ l de céphaline-kaolin est additionné au mélange qui est réincubé durant 3 min à 37°C, suivi d'une addition de 100 $\mu$ l de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) préchauffé pour une recalcification du plasma. Le temps de la coagulation est alors enregistré à l'aide d'un coagulomètre (Athukorala et al.,2007). (Figure 33) et (Figure 34).



**Figure 33:** Evaluation de TCK par coagulomètre.



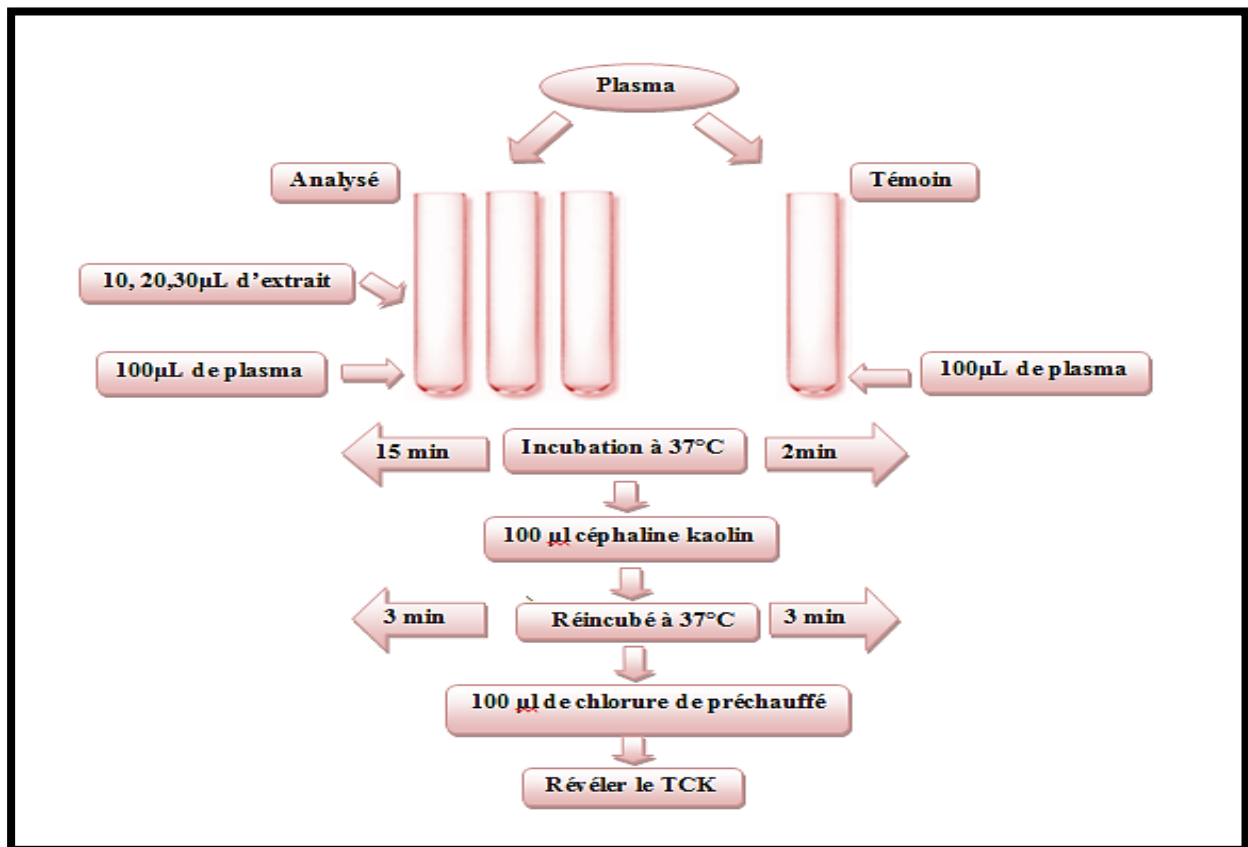


Figure 34: Protocole d'évaluation de l'activité anticoagulante (TCK)

## 2.8. Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et aqueux de *Salvia officinalis* est évaluée par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé, c'est l'équivalent d'antibiogramme ou méthode de l'aromatogramme (Belhattab *et al.*, 2004).

### 2.8.1. Aromatogramme (Méthode de diffusion sur disque) :

#### ❖ Principe

Cette méthode permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques. L'antibiotique présent dans le disque migre dans la gélose qui a étéensemencée par la souche bactérienne à étudier. Il se forme une zone circulaire autour du disque de gélose imbibée d'antibiotique dont la concentration décroît quand on s'éloigne du disque. Dans cette zone, la croissance des bactéries est ou n'est pas inhibée par la concentration d'antibiotique à laquelle elles sont soumises. Les bactéries qui peuvent se multiplier forment des colonies visibles à l'œil nu après quelques heures de développement. Le diamètre de la zone

d'inhibition (DZI), qui traduit l'activité antibactérienne, est ainsi déterminé (François, 2000 ; Cavallo, 2007).

### 2.8.2. Souches bactériennes testées

Pour tester l'activité antibactérienne de nos extraits phénoliques de *Salvia officinalis*, deux souches bactériennes de référence de type ATCC (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) et deux souches cliniques (*Enterococcus faecalis*, *Klebsilla pneumoniae*) ont été utilisées ; Ces espèces bactériennes ont été choisies parce qu'elles représentent les espèces à Gram (-) et à Gram(+) les plus communes, responsables d'infections graves chez l'homme et dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques. Elles sont activées à 37 °C pendant 24 heures par repiquage sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH). Ces souches appartiennent à la collection de laboratoire d'analyses médicales : Dr. Mirouh.A à Ferdjioua et réalisée aux laboratoires de centre universitaire Abdelhafid BOUSSOUF- Mila. Le tableau 08 représente les différentes souches bactériennes testées.

**Tableau 08** : Souches bactériennes testées

Familles	Genre et espèce	Gram
<i>Enterobacteriacées</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Négatif
<i>Enterobacteriacées</i>	<i>Klebsilla pneumoniae</i>	Négatif
<i>Micrococaceae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Positif
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positif

### 2.8.3. Choix des antibiotiques utilisés

Le choix des antibiotiques testés sur les différentes souches bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis -à- vis des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique (CASFM, 2012).

Dans notre travail les disques d'antibiotiques, utilisés pour les essais de diffusion sur disque, sont la gentamicine (CN10) et le cotrimoxazol (SXT25), ils ont été sélectionnés selon leur disponibilité.

#### 2.8.4. Milieux de cultures utilisés

Selon les souches bactériennes nous avons utilisé les milieux de cultures suivants : Mueller Hinton (MH), Bouillon nutritif (BN) et l'eau physiologique. La composition de ces milieux de culture est décrite dans l'annexe 03.

#### 2.8.5. Mode opératoire

Pour déterminer l'activité antibactérienne des extraits de la plante, nous avons utilisé la méthode décrite par (Choi *et al.*, 2006).

##### ➤ Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés pour la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman n°3 (6 mm de diamètre) enrobés du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

##### ➤ Préparation d'une zone stérile

Désinfecter la paillasse à l'eau de javel diluée et utiliser des becs bunsen pour réaliser une zone stérile.

##### ➤ Préparation de milieu de culture

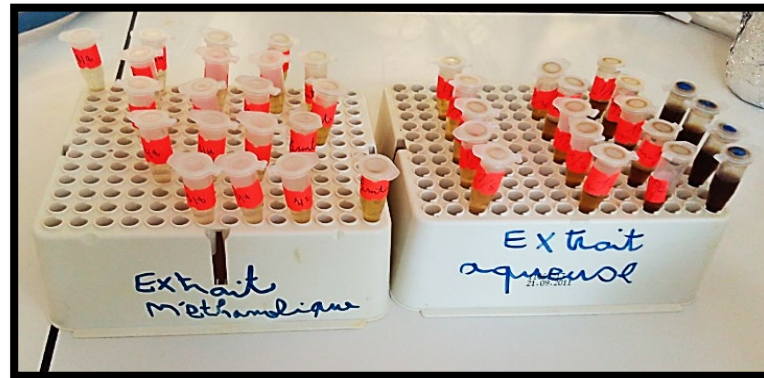
Le milieu utilisé pour le maintien des souches et l'étude de la sensibilité bactérienne aux extraits testés est le milieu Mueller Hinton. Il est préparé comme suit : Dissoudre 38g de la gélose Muller-Hinton dans 1L d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boites de Pétri, après refroidissement de milieu (Figure 35).



**Figure 35:** Préparation de milieu de culture.

➤ **Préparation de la gamme de concentration des extraits**

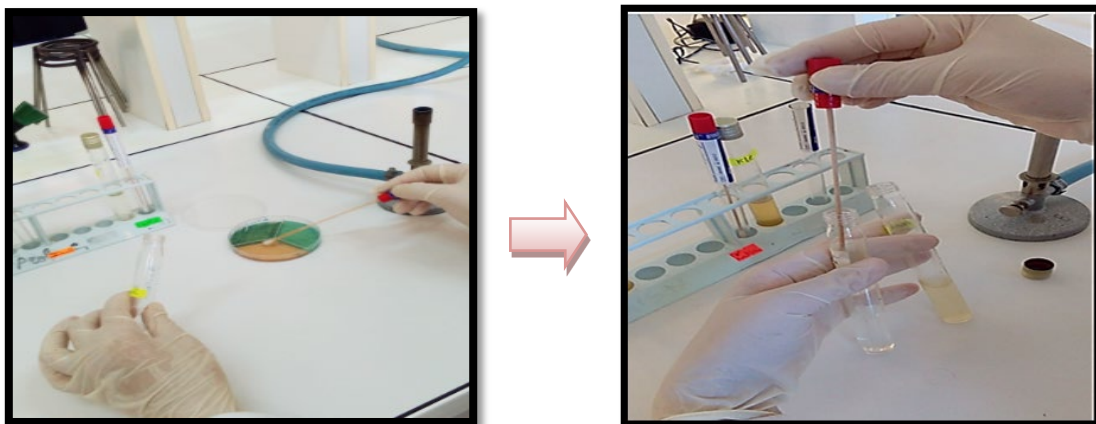
La gamme de concentration des extraits méthanoliques et aqueux a été préparés dans des tubes à essais (1, 1/2, 1/4, 1/8) par la méthode de la double dilution selon une progression géométrique de raison 1/2 (Figure36).



**Figure 36:** différentes concentrations des extraits.

➤ **Préparation de l'inoculum**

À partir d'une culture jeune de 18 à 24 h des bactéries, on réalise des suspensions troubles en prélevant 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées qu'on dépose dans le bouillon nutritif. Après incubation pendant 24 heures à 37°C dans l'étuve, quelques millilitres de cette culture sont ajoutés dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile et agité au vortex pendant quelques secondes. Puis cette suspension est ajustée au standard 0,5 Mc Farland à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 108 UFC/ ml (units forming colony /ml). L'inoculum ainsi doit être utilisé dans les 15 mn suivant sa préparation (Figure 37).



**Figure 37 :** préparation de l'inoculum.

➤ **Ensemencement des boîtes**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à partir de l'inoculum fraîchement préparé. À l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré à l'intérieur du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible à la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec la gélose de Mueller- Hinton (Figure 38). Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte 60° afin d'assurer une bonne répartition de l'inoculum et en tournant l'écouvillon sur lui-même. Laisser sécher les boîtes 10 minutes avant de déposer les disques.

Pour chaque souche testée, les boîtes de pétri, sont écouvillonnées par le même écouvillon à la condition d'être recharger pour chacune d'elles.



**Figure 38:** Ensemencement des boîtes.

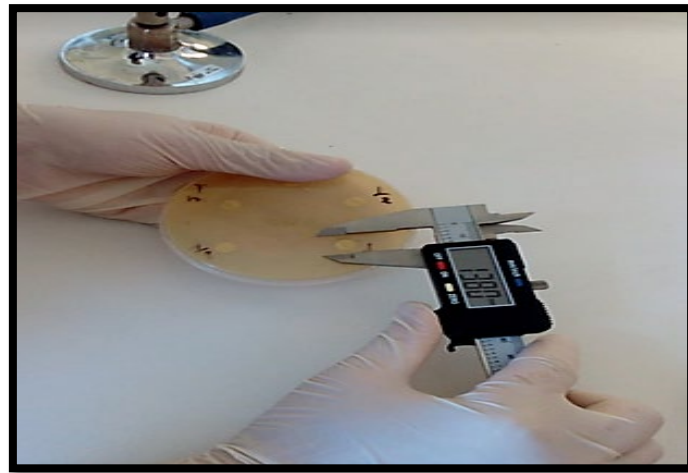
➤ **Préparation des disques**

Des disques de papier Wattman n°3 stériles de 6 millimètres de diamètre sont déposés délicatement sur la surface de la gélose MH inoculée à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. Puis à l'aide de micropipette 1 disque imprégné par le brut de chaque extrais (méthanoliques et aqueux) et 3 disques imprégnés par les extrais diluée dans du méthanol à 1/2, 1/4 et 1/8 (v/v).

Finalement, on prépare des disques imprégnés de méthanol (témoin négatif), deux disques d'antibiotiques standards (témoin positif) ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extrais testés, l'opération est répété trois fois pour avoir des résultats fiables. Les boîtes de Pétri sont laissées sur la paillasse au moins 15 min pour une pré-diffusion des extrais avant d'être incubées à 37°C pendant 24 h.

➤ **Lecture des résultats**

Après l'incubation, l'effet des extraits se traduit par l'apparition d'une zone circulaire transparente autour de disque correspondant à l'absence de la croissance. La lecture des résultats se fait par la mesure, à l'aide d'un pied à coulisse, du diamètre de la zone d'inhibition, en prenant la moyenne des trois essais effectués. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Figure 39).



**Figure 39** : Lecture des résultats.

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des extraits étudiée est classée selon le diamètre d'inhibition dans le tableau suivant:

**Tableau 09:** Classement de la sensibilité bactérienne selon le diamètre d'inhibition (Najjaa *et al*.,2007).

Observation	Signe	Diamètre d'inhibition
Non sensible	(-)	D < 6mm
Sensible	(+)	D compris 7-12 mm.
Très sensible	(++)	D compris 13-17 mm
Extrêmement sensible	(+++)	D > 18 mm

➤ **Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration des extraits qui inhibe les bactéries testées (qui est corrélée à une absence de croissance). Elle consiste à

inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en extraits. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

### **2.9. Analyse statistique**

Des analyses statistiques descriptives, multidimensionnelles et décisionnelles ont été réalisées avec le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 24.

Pour chacun des paramètres étudiés, nous avons procédé à une analyse descriptive (moyenne, Ecart- type....)

Pour tester l'effet de ces paramètres sur l'activité antioxydante des trois extraits étudiée, on a procédé à une analyse de variance à trois facteurs ; le seuil de signification retenu est  $P \leq 0.05$ , la comparaison des moyennes a été effectuée par le test LSD.



*Chapitre II :*  
*Résultats et discussion*



## 1. Résultats de screening phytochimique

Les tests de screening phytochimique ont été réalisés sur l'extrait préparé à partir des feuilles de *Salvia officinalis*. Ces tests consistent à détecter des différents composés chimiques existants dans les feuilles de notre espèce.

Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Les résultats de ce criblage phytochimique sont reportés dans le Tableau 10, qui révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolite secondaire.

**Tableau 10:** les résultats des tests phytochimiques

Principes actifs	Sauge
Alcaloïdes	+
Coumarines	+++
Tannins	+++
polyphénols	+++
Anthraquinones	-
Anthocyanes	-
Glycosides	+++
Stérols et triterpènes	+++
Quinones	++
Quinones libres	-
Saponines	+++
Flavonoïdes	+++

Test fortement positive (+++), Test positive (+ +), Test faible positive (+), Test négatif (-).

### ➤ Alcaloïdes

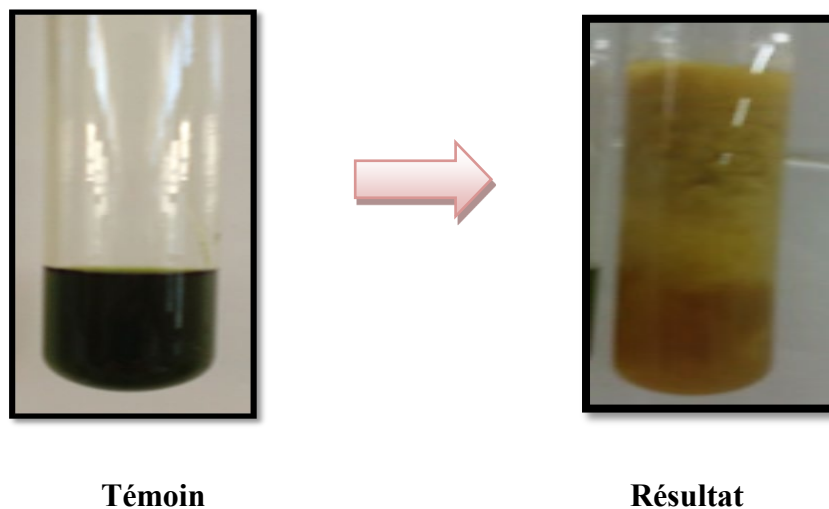
L'apparition d'un précipité blanc et brun après addition du réactif de Wagner dans l'extrait ce qui indique que notre plante contient des alcaloïdes (Figure 40).



**Figure 40** : Résultat du test des alcaloïdes

➤ **Coumarines**

Le résultat de ce test indique que la sauge contient des coumarines. Sa présence est confirmée par la formation d'une précipitation rouge brune dans l'extrait de SO (Figure 41).



**Figure 41** : Résultat du test de coumarines

➤ **Tannins**

Après le traitement de l'extrait par la solution aqueuse du  $\text{FeCl}_3$ , on note une intensité de la couleur verte foncée ce qui indique que la plante est très riche en tannins (Figure 42).



Figure 42: Résultat du test des tannins

➤ polyphénols

Le test de recherche des polyphénols dans l'extrait SO a donné des réactions positives. L'apparition de la coloration bleue noirâtre indique la présence des polyphénols dans l'espèce étudiée (Figure 43).

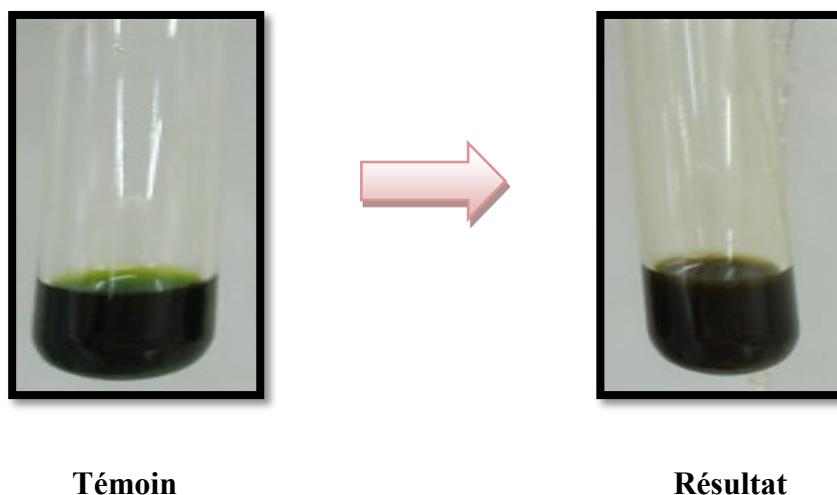
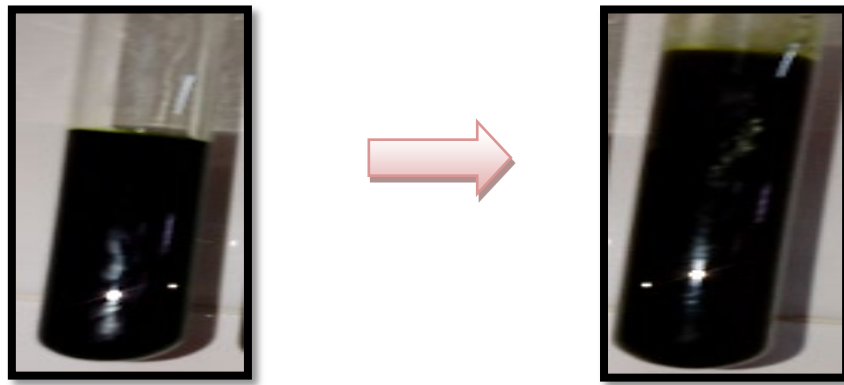


Figure 43: Résultat du test des substances polyphénoliques

➤ Anthraquinones

Les résultats de ce test, ne révèlent pas la formation d'un anneau rouge dans cet extrait, cela montre l'absence des anthraquinones dans la plante SO (Figure 44).



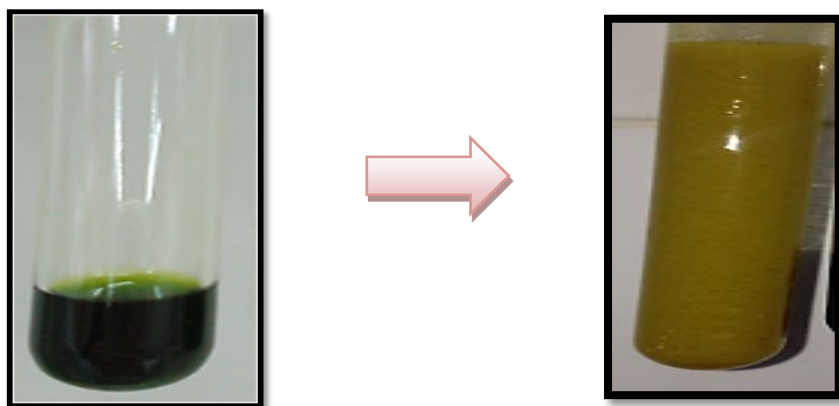
Témoin

Résultat

Figure 44 : Résultat du test des anthraquinones

➤ Anthocyanes

On n'observe pas l'apparition de la coloration bleue violacé en milieu basique dans la solution testée ; Donc notre plante SO ne contient pas des anthocyanes (Figure 45).



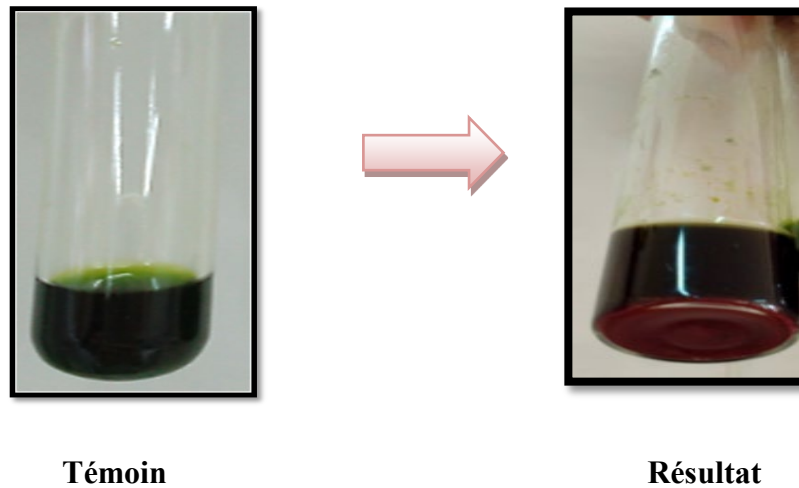
Témoin

Résultat

Figure 45 : Résultat du test des anthocyanes

➤ Glycosides

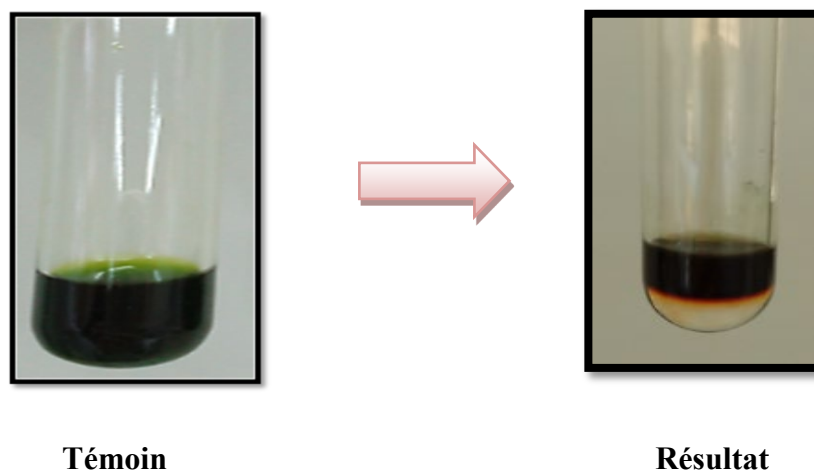
Pour le résultat du test des glycosides, l'apparition d'une précipitation rouge brique au fond de tube à essai de l'extrait prouve la présence des glycosides (Figure 46).



**Figure 46** : Résultat du test des glycosides.

➤ **Stérols et triterpènes**

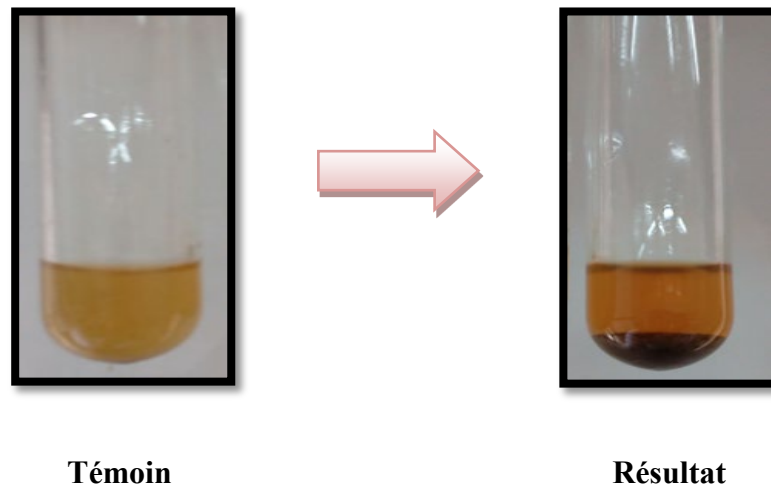
La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides révèle la présence de stérols et triterpènes (Figure 47).



**Figure 47** : Résultat du test des stérols et triterpènes.

➤ **Quinones**

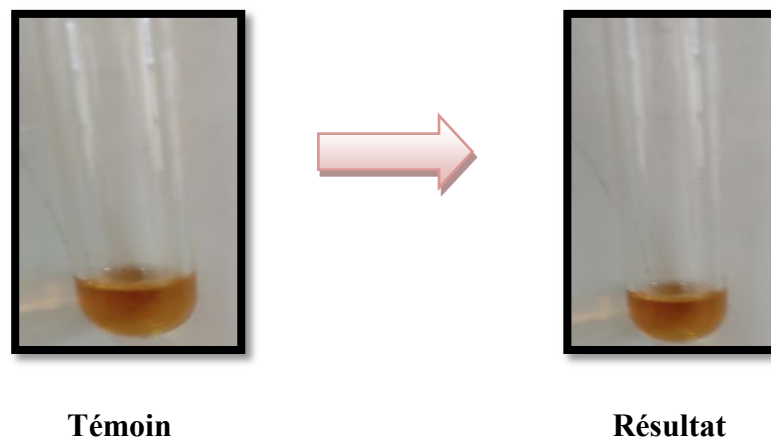
On observe une coloration de la phase aqueuse de solution chez la sauge, ce qui indique une présence à concentration forte de quinones (Figure 48).



**Figure 48 : Résultat du test des quinones**

➤ **Quinones libres**

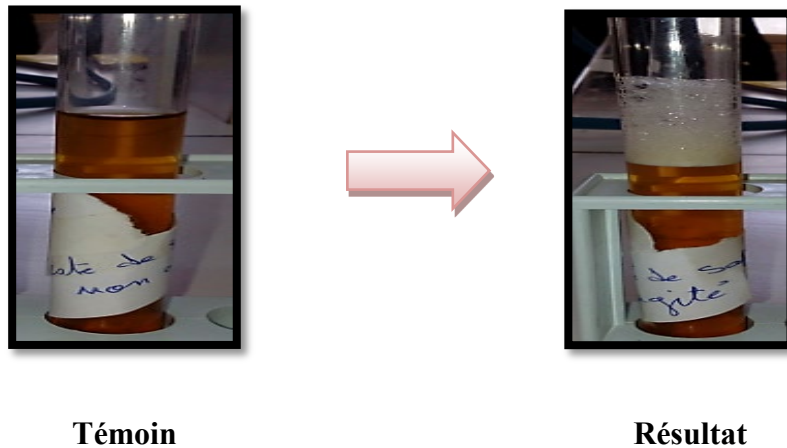
Le résultat de ce test montre l'absence des quinones libres dans l'extrait de *S officinalis* ; et cela a été confirmé par l'absence d'une coloration de la phase aqueuse (Figure 49).



**Figure 49 : Résultat du test des quinones libres**

➤ **Saponines**

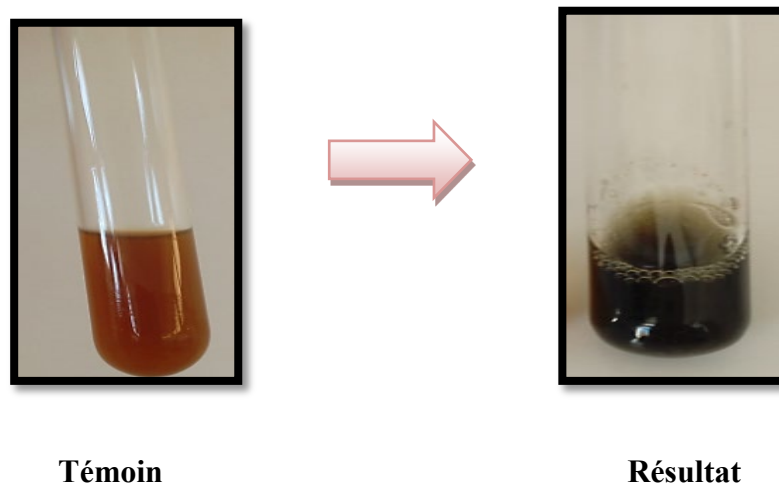
Concernant les saponosides, après agitation des tubes à essai on a observé l'apparition d'une mousse persistante avec une hauteur de 2.5 cm ( $>1$ cm). Ce qui indique une présence très forte de saponines (Figure 50).



**Figure 50:** Résultat du test des Saponines

➤ **Flavonoïdes**

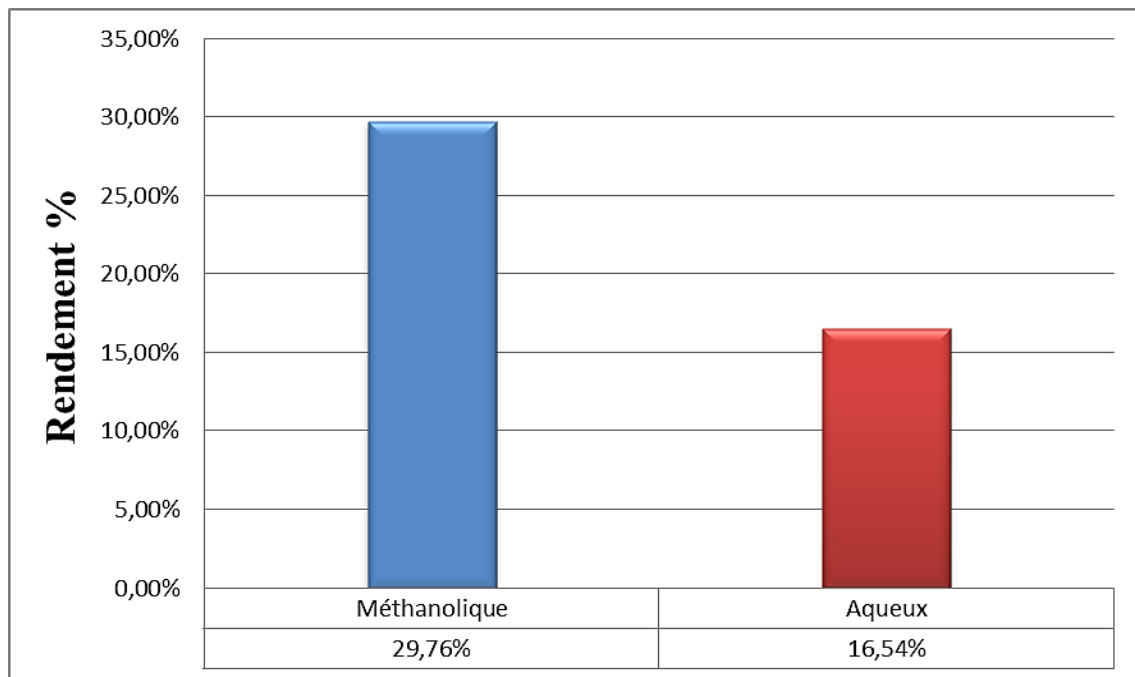
La transformation de la couleur de l'extrait en couleur verdâtre confirme leur richesse en flavonoïdes (Figure 51).



**Figure 51:** Résultat du test des Flavonoïdes

## **2. Résultats de rendement des extraits bruts**

La préparation des extraits méthanoliques et aqueux à partir de la poudre des feuilles de *Salvia officinalis* a été effectuée par macération dans le méthanol-eau et dans l'eau respectivement. Le rendement de ces extraits a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec, les résultats ont été exprimés en pourcentage (%) (Figure 52).



**Figure 52 :** Rendement en extrait : méthanolique et aqueux de l'espèce *Salvia officinalis* L.

Les résultats obtenus montrent que les rendements en extrait méthanolique et aqueux de *Salvia officinalis* sont variables, le rendement le plus élevé est celui de l'extrait méthanolique brut avec un pourcentage de l'ordre de 29.76%. Cependant les résultats de rendement de l'extrait aqueux de SO demeurent moins importants (16.54 %).

### 3. Résultats de dosage des polyphénols totaux (*salvia officinalis* L.)

Le dosage des phénols totaux a été estimé par la méthode spectrophotométrique de Singleton avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Le taux des phénols totaux de chaque extrait de *salvia officinalis* est déterminé à partir de l'équation de la régression linéaire de courbe d'étalonnage exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg EAG/gES) (Figure 53).



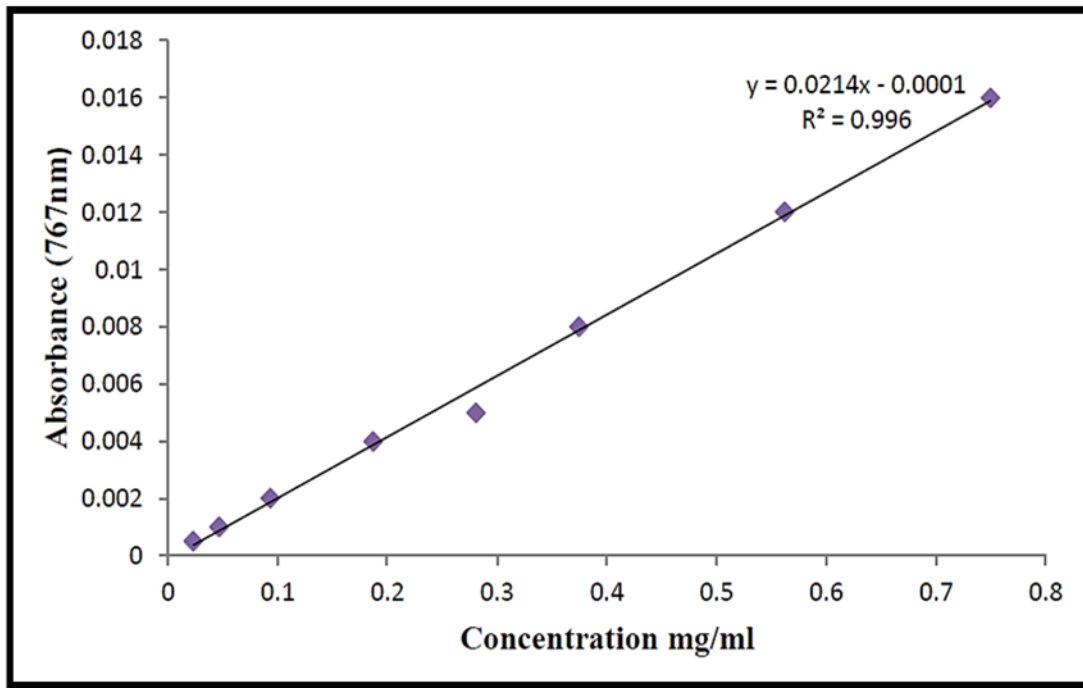


Figure 53: Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique.

Les résultats de la teneur en polyphénols totaux des deux extraits (méthanolique et aqueux) issus des feuilles de SO sont illustrées dans la figure 54:

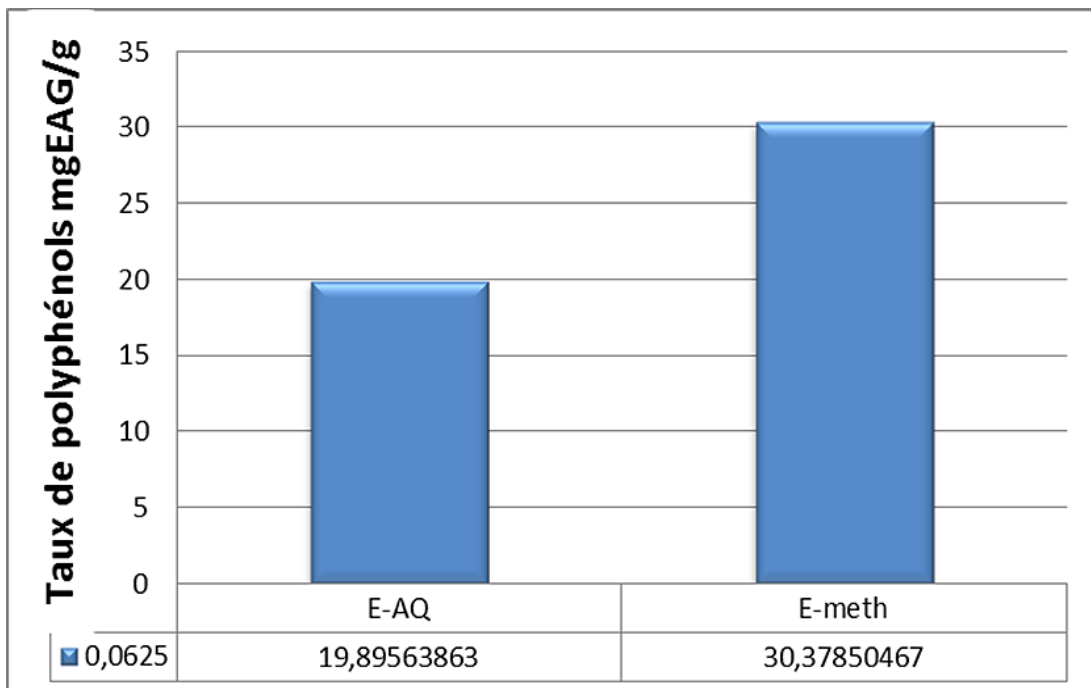


Figure 54: Teneur en polyphénols totaux des extraits de *Salvia officinalis* L.

D'après les résultats, on peut dire que les deux extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de *salvia officinalis* présentent une teneur de polyphénols mais avec des quantités différentes.

L'histogramme ci-dessus, montre que la valeur moyenne de la teneur en polyphénols des deux extraits méthanolique et aqueux avec la dilution 1/16 sont de  $(30,378 \pm 0,0467 \text{ mg EAG/g})$  et de  $(19,896 \pm 0,1176 \text{ mg EAG/g})$  respectivement, ce qui traduit une teneur en polyphénols totaux de  $(4,860 \pm \text{ mg EAG/g})$  et de  $(3,183 \pm \text{ mg EAG/g})$  respectivement, où il ressort que l'extrait méthanolique a une valeur plus importante que l'extrait aqueux.

#### 4. Discussion

Le screening photochimique des feuilles de *salvia officinalis* L. a mis en évidence la présence des plusieurs composés chimiques. La richesse de cette plante en métabolites secondaires justifie leur grande efficacité en usage thérapeutique traditionnel.

Les résultats de screening phytochimique sur l'extrait des feuilles de *salvia officinalis* L. nous a permis de détecter les composés suivants: les polyphénols, les saponines, les glycosides, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, et les alcaloïdes seuls à faible concentration. Ces résultats d'analyses phytochimiques s'accordent avec ceux obtenus par **(Ghorbani et Esmaeilizadeh, 2017)**.

Pour les polyphénols nos résultats sont approuvés par **(Lu et Yeap, 2001)**, qui ont montré que les feuilles de sauge contiennent une quantité très importante des polyphénols.

De même les résultats réalisés par **(Lu et Foo, 2002)** et par **(lima et al., 2007)** ; montrent que les feuilles de SO renferment les flavonoïdes, les glycosides et les tanins et ceci s'accordent avec nos résultats. Nos résultats des anthraquinones ; anthocyanes et quinones libres s'accordent avec ceux obtenus par **(Said et al., 2002)**.

D'une étude entreprise par **Kanyonga et al (2011)** un rendement de 39,2% de l'extrait brut méthanolique a été obtenu à partir de la partie aérienne de la plante *Salvia officinalis*, c'est un pourcentage nettement supérieur à celui obtenu dans notre cas (29.76%).

**Pavela (2004)** et **Achat (2005)** travaillant sur la même plante ont obtenu un rendement en extrait méthanolique de 19,28 % et de 25 % ce qui apparait inférieur à celui obtenu dans notre étude.

D'autres études menées par **Menaker et al (2004)** ont donné un rendement très faible (1,32 %) d'un extrait éthanolique de de *Salvia officinalis*. Ces variations sont probablement dues à la différence du solvant utilisé.

**Amina (2016)** dans son étude sur plusieurs plantes de la famille des lamiacées a déterminé un rendement de 16.5% et 20.35% d'extrait aqueux de *Mélissa officinalis* et *Mentha rotundifolia* respectivement. Ces résultats proches de ceux trouvés dans la présente étude.

D'une manière générale, les rendements en extraits secs varient en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols : la température, le type de solvant utilisé pour l'extraction, le rapport entre la masse de poudre et le volume du solvant, ainsi que la technique d'extraction utilisée (**Louli et al., 2004 ; Naczk et Shahidi, 2004**).

De nombreuses études sur l'analyse quantitative des composés phénoliques ont été réalisées sur l'espèce *S. officinalis* L.

Une teneur de 15,6 mg/g de MS de polyphénols totaux a été obtenue par **Baskan et al (2007)**, qui est très élevée par rapport aux résultats que nous avons obtenus.

Nos résultats de la teneur en polyphénols est inférieure aux ceux trouvés par **Miliauskas et al (2004)**, qui ont montré que SO possède un contenu en polyphénols de  $9,7 \pm 0,4$  mg EAG/g d'extrait.

**Achat (2005)** dans son étude sur la sauge a obtenu une teneur de 54,77 mg équivalent catéchine /g MS de polyphénols totaux. Ces résultats diffèrent de ceux trouvés dans la présente étude., cela est dû probablement aux différents standards utilisés.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs géographiques et climatiques, le degré de maturation de la plante, la période de la récolte, la durée du stockage, la nature des solvants et la méthode d'extraction utilisée ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (**Aganga, 2001**).

Les résultats obtenus par : **Casio et al (2006)**, **Hammoudi (2015)** et **Mukhopadhyaya et al (2006)** confirment nos résultats en indiquant que SO est riche en polyphénols totaux.

## 5. Activité antioxydante

Les méthodes utilisés pour évaluer la capacité antioxydante des extraits végétaux sont très diverses parmi lesquelles la méthode du DPPH•. L'activité antioxydant de nos extraits

méthanolique et aqueux de *salvia officinalis* ainsi que du standard (acide ascorbique) se manifeste via le changement de la couleur de DPPH• entre l'état oxydée (forme violette) et l'état réduit (forme jaune), ce qui permet de quantifier le pourcentage d'inhibition de ce radical en utilisant une spectrophotométrie à 517nm ; pour mesurer les variations de l'absorbance aux différentes concentrations utilisées.

## 5.1. Résultats

### 5.1.1. Analyse des effets des paramètres étudiés sur l'AAO

Les valeurs de l'activité antioxydante des deux extraits (méthanolique et aqueux) de SO et du standard (acide ascorbique) sont représentés dans le tableau 11:

**Tableau 11:** Effet paramètres étudiés sur l'AAO

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
extrait	14999,807	2	7499,903	283,918	0,000 **
Temps	109,223	2	54,611	2,067	0,134 <sup>ns</sup>
Dilution	3360,657	3	1120,219	42,407	0,000 **
extrait * Temps	412,636	4	103,159	3,905	0,006 **
extrait * Dilution	24820,631	6	4136,772	156,602	0,000 **
Temps* Dilution	372,825	6	62,138	2,352	0,039 *
extraits * Temps * Dilution	454,956	12	37,913	1,435	0,170 <sup>ns</sup>

\*\* La corrélation est hautement significative au niveau ( $P \leq 0.01$ ). \* La corrélation est significative au niveau ( $P < 0.05$ ). <sup>ns</sup> La corrélation est non significative.

L'étude générale de ces résultats révèle qu'il y'a des différences très hautement significatives à  $p \leq 0.01$  pour les paramètres extrait, dilution et pour l'interaction extrait / temps, extrait /dilution, cependant, l'effet interaction temps /dilution est significatives à  $P \leq 0.05$ , tandis que pour le paramètre temps, et l'interaction extrait /temps/dilution n'étaient pas significatifs ( $p \geq 0.05$ ).

➤ **Effet extrait sur l'AAO**

L'effet extrait sur les résultats relatif à l'AAO est représentés dans le tableau 12:

**Tableau 12:** Effet extrait sur l'AAO.

		AAO			
		Moyenne	Ecart type	Maximum	Minimum
extrait	E-meth	66,70 <sup>a</sup>	17,17	95,00	38,16
	E-AQ	44,05 <sup>b</sup>	17,99	78,07	9,91
	ASC	70,88 <sup>c</sup>	16,73	97,60	49,20

Les résultats relatifs à ce paramètre révèlent des différences hautement significatives entre les deux extraits (méthanolique et aqueux) de SO et le standard, notons que ASC présente une AAO plus élevée avec une moyenne de 70,88 suivie par l'extrait méthanolique qui présente une AAO avec une moyenne de 66,70. Alors que l'extrait aqueux présente une AAO moins importante que celle de l'ASC et de l'extrait méthanolique avec une moyenne de 44,05.

➤ **Effet dilution sur l'AAO**

Les résultats de l'effet de la dilution sur l'AAO des deux extraits (méthanolique et aqueux) de SO sont illustrés dans le tableau 13 :

**Tableau 13:** Effet dilution sur l'AAO.

		AAO			
		Moyenne	Ecart type	Maximum	Minimum
Dilution	0.1ml	54,91 <sup>a</sup>	10,51	78,07	38,16
	0.2ml	56,88 <sup>b</sup>	6,39	65,20	40,93
	0.3ml	60,95 <sup>c</sup>	21,41	86,80	21,40
	0.4ml	69,44 <sup>d</sup>	32,36	97,60	9,91

Les résultats liés à ce paramètre montrent des différences hautement significatives entre les quatre dilutions, la dilution 0.4ml enregistre la plus grande AAO avec une valeur moyenne de 69,44 par rapport aux autres dilutions. La dilution 0.1ml présente une AAO avec une valeur moyenne de 54,91. Alors que les dilutions 0.2ml et 0.3ml enregistrent une AAO avec des valeurs moyennes de 56,88 et de 60,95 respectivement.

➤ **Effet interaction extrait /temps sur l'AAO**

L'effet interaction extrait /temps de SO et du standard (acide ascorbique) est représenté dans le tableau 15 :

**Tableau 14:** Effet interaction extrait /temps sur l'AAO

				AAO			
				Moyenne	Ecart type	Maximum	Minimum
extrait	E- méth	Temps	30min	65,82	17,14	90,76	47,20
			45min	64,95	17,36	86,80	38,16
			60min	69,33	18,19	95,00	40,12
	E-AQ	Temps	30min	43,68	22,10	78,07	9,91
			45min	46,89	13,24	68,53	30,06
			60min	41,60	18,72	72,01	18,45
	ASC	Temps	30min	68,30	16,04	90,80	49,20
			45min	70,10	16,50	94,40	49,20
			60min	74,23	18,45	97,60	50,00

A travers les résultats obtenus, on a déduit que le standard (ASC) et l'extrait méthanolique ont exercés une forte AAO dans le temps 60min avec des valeurs moyennes de 74,23, et 69,33 respectivement. Cependant l'extrait aqueux donne une forte AAO dans le temps 45 min avec une valeur moyenne de 46, 89.

➤ **Effet interaction extrait /dilution sur l'AAO**

Les résultats obtenus pour l'effet interaction extrait /dilution des deux extraits et du standard dans le tableau 16.

**Tableau 15:** Effet interaction extrait /dilution sur l'AAO

				AAO			
				Moyenne	Ecart type	Maximum	Minimum
Extrait	E-meth	Dilution	0.1ml	46,01	5,04	52,16	38,16
			0.2ml	59,60	3,05	64,08	53,28
			0.3ml	71,52	9,24	77,88	47,20
			0.4ml	89,68	3,25	95,00	84,80
	E-AQ	Dilution	0.1ml	67,96	5,67	78,07	59,10
			0.2ml	49,48	4,43	56,25	40,93
			0.3ml	33,29	7,38	47,91	21,40
			0.4ml	25,48	10,73	42,97	9,91
	ASC	Dilution	0.1ml	50,76	1,24	52,40	49,20
			0.2ml	61,56	3,04	65,20	56,40
			0.3ml	78,04	5,87	86,80	71,60
			0.4ml	93,16	3,03	97,60	88,40

Les résultats de ce paramètre (Interaction extrait /dilution) montrent que la meilleure AAO pour l'extrait méthanolique et l'ASC est enregistrés avec la dilution 0,4ml avec des valeurs moyennes sont respectivement de 89,68 et de 93,16. Tandis que l'extrait aqueux donne sa meilleure valeur en AAO (67,96) avec la dilution 0,1 ml.

➤ Effet interaction temps /dilution sur l'AAO

L'effet interaction temps/dilution des deux extraits de SO et du standard est récapitulé dans le tableau 17 :

**Tableau 16:** Effet interaction temps /dilution sur l'AAO

				AAO			
				Moyenne	Ecart type	Maximum	Minimum
Temps	30min	Dilution	0.1ml	57,00	12,04	78,07	47,76
			0.2ml	56,25	5,08	61,24	47,52
			0.3ml	56,24	22,62	76,40	21,40
			0.4ml	67,56	34,56	90,80	9,91
	45min	Dilution	0.1ml	52,47	9,81	68,53	38,16
			0.2ml	57,24	5,06	63,20	49,78
			0.3ml	61,99	18,01	75,60	32,47
			0.4ml	70,88	28,66	94,40	30,06
	60min	Dilution	0.1ml	55,25	10,31	72,01	40,12
			0.2ml	57,14	8,97	65,20	40,93
			0.3ml	64,62	24,75	86,80	28,08
			0.4ml	69,87	37,15	97,60	18,45

Les résultats relatifs au paramètre interaction (temps/dilution) montrent que la plus importante AAO est enregistrée dans le temps 45min avec la dilution 0,4ml avec une valeur moyenne de 70,88.

### 5.1.2. Valeurs d'IC50

Le pouvoir antioxydant des différents extraits a été déterminé à partir de l'IC50, qui correspond à la concentration, d'extrait méthanolique et aqueux ou d'acide ascorbique nécessaire à l'inhibition de 50% du DPPH présent dans le milieu. Il est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé car une faible valeur d'IC50 indique une forte efficacité antioxydante de l'extrait (Babovic *et al.*, 2010).



À partir des équations des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés ( $y=ax+b$ ) (Annexe 05).

Nous avons déterminés pour chaque extrait la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical libre DPPH ou IC50 (**Bouras et Houchi, 2013**).

Tels que :

$y = 50\%$  (pourcentage de réduction de DPPH).

$x$  : IC50 (la concentration en extrait et de l'acide ascorbique).

Les résultats obtenus d'EC50 des extraits (méthanolique et aqueux) de *Salvia officinalis* et le standard (acide ascorbique) dans les temps 30, 45 et 60 min, sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 17:** La concentration inhibitrice (IC50) d'extrait méthanolique et aqueux de SO et d'ASC

EC50%			
Extraits Temps	Extrait méthanolique	Extrait aqueuse	Acide ascorbique
30min	0,119	0,213	0,113
45min	0,147	0,220	0,106
60min	0,124	0,196	0,104

D'après les résultats présentés dans le tableau19, on note que dans le temps 30 min, l'acide ascorbique capable d'exercer un effet antioxydant plus important avec une EC50% de 0.113 mg /ml. De même pour l'extrait méthanolique qui à exercer un effet antioxydant plus fort proche à celui de l'acide ascorbique estimé par un EC50% de 0.119 mg /ml, mais cette effet est moins importante pour l'extrait aqueux qui est estimé par un EC50% de 0,213 mg /ml.

Par ailleurs, dans le temps 45min les valeurs de l'IC50 des deux extraits méthanolique et aqueux de SO se révélées plus élevées (0,147et 0, 220) respectivement, ce qui indique une AAO moins importante que l'acide ascorbique qui est estimé par une EC50% de 0,106mg /ml. Mais la

comparaison entre les deux extraits montre que l'extrait méthanolique donne la meilleure activité antioxydante.

Tandis que dans le temps 60 min, les deux extraits de SO (méthanolique et aqueuse) possède une activité antiradicalaire avec un IC50% de l'ordre de 0.124 mg/ml et 0.196 mg/ml respectivement. En comparaison avec l'antioxydant standard (ASC) qui démontre une IC50% minimale d'ordre de 0.104 mg /ml. On peut conclure donc que nos extraits sont moins actifs par rapport au standard.

## 5.2 Discussion

Le profil d'activité antioxydante obtenue révèle que l'extrait méthanolique des feuilles de *salvia officinalis* possède une activité antioxydante dépendante de la concentration des extraits, dont l'évolution de cette activité est dose-dépendante pour l'extrait méthanolique et l'inverse pour l'extrait aqueux (non dose-dépendante).

Les résultats de l'effet de différent paramètre étudiés sur le pouvoir antioxydant des deux extraits étudiés montrent que SO présente une AAO inférieure à celle de l'ASC, ces résultats s'accordent avec ceux obtenus par **Montoro et al (2005)**.

**Dimitris et Vassiliki (2006)** et **Soobrattee et al (2005)**, ont montré que l'extrait de SO possède une AAO importante, mais cette AAO est inférieure à celle de l'ASC ; ce qui est conforme nos résultats.

**Martin et al (2015)**, ont réalisé une étude sur l'activité antioxydante des extraits méthanolique et aqueux des feuilles de *S.officinalis*. Ils ont montré que l'extrait méthanolique présente un pouvoir antioxydant supérieur par rapport à l'extrait aqueux mais inférieur à celui de l'acide ascorbique.

La décoction de la *S. officinalis* étudiée par **Ferreira et al. (2006)** a exercé une forte inhibition du radical DPPH en enregistrant un taux de 80% à la concentration de 0,1 mg/ml. De même, **Raoui et Zellagui (2014)** a trouvé un pourcentage de 90 % pour la concentration de 1mg/ml d'extrait de feuilles de SO, sont des pourcentages différents de ceux trouvés dans la présente étude. Cela est dû probablement à la différente méthode d'extraction utilisée.

D'une manière générale, les deux extraits présentent un pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• inférieur à celle de l'acide ascorbique et l'extrait méthanolique avec une prédominance de l'extrait aqueux. Ce constat s'est confirmé par les valeurs d'IC50.

Les travaux réalisés par **Ferid et al. (2012)**, ont montré que l'extrait méthanolique de *S. officinalis* possède une IC50% de 0,278 mg/ml, qui est plus élevé par rapport à nos résultats.

**Natàlia et al. (2015)**, ont trouvé une IC50 égale à 75,53 µg/mL pour l'extrait aqueux et IC50 égale à 32,97 µg/mL pour l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *S. officinalis* récoltée de l'Espagne. De leurs côtés **Albano et Miguel (2011)** ont montré que l'extrait hydroéthanolique de *S. officinalis* du Portugal possédaient une bonne efficacité à piéger le radical DPPH (avec de IC50 de 2,8 µg/ml), Ces résultats sont différent aux ceux obtenus dans notre étude. Cette différence peut être due à la nature des solvants et la zone géographique.

## 6. Activité anticoagulante

Pour rechercher un allongement au niveau du temps de coagulation on testant le pouvoir d'activité anticoagulante de nos extraits méthanoliques et aqueux de *salvia officinalis* par l'évaluation in vitro vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chromométriques, le TCK et le TQ respectivement.

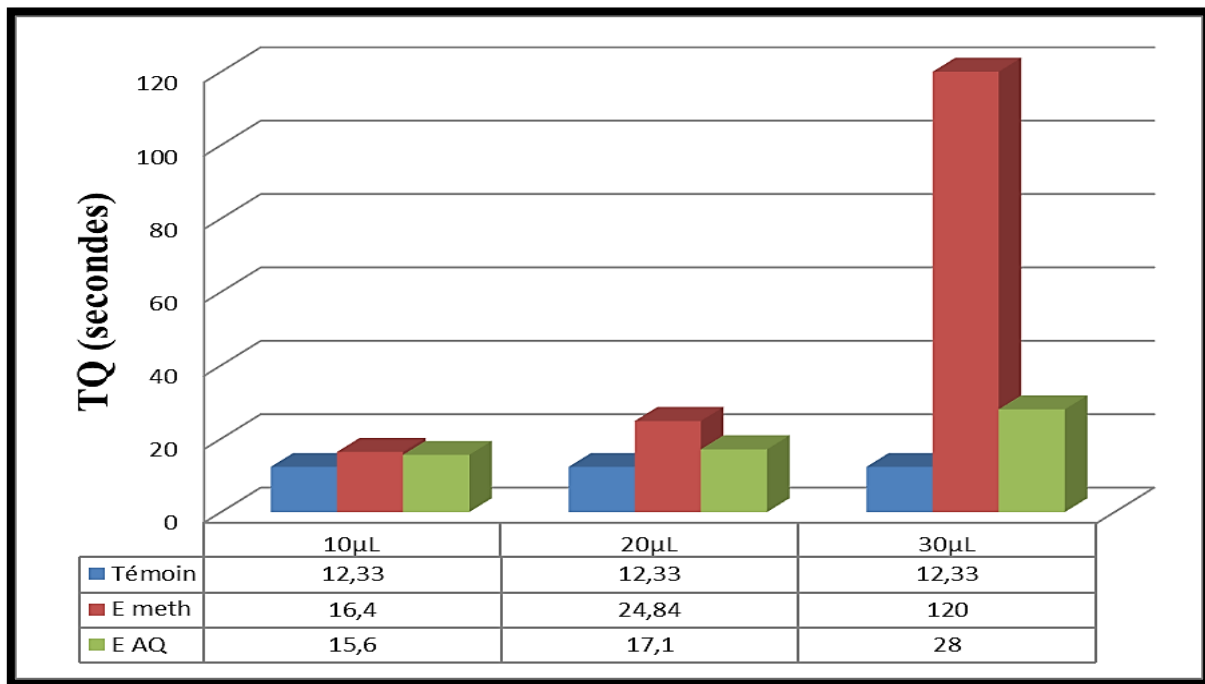
### 6.1. Résultats

#### 6.1.1. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

Le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) est le test qui permet d'explorer globalement la voie exogène de la coagulation où le facteur tissulaire est le déclencheur de cette voie (**Tripodi, 2007**). Le TQ normal est compris entre 12 et 14 secondes selon les réactifs utilisés (**Caquet, 2004**) et un allongement par rapport à un témoin de TQ de 12,33s traduit une activité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de *salvia officinalis* vis-à-vis de la voie extrinsèque de la coagulation.

Dans un premier temps, différent volumes (10, 20,30µL) des extraits méthanoliques et aqueux de SO ont été incubée pendant 15 min avec le pool de plasma à fin de déterminer le volume optimal pour obtenir une activité anticoagulante vis-à-vis à la voie exogène élevée.

D'après les résultats obtenus, il ressort que les deux extraits (méthanolique et aqueux) de So exercent une activité anticoagulante positivement corrélée avec le volume des extraits vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation et avec un pouvoir différent (Figure 58).



**Figure 58:** Capacité anticoagulante des deux extraits méthanolique et aqueux de *S officinalis* vis-à-vis de la voie exogène.

La comparaison des temps de coagulation TQ des différents volumes (10, 20, 30µL) de nos extraits méthanolique et aqueux de SO montre que:

Le volume 10µl présente une activité anticoagulante importante avec un TQ de 16.4 S par un allongement de 4,07s pour l'extrait méthanolique, tandis que l'extrait aqueux dans le même volume donne une valeur moins importante avec un TQ de 15.6 par un allongement de 3,27s.

Par ailleurs, le volume 20µL présente une activité anticoagulant, exprimé par une valeur très élevée de TQ de l'ordre de 24.84s avec un allongement de 12.51s pour l'extrait méthanolique et un TQ moins important pour l'extrait aqueux de 17.1s avec un allongement de 4.77s.

De même pour le volume 30µL de l'extrait méthanolique qui à exercer un effet anticoagulant très élevé (incoagulable), estimé par un TQ de 120s avec un allongement de 107.67s, cette effet est moins importante pour l'extrait aqueux qui est estimé par un TQ de 28s avec un allongement de 15,67s.

### 6.1.2. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

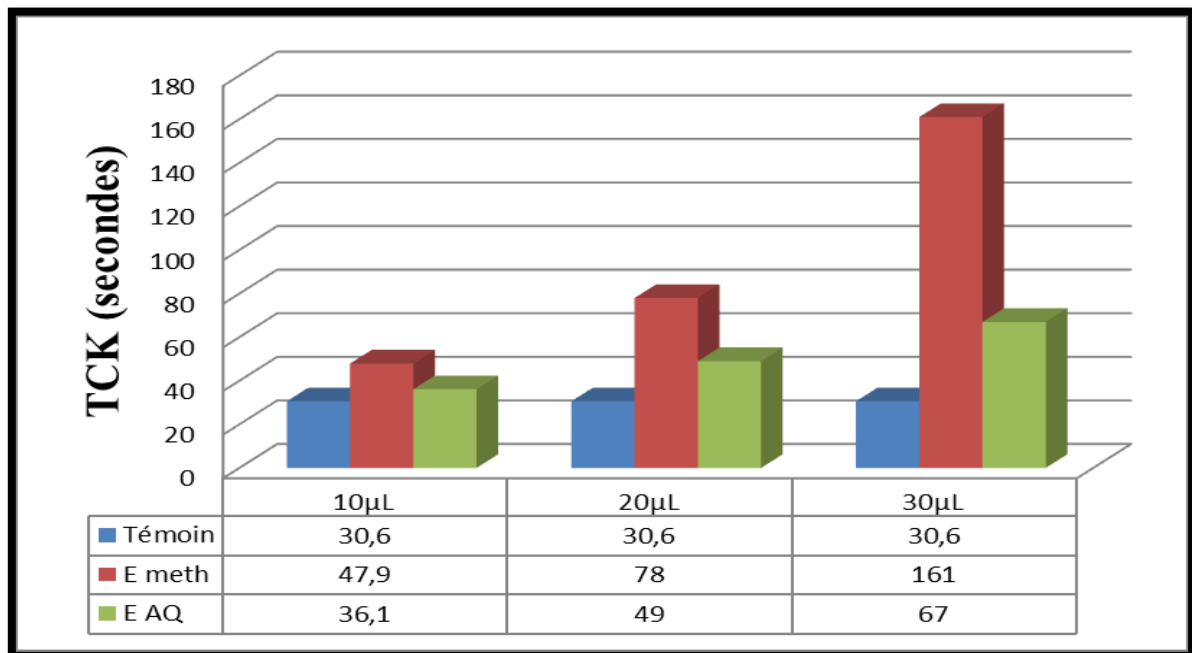
Les résultats de la capacité anticoagulante de nos extraits méthanolique et aqueux de *salvia officinalis* vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation, réalisée à l'aide du test de temps de céphaline-Kaolin (TCK).

Dans ce teste, l'activation de la voie endogène est effectué par le contacte entre le facteur XII et la surface électronégative de l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif in vivo).

Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquence l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (facteur II).

Un temps de coagulation (TCK) allongé par rapport à un témoin de TCK de 30.6s, l'intervalle normal de référence est en général situé entre 30 à 34 secondes selon le réactif utilisé (Athukorala, *et al.*, 2007).

Les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis à la voie endogène des extraits méthanoliques et aqueux de sauge sont représentés dans la Figure (59).



**Figure 59:** Capacité anticoagulante des deux extraits méthanolique et aqueux de *S officinalis* vis-à-vis de la voie endogène.

L'analyse de ces résultats a révélé que les extraits méthanolique et aqueux de SO exercent une activité anticoagulante positivement corrélée avec le volume d'extrait vis-à-vis de la voie endogène (TCK).

Par comparaison des temps de coagulation (TCK) sous influence de différents volumes (10 ; 20 ; 30 $\mu$ L) des extraits méthanolique et aqueux de SO, il ressort que le volume 10 $\mu$ L est capable d'exercer une activité anticoagulante pour l'extrait aqueux est estimé par un TCK de 36,1s par un allongement de 5.5 s, cette effet est moins importante pour l'extrait méthanolique qui est estimé par un TCK de 47.9s par un allongement de 17.3 s (Figure).

Pour le volume 20 $\mu$ L l'extrait méthanolique de SO semble capable d'allonger le temps de coagulation avec des valeurs très élevées de l'ordre de 47.4s avec un TCK de 78s, alors que, l'extrait aqueux a enregistré dans le même volume une valeur moins importante de 18.4s par un TCK de 49s.

Le temps de coagulation le plus élevé pour le test du TCK est obtenu par le volume 30 $\mu$ L, ce dernier est capable d'allonger le temps de coagulation avec des valeurs de l'ordre de 36.4s avec un TCK de 67s pour l'extrait aqueux et des valeurs plus importantes pour l'extrait méthanolique avec un allongement très élevé de 130.4s par un TCK de 161s.

Globalement, l'évaluation de la capacité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de *salvia officinalis* établi par les deux tests chronométriques d'exploration de la coagulation, le TCK et le TQ démontre que ces extraits exercent une activité anticoagulante importante vis-à-vis des deux voies de la coagulation, mais cette activité est plus marquée par l'extrait méthanolique que par l'extrait aqueux et que les constituants qui possèdent des groupements fonctionnels, particulièrement les monoterpènes phénoliques peuvent être les composés responsables de cette activité anticoagulante.

## 6.2. Discussion

Malgré qu'il existe de plusieurs projets de recherche axés sur l'activité anticoagulante de divers extraits végétaux, cette activité n'a pas été étudié pour les extraits polyphénoliques de *salvia officinalis*, de ce fait le sujet de ce mémoire est considéré comme étant le premier de son genre qui s'inscrit dans le cadre des études intéressées à la prévention et la thérapie des maladies thrombotiques, et pour cela, il n'y a pas d'investigations pour comparer nos résultats.

Les résultats de notre travail montre que les polyphénols de SO capable d'allonger le temps de coagulation, on peut de faire une petite comparaison avec les autre travaux qui réalise sur différent plantes médicinales parmi laquelle :

Les études récentes réalisées par **Lemaoui (2011)** concernant l'évaluation de l' activité anticoagulante in vitro des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa* L a montré que ces huiles riches en polyphénols peuvent provoquer un prolongement au niveau du temps de coagulation ces études confirment notre résultats vue de la richesse de notre plante en polyphénols.

Selon **Vaes L.P.J et Chyka P.A. (2000)** l'extrait aqueux de Zingiber officinale ajouté dans différents volumes (10,25, 30, et 100 µL) à des échantillons de plasma d'individus normaux, peut donner une prolongation des temps de prothrombine de manière 15,8, 47,5, 110,20 et 281 secondes respectivement, et pour l'extrait méthanolique ces résultats corrobore aux résultats a menés par **Newall C.A., et al (1996)** et avec les résultats corrobore aux ceux obtenus par **Jellin J., et al (2002)**.

Une étude récente réalisée par **Bijak et al (2011)** concernant l'évaluation de l' activité anticoagulante in vitro des extraits d'une plante *Aronia melanocarpa* et les graines de raisin (*Vitis vinifera*) a montré que ces deux extraits riches en polyphénols peuvent provoquer un prolongement au niveau du temps de coagulation, de ce fait l'étude donne espoir pour le développement des suppléments alimentaires qui contribuent à la prévention des thromboses.

Toutefois, il faut signaler qu'il y avait d'autres composés doués aussi de l'activité anticoagulante, tels que les polysaccharides (**Yoon et al.,2002; Pawlaczyk et al.,2009**), les glycoprotéines, et les polyphénols (Pawlaczyk et al., 2011) notamment les coumarines (**Zhou et al.,2009**) et quelques tannins (**Bae, JS, 2011**).

## 7. Activité antibactérienne

### 7.1. Résultats

L'activité antibactérienne des deux extraits méthanolique et aqueux de *S officinalis* contre les bactéries testées (*Escherichia coli*, *Klebsilla pneumoniae* ,*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ) est expérimentée par la méthode de diffusion sur disque. Leur potentiel antibactérien est évalué par la mesure du diamètre des zones d'inhibition et la détermination des valeurs de CMI.

### II.7.1.1. Résultats de l'effet antibactérien des antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme effectué afin de connaître le comportement des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques: la gentamicine (CN10) et le cotrimoxazol (SXT25) comme témoin positive, sont représentés dans le Tableau 20 et la Figure 60.

**Tableau 18** : Activité antibactérienne des antibiotiques vis-à-vis des souches étudiées.

Souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)	
	Gentamicine (CN10)	Cotrimoxazol (SXT25)
<i>Escherichia coli</i>	30,83	16,86
<i>Klebsilla pneumoniae</i>	10,25	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	36,40	33,37
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,33	14,55

D'après les résultats obtenus. On constate une variabilité dans la réponse des souches étudiées (*Escherichia coli*, *klebsilla Pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) vis-à-vis des deux antibiotiques testés.

Concernant les souches à gram négatif, *E. coli* est extrêmement sensible à gentamicine (CN10) avec un diamètre de zone d'inhibition de 31.33mm, alors qu'elle est très sensible à la Cotrimoxazol (SXT25) avec un diamètre de 16,86 mm.

*K. pneumoniae* est sensible vis-à-vis de CN10 avec un diamètre de zone d'inhibition de 10,25 mm, alors qu'elle est s'avéré à l'antibiotique SXT25, c'est -à-dire ce dernier n'a pas pu inhiber la croissance de cette bactérie.

Pour les bactéries à gram positif, *E. faecalis* est extrêmement sensible aux antibiotique CN10 et SXT25 avec un diamètre de zone d'inhibition de 36,40 et 33,37 mm respectivement.

*S.aureus* est extrêmement sensible à CN10 avec un diamètre de zone d'inhibition de 30,83 mm, alors qu'elle est s'avérée très sensible à SXT25 avec un diamètre de 14.55 mm.



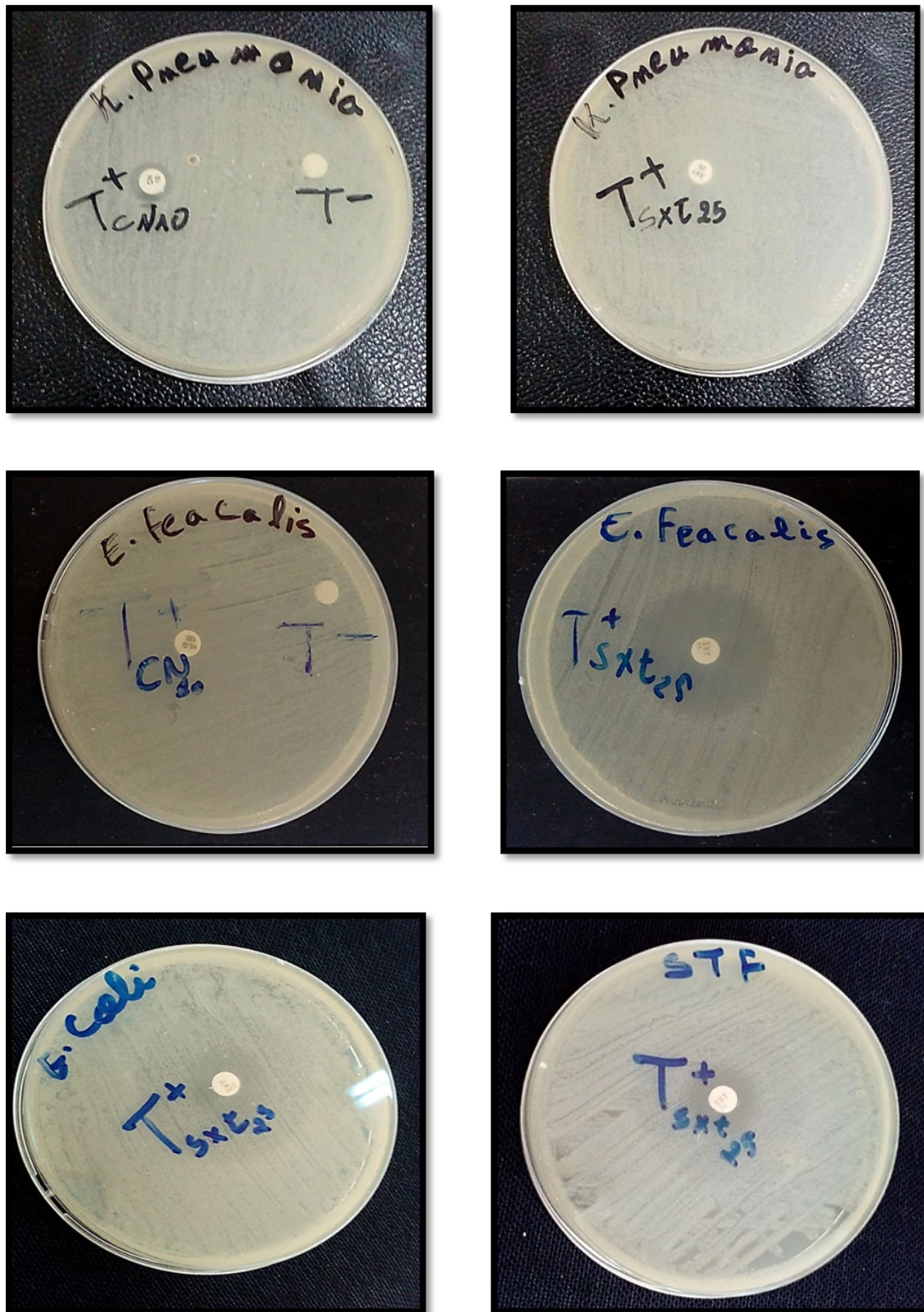


Figure 60 : Diamètre des zones d'inhibition des deux antibiotiques testés et de témoins négatif.

La sensibilité de souche *E. faecalis* aux deux antibiotiques testés a donné un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 36,40 mm pour CN10 et de 33,37 mm pour SXT25. suivi par *E. coli* avec un diamètre de zone

d'inhibition de 31.33 mm pour CN10 , et de 16.86 mm pour SXT25, et *S. aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 30,83 mm pour CN10, et de 14.55 mm pour SXT25 , et enfin *K. pneumoniae* donne un diamètre de zone d'inhibition de 10, 25 mm avec CN10 mais aucune effet n'a été enregistré avec SXT25.(Figure 61) (Annexe 06).

### 7.1.2. Résultats de l'activité antibactérienne des deux extraits bruts (méthanolique et aqueux) et de leurs dilutions

La variation de la sensibilité bactérienne vis-à-vis de l'extrait méthanolique et aqueux de SO est confirmée par l'existence des différences dans les diamètres d'inhibition aux diverses concentrations d'extraits comme l'indique le tableau ci-dessous.

**Tableau 19:** Diamètres des zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait méthanolique et aqueux de SO.

Souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)							
	extrait méthanolique				extrait aqueux			
	1/1 (1000µl/µl)	1/2 (500 µl/µl)	1/4 (250 µl/µl)	1/8 (125 µl/µl)	1/1 (1000µl/µl)	1/2 (500 µl/µl)	1/4 (250 µl/µl)	1/8 (125 µl/µl)
<i>E coli</i>	11,55±0,15	9,89±0,12	8,18±0,48	8,13±0,72	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>K pneumoniae</i>	7,5±0,87	7,18±0,74	7,07±0,11	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>E faecalis</i>	10,14±2,46	9,69±2,47	8,43±0,88	7,67±1,18	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>S aureus</i>	22,24±0,62	21,01±0,97	19,84±1,30	17,62±0,86	6±0	6±0	6±0	6±0

D'après le **tableau 21** et la **Figure 62**, il ressort que les résultats de l'activité antibactérienne des deux extraits (méthanolique et aqueux) de *S officinalis*, testés par quatre dilutions différentes (1/1, 1/2, 1/4 et 1/8), montrent que l'activité de l'extrait méthanolique varie en fonction de la souche bactérienne et la dose employée. Par contre, l'extrait aqueux n'a présenté aucune activité vis-à-vis des quatre souches bactériennes testées, que soit à partir de l'extrait brut ou à partir des différentes dilutions.

D'après ce tableau, on note que l'extrait méthanolique brut présente une importante activité antibactérienne vis-à-vis de *S aureus*, *E coli* et *E faecalis*, avec des diamètres de

22,24±0,62, 11,55±0,15 et de 10,14±2,46 mm, respectivement. Tandis que la souche *K pneumoniae* se révèle plus résistante vis-à-vis de cet extrait méthanolique avec un diamètre de 7,5±0,87 mm.

Les résultats obtenus indiquent que *S aureus* a été le micro-organisme le plus sensible avec la dilution (1/2) de l'extrait méthanolique de SO. Une zone d'inhibition de 21,01±0,97 mm a été mesurée pour ce germe, suivie par *E coli* et *E faecalis* avec des zones d'inhibition de 9,89±0,12 et 9,69±2,47 mm respectivement. Une faible zone d'inhibition a été observée (7,18±0,74 mm) à l'encontre de *K pneumoniae*.

Pour la dilution (1/4), l'effet le plus élevé de l'extrait méthanolique est ceci appliqué sur *S aureus* qui est traduit par une zone d'inhibition de 19,84±1,30 mm, suivi par *E faecalis* et *E coli* avec des zones d'inhibition de 8,43±0,88 et 8,18±0,48 mm respectivement. Un diamètre de 7,07±0,11mm obtenu avec *K pneumoniae* par la même concentration symbolise l'effet le plus bas.

D'autre part, la plus faible dilution testée (1/8) de l'extrait méthanolique de SO, n'a présenté aucun effet sur la bactérie *K pneumoniae*. Alors que nous remarquons l'absence de la croissance bactérienne de la souche *S aureus* dans cette dilution qui est estimée par une zone d'inhibition de 17,62±0,86, les résultats enregistrés pour les souches *E coli* et *E faecalis*, montrent que ces souches sont révélés moins sensibles avec à l'extrait méthanolique (dilution 1/8) avec des diamètres des zones d'inhibition sont respectivement de 8,13±0,72 et 7,67±1,18 mm.

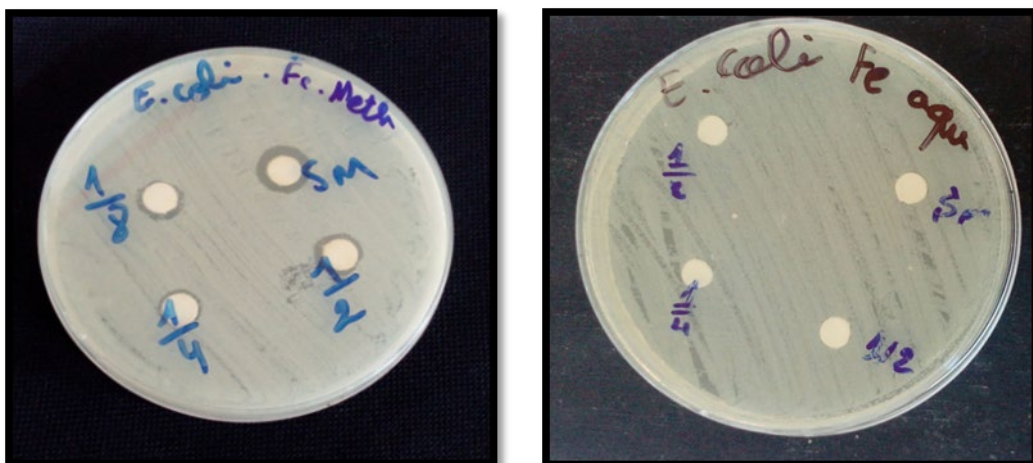




Figure 62 : Effet des extraits méthanolique et aqueux de SO sur les bactéries étudiées.

En général, l'extrait méthanolique de SO possède une activité antibactérienne avec un pouvoir inversement proportionnel à la dilution. Alors que l'extrait aqueux n'a présenté aucun pouvoir antibactérien vis-à-vis de souches bactériennes. (Figure 63) et (Figure 64) (Annexe 06).

### 7.1.3. Détermination de la CMI

D'après les résultats obtenus, il ressort que L'extrait aqueux n'a aucune activité antibactérienne, et pour cela, il n'y a pas d'investigations pour déterminer la CMI, tandis que la CMI de l'extrait méthanolique a été déterminé à partir d'une gamme de dilution et notée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 20** : Valeurs des concentrations minimales inhibitrices de l'extrait méthanolique de SO

Souches	Extrait méthanolique	
	Concentration minimale d'inhibition ( $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ )	Zone d'inhibition (mm)
<i>E coli</i>	125	8,13 $\pm$ 0,72
<i>K pneumoniae</i>	250	7,07 $\pm$ 0,11
<i>E faecalis</i>	125	7,67 $\pm$ 1,18
<i>S aureus</i>	125	17,62 $\pm$ 0,86

A partir des résultats de Concentration minimale d'inhibition, de l'extrait méthanolique de SO, nous avons remarqué que la valeur CMI la plus faible qui est égale à 125  $\mu\text{l}/\mu\text{l}$  est enregistrée avec les souches *S aureus*, *E coli* et *E.faecalis* avec des zones d'inhibition de 17,62 $\pm$ 0,86, 8,13 $\pm$ 0,72 et 7,67 $\pm$ 1,18 mm respectivement. Tandis que, *K. pneumoniae* était la plus résistante, l'ibhibition de sa croissance est achevée avec une concentration minimale inhibitrice de 250 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$  ce qui correspond à 7,07 $\pm$ 0,11mm.

## 7.2. Discussion

Plusieurs études ont suggéré la forte efficacité antibactérienne d'une large gamme d'extraits de la famille des lamiacées (**Baratta et al., 1998 ; Hammer et al., 1999 ; YesilCeliktas et al., 2007; Cowan, 1999**). De ce fait, ce test a été réalisé pour étudier l'effet antibactérien des extraits d'une lamiacée (*Salvia officinalis*).

Selon **Balouri (2011)**, l'extrait méthanolique de *S. officinalis* était actif sur les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*). Alors que, dans l'étude menée par **Gulcin et al., (2004)**, l'extrait aqueux de *Salvia officinalis* n'as pas pu d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes à Gram négatif. Ces résultat s'accord avec nos résultats. L'étude réalisée par **Weckesser et al., (2007)** montre que l'extrait d'alcool isopropyl de *S. officinalis* a

exercé une faible activité vis à- vis de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, , *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*.

De plus, **Hayouni et al. (2007)** ont montré que la méthode d'extraction et la nature du solvant peuvent influencer l'activité antibactérienne des composés phénoliques des plantes.

D'après (**Dordevic et al .,2007**), la zone d'inhibition augmente considérablement avec la concentration des extraits. Cela confirme nos résultats.

Selon **Cowan (1999)**. Les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes.



***Conclusion et perspectives***

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Le présent travail est consacré à l'étude de l'activité antioxydant, anticoagulante et antibactérienne des extraits méthanolique et aqueux des feuilles du *salvia officinalis*.

L'analyse qualitative des extraits, réalisée à l'aide des tests phytochimique,, a révélé la présence de plusieurs familles de composés naturelles dans notre plante à savoir les polyphénols, flavonoïdes, saponosides, glycosides, tanins, coumarines, alcaloïdes, stérols et triterpènes .

La détermination du rendement en extraits a montré que les rendements d'extractions varient en fonction du solvant utilisé. Les bons résultats sont enregistrés avec l'extrait méthanolique brut avec un pourcentage de 29.76% .cependant l'extrait aqueux enregistre un pourcentage de 16.54 %.

L'analyse quantitative des polyphénols, par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé la présence des quantités importantes en polyphénols dans les deux extraits méthanolique et aqueux de *S officinalis*. L'extrait méthanolique, présente une teneur en polyphénols totaux plus importante ( $30.378 \pm 0.0467$  mgEAG/g) . Tandis que l'extrait aqueux a donné une teneur moins importante en polyphénols égale à ( $19.896 \pm 0,1176$  mgEAG/g).

L'étude du pouvoir antioxydant in vitro, utilisant le radical DPPH , révèle que *S. officinalis* possède de bonne activité antioxydante particulièrement pour l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux .Une concentration d'inhibition (IC50) de 0.119 mg /ml a été enregistrée. Cette activité antioxydante est dépendante du contenu en principes actifs.

L'évaluation de l'activité anticoagulante des extraits polyphénoliques de *S.officinalis* vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TQ et le TCK respectivement, démontre que ces extraits exercent une activité anticoagulante importante pour les deux voies de coagulation.

L'activité antibactérienne des extraits méthanolique et aqueux de feuilles de la sauge vis-à-vis d'une gamme de quatre bactéries pathogènes, est réalisée en appliquant la méthode de diffusion sur disque. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanolique a manifesté une activité inhibitrice contre les souches testé. Seul *Klebsilla pneumoniae* a montré une résistance. Tandis que l'extrait aqueux ne présente aucun effet sur la croissance des souches



bactériennes. Mais cette activité reste très faible comparativement avec celle des antibiotiques testés.

En définitive, on peut affirmer que les feuilles de *Salvia officinalis* possèdent des molécules bioactives douées de propriétés thérapeutiques telles qu'antioxydant, anticoagulante et antibactérienne. Toutefois, ce travail reste préliminaire et nécessite des études complémentaires approfondies. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Evaluation *in vivo* des activités anticoagulante et antiplaquettaires des extraits phénoliques de SO.
- Application des tests spécifiques pour l'estimation de l'activité anticoagulante par ciblage des facteurs clés de la coagulation : FII(thrombine) et FX(prothrombine).
- Etude des activités antimicrobiennes de ces composés sur d'autres souches microbiennes.
- Une analyse par HPLC permettra de connaître la composition chimique ainsi que les principes actifs de cette plante.
- Vérification de la toxicité des extraits de cette plante dans des modèles *in vivo*.



*Références bibliographiques*

« A »

**Abderrazak M. & Joël R., 2007.** La botanique de A à Z. Ed. Dunod, Paris. 177 p.

**Achat S. (2005).** Etude des interactions protéines-polyphénols. Etude de cas *Salvia officinalis* avec la protéine sérumalbumine bovine. Mémoire de magister, 67p.

**Aganga, A.A., Mosase, K.W. (2001).** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphium mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds, *Animal Feed Science and Technology*. 91, p.107- 113.

**AKROUM S. (2010).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat : Université MENTOURI de CONSTANTINE-ALGERIE.

Albano, S.M., et Miguel, M.G. (2001). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33, 338-343.

**Ali-Shtayeh, MS., Yaghmour, RM-R., Faidi, YR., Salem, K., Al-Nuri, MA. 1998.** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of ethnopharmacology*, 60, 265-271.

**Al-Mamary M., Al-Meeri A. and Al-Haboui M. (2002)** - antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. 22: 1041-1047.

**Al-Zoreky N.S. (2009).** Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134:244–248.

**Amin T. A. et Hamza A. A. (2005).** Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences*, 77, 266 - 278.

**André R. (1998)** – La maladie de parkinson. Ed. Masson. 16-19.

Antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum L.*, a North African endemic

**Atawodi S.E. (2005)** – Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 4 (2): 128-133.

Athukorala Y, Lee KW, Kim SK, Jeon YJ. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology* 2007; 98: 1711–1716.

**Athukorala, Y., Lee, KW., Kim, SK., Jeon, Y.J. (2007).** Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*, 98: 1711–1716.

« **B** »

**Baba Aissa F., (2000).** Encyclopédie des plantes utiles. « Flore d'Algérie et du Maghreb ». Ed : Librairie moderne Rouiba , 252. – 253 .

**Babovic N., Djilas S., Jadranin M., Vajs V., Ivanovic J., Petrovic S., Zizovic I. (2010):** Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*,11: 98–107.

**Bae, J-S . (2011).**Antithrombotic and profibrinolytic activities of phloroglucinol. *Food and Chemical Toxicology*, 49:1572–1577.

**Bailly F., Queffelec C., Mbemba G., Mouscadet J. F. et Cotelle P. (2005).** Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from *Salvia officinalis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15, 5053 - 5056.

**Bailly F., Queffelec C., Mbemba G., Mouscadet J. F. et Cotelle P. (2005).** Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from *Salvia officinalis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15, 5053 - 5056.

**Baratta M. T., Dorman H. J. D., Deans S. G., Biondi D. M &Ruberto G.(1998):** Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *J. Ess. Oil. Res.*, 10: 618–627.

**Baskan S., Oztekin N. et Erim B. (2007).** Determination of carnosic acid and rosmarinic acids in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 101, 1748 - 1752.

Batty P, Smith G. Anticoagulation. *Surgery* 2010; 28(6): 243-247.

**Bauersachs R, Berkowitz SD, Brenner B, Buller HR, Decousus H, et al.** Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 23 déc2010;363(26):2499-510.

**Beckman K. B. and Ames B. N. (1998)** – The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* (78): 574-581.

**Bekheche.CH. ;Abdelouahid.D.:**Les huiles essentielles,Ed,Office des publicationsuniversitaires,p14,17,18,(2012).

**Békro Y.A., Békroj A.M., Bouab.B., Trab F.H. and Ehilé E.E.2007** :Etude ethnobotanique et Screnning phytochimique de *Caesalpinia benthiana*. (Bai) Herend et Zarucchi (caesalpiniaaceae). *Rev. Sci. Nat*, 4 (2),p217-225

**Belhattab R., Larous L., Kalantzakis G., Bouskou D. and Exarchou V. (2004).** Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *Food, Agricul. & Envir* 2: 63-69.

**Beloued,A. (2005).** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, Alger. P:184,196,206.

**Beloued,A. (2005).** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, Alger. P:184,196,206.

**Ben Haj Khalifa.A et Khedher. M. 2010.** Epidémiologie des souches de *Klebsiella* spp.uropathogènes productrices de B-lactamases à spectre élargi dans un hopital universitaire Tunisien.pathologie Biologie 60(2012) e1-e5.

**Benslama. 2016.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. Vol. (51): 304-315.

**Bezanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. et Trotin F. (1990).** Plantes médicinales des régions tempérées. Ed: MALOINE, Paris, 2, pp 297 - 362.

**Bezeaud A, Guillin M-C.** Physiologie de la coagulation. EMC - Hématologie 2001:1-7

**Bezeaud A, Guillin M-C.** Physiologie de la coagulation. EMC - Hématologie 2001:1-7

**Bhar. H., BALOUK. A.,** Les Plantes aromatiques et médicinales, le Centre de Recherche Forestière et l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, Maroc, 27p, 2011.

**Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M., Podsędek, A., Golański, J., Nowak, P.(2011).** Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia*,82 (6): 811-817.

**Boisseau M.R, 1996.** Données actuelles sur l'hémostase. *Phlébologie*, 42 (2) ,p175 –186.

**Bors W., Michel C., Stettmaier K., Lu Y. et Foo L. Y. (2003).** Pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance spectroscopy and theoretical calculations of caffeic acid oligomer radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620, 97 - 107.

**Bors W., Michel C., Stettmaier K., Lu Y. et Foo L. Y. (2003).** Pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance spectroscopy and theoretical calculations of caffeic acid oligomer radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620, 97 - 107.

**Botelho-Nevers E., Gouriet F., Lepidi H., Couvret A., Amphoux B., Dessi P., Raoult D. 2007.**Chronic nasal infection caused by *Klebsiella rhinoscleromatis* or *Klebsiella ozaenae*: two forgotten infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases* (2007) 11, 423-429.

**BOUDET A. M. 2007.** Evolution and current status of research in phenolic Compounds, *Phytochemistry*, 68(22-24): 2722-2735.

**Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G. (2013).** Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology* 148,395-402.

**Bouhadjra k. (2011) :** étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

**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.

**BOUHDJERA. K.,** Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales Sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L, Thèse de Doctorat en Chimie Organique Appliquée, à l'Université Abou Bekr Belkaid, 2005, 149p.

**Bouheroum M. 2007.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherim adpressum* et *Ononis anafustissima*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine.

**Boulekbache-Makhlouf L., Slimani S et Madani K.(2013).** Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 41: 85– 89.

**Bounihi, A.,** Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées), Thèse de Doctorat, à l'Université Vmouhamed v, 2015, 75p

**Bouras.F ; Houchi.A.2013:** Etude de l'activité Antioxydante de La Plantes *Rumex Vesicarius* L. Mémoire Master Académique, P28.

**Boutabet K. 2007.** Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. Thèse de Magistère de l'université de Jijel.

**Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gray K., Horn E, McAnalley S. et McAnalley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition* 4, 7p.

**Bravo L., 1998.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56(11): 317-333.

**Brisse S., Duijkeren E V. 2004.** Identification and antimicrobial susceptibility of 100 Klebsiella animal clinical isolates. *Veterinary Microbiology* 105(2005) 307-312.

**Bruneton J .:**Pharmacognosie,phytochimie,plantesmédicinales,Ed,Tec&Doc, paris,p487-488,(1999).

**Bruneton.J, 1999 :** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales, Lavoisier Tec &Doc. Paris. 3Ed.

**Bruneton.J.(2009).**pharmacognosie :Phytochimie,plantes médicinales.4éme éd.Paris,Tec et Doc-Editions médicibales internationales.Lavoisier,1288p.

**Bryskier A. 1999.** Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques. Paris: Ellipses. p55.Burda et Oleszek, 2001).



**Caen J, Lrrieu MJ, Samama M.** L'hémostase : méthodes d'exploration et diagnostic pratique (2éme Ed), Expansion Scientifique Francaise (Paris) 1975; pp : 15-20.

**Capek P. et Hribalová V. (2004).**Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry*, 65, 1983 - 1992.

**Capek P. et Hribalová V. (2004).**Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry*, 65, 1983 - 1992.

**Capek P., Hribalová V., Švandová E., Ebringerová A., Sasinková V. et Masarová J. (2003).** Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33, 113 - 119.

**Caquet R.** 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation (9éme Ed), Masson (Paris) 2004; pp:388-389.

**Caquet R.** 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation (9éme Ed), Masson (Paris) 2004; pp:388-389.

**CASFM :** comite de l'antibiogramme de la societe francaise de microbiologie. Recommandations 2012. Consulter le 17/06/2013 sur: <http://www.sfm-microbiologie.org/>

**Catier.O . ;Roux.D. :**Botanique Pharmacognosie Phytothérapie ,3émeédition,Wolters Kluwer, p74, (2007).

- Cavallo JD., 2007.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- Cazes J. 2001.** Encyclopedia of Chromatography (Print). Edition Marcel Dekker, p 206.
- Cazzavaca R., Lanzetta D. et Leo D. V. (1999).** Treatment of neurovegetative menopausal symptoms with a phytotherapeutic agent. *Minerva Ginecologica*, 50, 5, 207 - 112.
- Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., and Kim J.M. (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. 39:756-761.
- Codine P, Kotzki N, Pélissier J.** Coagulation, thrombose et médecine physique : Thème des XXXIIIes Entretiens de médecine physique et de réadaptation, Montpellier, 3 mars 2005. Paris, France: Masson; 2005. 114 p.
- Colette K-D ., (2004).** Les plantes médicinales. ALS Collin S. et Crouzet J. 2011. Polyphénols et procédés. Edition Lavoisier TEC & DOC. p 5, 13, 16, 235.
- Colvin BT.** Physiology of haemostasis. *Vox Sanguinis* 2004; 87(Suppl. 1): S43–S46.
- Cosio M.S., Buratti S., Mannino S., et Benedetti S. 2006.** Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food chemistry.*, 97 : 725-731.
- Cowan M. M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 564–582.
- Cowan M. M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 564–582.
- Crozier . 2006.** the natural coumarins Occurrence Chemistry and Biochemistry. Ed. Chichester John Wiley and Sons, UK. New York. England. 702 p.
- Curtay J.P. et Robin J.M. (2000)** – intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info.* Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie.



- Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs: 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta. Paris.
- De Leiris J. (2003).** Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism*. 19: 40-44.



**Defraigne. J.O, Pincemail. J. (2008).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. RMLG Rev. Médicale, 63, 10–19.

**Diallo D.(2000):**Ethno pharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them : *Glinus oppositifolius* (Azoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada Africana* (Mimosaceae), *Trichilia aemetic* (Meliaceae)” Thèse de doctorat de recherche, Faculté des sciences de l’Université de Lausanne Suisse.

**Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P .(2012).** Utilisation des composés de feuilles d’olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. Revue « Nature et Technologie », (07). 53 – 61.

**Djerroumi A. et Nacef M. (2004).** 100 plantes médicinales d’Algérie. Ed: Palais du livre, p 28, 83, 91, 126, 131.

**Djerroumi A., et Nacef M. 2004.** 100 plantes médicinales d’Algérie. Ed Palais du livre. P 135 - 131.

**Dohou.N ;Yani.K ; Thahrouch.S ; Idrissi Hassani.L.M ; Badoc.A ; Gmira.N .2003** :Screening phytochimique d’une endémique ibéro- Marocaine; *Thynelaealythroïdes*. Bull.Soc, Pharm. Bordeaux.142:61-78.

## « E »

**Eberhard T, Robert A, Annelise L. (2005).** Plantes aromatiques, épices aromatisées, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France.

**Ebringerova A., Kardosova A., Hromadkova Z. et Hribalova V. (2003).** Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*, 74, 52 - 61.

**Effendi L., Yajun Y. et al., (2008).** Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli* .*Metab.Eng.*8: 172-181.

**Eidi M., Eidi A. et Zamanizadeh H. (2005).** Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 310 - 313.

**El amri Jalila., Elbadaoui Khalid., ZairTouria, bouharbHayate., chakir Saïd & Alaoui Taj Imolk. (2014)** : Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silene vulgaris* sur différentes souches testées, *Journal of Applied Biosciences.*,82:7481– 7492.

**EL fertas-aissani, R., Messai, Y., alouache, S., Bakour, R. (2012).** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *PATBIO* : 30-48.

**El Gharras H., 2009.** Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44(12): 2512-2518.

**El Gharras H., 2009.** Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44(12): 2512-2518.

## « F »

**Faure S. 2009.** Transfert d'un gène de résistance aux B-lactamines bla.CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie, Equipe d'accueil : unité Pharmacocinétique-Pharmacodynamie, AFSA Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé.

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

**Ferid, L., Ibtissem, H.S., Fatma, Z.R., Iness, B.R., Brahim, M. (2012).** Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants as Affected by Different Drying Methods. *Food Bioprocess Technol.*, 6, 806-817.

**Fernandez S., Olendzki B, Rosal MC.** A dietary behaviors measure for use with low-income, Spanish-speaking Caribbean Latinos with type 2 diabetes: the Latino Dietary Behaviors Questionnaire. *J Am Diet Assoc.* 2011; 111(4):589-99

**Ferreira A., Proenc C. , Serralheiro M.L.M., AraujoM.E.M. (2006):** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology.* 108: 31–37.

**Fontaine E., Barnoud D., Schwebel C. et Leverve X. (2002)** – Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS. 11 : 411- 420.

**François S., 2000.** Les antibiotiques : Respecter les bonnes pratiques. Hygiène en milieu hospitalier.30 :8-13.

**Fransworth N., Akerele O., Binget A.S., Soejarto D.D et Guoz., 1986** - Place des plantes médicinales dans la thérapeutique .Bulletin de l'organisation mondiale de la santé . 64(2):159-164.

**Freidman, M. Henika, P.R. et Mandrell,R.E. (2002).** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonelle enteric. Journal of food protection, 64: 1445-1560.

## « G »

**Garabeth.F. ;Bouaoun.D. ;Elyafi-Elzahri.G. :** Etude quantitative des coumarines d'une plante sauvage Prangos asperula Boissier,Phytothérapie,5 :259-263,(2007).

**Gentry P A.** Comparative aspects of blood coagulation. The Veterinary Journal 2004; 168: 238–251.

**Gentry P A.** Comparative aspects of blood coagulation. The Veterinary Journal 2004; 168: 238–251.

**Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana ECS. and Fonseca Maria J.V. (2003)** – Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. AAPS Pharma.Sci.5 (2), 5p.

**Ghestem A., Seguin E., Paris M. & Orecchioni A.M., 2001.** Le préparateur en pharmacie.Dossier 2 : Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

**Ghorbani. A, Esmailizadeh. M,** Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components, Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2017.

**Gilly (2005)** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grace. Botanique-Culture-Chimie-Production et marché. L'Harmattan. Sciences 418

**Girardel JM, Samama CM.** Les nouveaux antithrombotiques : une thérapeutique en mutation, des perspectives d'avenir New anticoagulant agents: the present and the future.Réanimation 2006; (15): 117–123.

- Goetz P., 2013.** La diversité de la phytothérapie. Springer, Phytothérapie, 11,147–148.
- González-Gallego J.,Sanchez-campos S., Tunon M.J. (2007).**Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids.Nutricion hospitalaria,22:287-93.
- Gotz. P, BUSSER. C.,** La phytocosmétologie thérapeutique, springer, 188p, 2007.
- Goutier. J.,** L’herbier des jardins collection de plantes vivrières aromatiques médicinales et ornementales, La Maison Rustique Flammarion, 2009.
- Grieve M. (1984):** A Modern Herbal. Savvas Publishing. ISBN unknown.
- GUINOISEA. E.,** Molécules antibactériennes issues d’huiles essentielles : séparation, identification et mode d’action, Thèse de Doctorat, à l’Université de Corse Pasquale Paoli, 2010,184p.
- Gulcin, I., Uguz, M., Oktay, M., Beydemir, S., &Kufrivioglu, O. I. (2004).** Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.). Turk. J Agric. For., 28: 25-33.

## « H »

- Haioun.A ; Hamoudi.F.2015 :** Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethiumgraveolens* et leur effet cardioprotectrice.
- Haloran K. (2001).** Herbs, garden and gardening illnesses. Organic Gardening Emmaus, 48 : 1-16.
- Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. (1999):** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol.86: 985–990.
- Hammoudi, Roukia. (2015).**Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien. Diplôme de Doctorat ès sciences.Universite Ouargla.
- Hans W.K. 2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition.
- Hartmann T.,2007.** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry Volume 68, Issues 22–24; 2831–2846.
- Hayouni E., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J.Y., Mohammed H. & Hayouni, E.A, Abedrabba, M ., Bouix, M., Hamdi, M.(2007).**The effects of solvents and extraction

method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* (in press).

**Helft G, Leger P.** Que retenir de la littérature récente concernant les antithrombotiques What's new on antithrombotics? *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* 2009;58: 230–235

**Hennebelle.T. ;Sahpaz.S. ;Bailleul.F.** :Polyphénols végétaux ,sources ,utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif.*Phytothérapie* Numéro 1 :3-6,(2004).

**Herodez S. S., Hadolinb M., Skergeta M. and Zeljko Knez, (2003).** Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *Food Chemistry*, 80, 275–282.

**Hirsh J, Dalen JE, Poller L, Deykin D.** Oral Anticoagulants: Mechanism of Action Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. *CHEST* 2001; 119:8S–21S.

**Hohmann J., Redei D., Mathea I. et Blunden G. (2003).** Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from *Salvia officinalis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3, 427 - 429.

**Hohmann J., Redei D., Mathea I. et Blunden G. (2003).** Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from *Salvia officinalis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3, 427 - 429.

**Hussain. S.P, Hofseth. L.J, Harris. C.C. (2003).** Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 276–285.

**Huycke, M. ., Gilmore, M. . & Sahn, D. . (1998).** Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 4, 239–249.

## « I »

**Iserin P., Masson M., et Restellini J.P., (2007).** Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, pp14.

**Iserin. P.,** Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse, 335p, 2001.

## « J »

**J.J.Guilhou,O.Dereure,L.Marzin.**Efficacy of Daflon 500 mg in venous leg ulcer healing:a double-blind,randomized,controlled versus placebo trial in 107 patients.*Angiology*.V.48.pp.77-85,1997

**Jean. M, POLESE.**, La culture des plantes aromatiques, Edition Artémis, 321p, 2006.

**Jellin J., Gregor P.J., Batz F. et Hitchens K. (2002).** Pharmacist's letter prescriber's letter. Natural Medicines Comprehensive Database. 4 th ed. Stockton, CA: Therapeutic Research Faculty: p.584-586.

**Jobin F.** L'hémostase. Presses Université Laval; 1995. 516 p.

**Johnson.A.W.:** Invitation à la chimie organique, Ed, De Boeck Supérieur,p26,(2003).

**Joly B et Reynaud A. 2002.** Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. P : 79-80-83.

**Judd Walter S, Campbell Christopher S, Kellogg Elizabeth A, Stevens Peter, (2002).** Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université ,84-87 ,396-399.

## « K »

**Kalla A, 2012.** Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien :*Pituranthos scoparius, Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum* . Thèse de doctorat en phytochimie université de Constantine .P86-87.Kalla, 2012

**Kamatou G. P. P., Viljoen A. M., Gono-Bwalya A. B., Van Zyl R. L., Vuuren V. S. F., Lourens A. C. U., Baser K. H. C., Demirci B., Lindsey K. L., Staden V. J. et Steenkamp P. (2005).** The In vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 382 - 390.

**Kanyonga, P.M., Faouzi, M.A., Meddah, B., Mpona, M., Essassi, E.M., Cherrah, Y. (2011).** Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for antiinflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3,199-204.

**Karou D., Dicko M. H., Simpore J., Yameogo S., Sanon S. and Traore A.S. (2005) –** Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106: 119-133.

**Kenjeric D., Monschein V., Riederer P., et schreir P. 2003.** Flavonoids pattern of sage (*Salvia officinalis*) unifloral honey. *Food chemistry.*, 110 : 187-192.

**Kennedy D. O. et Scholey A. B. (2005).** Sage and brain function. *Nutrition Abstract and Reviews: Serie A*, 75, 8, 25 - 31.

**Kennedy D. O. et Scholey A. B. (2005).** Sage and brain function. Nutrition Abstract and Reviews: Serie A, 75, 8, 25 - 31.

**Kennedy D. O. et Scholey A. B. (2005).** Sage and brain function. Nutrition Abstract and Reviews: Serie A, 75, 8, 25 - 31.

**Khalil E.A., Afifi F.U. and Al-Hussaini M. (2007)** – Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). Journal of Ethnopharmacology. 109: 104-112.

**Khanbabae K. and Ree T.R., (2001).** Tannins: Classification and Definition. Journal of Royal Society of Chemistry. 18: 641-649.

**Kivrak, I., Duru, M.E., Ozturk, M., Mercan, N., Harmandar, M., Topçu, G.(2009).** Antioxydant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from essential oil and ethanolextract of *Salvia potentillifolia*. Food chemistry, doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.069. Article in press.

**Koechlin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition clinique et métabolisme. 20: 165-177.

**Koffi N et al., 2009.** In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. Journal of complementary and alternative medicine. Vol. (9): 6-39

**Krief, S.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat. Gif-sur-Yvette : MNHN, 2003

**Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C, Abdelly C. (2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. Food and Chemical Toxicology, xxx: xxx-xxx).

« *L* »

**Lahoual M. 2004.** Interaction flavonoïdes mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat d'état de l'université de Constantine.

**Lamarti.A.;Badoc.A. ;Deffieux.G.;Carde.J.P.** :Biogenèse des monoterpènes,la chaîne isoprénique, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 133,79-99,(1994).

**Laurent M,Dufour C,Dieu B,Varin R.**Place des nouveaux anticoagulants oraux.Monit Hosp.2010 ;224 :24-7.

**Lautrette S., (2004).** Utilisation des fibres de carbone activé comme catalyseurs de O- et N-glycosylation : Application à la synthèse d'analogues de saponines et de nucléosides. Thèse de doctorat en Chimie appliquée. Limoges.

**Leclerc H. (1994).** Les antisudoraux. In « le précis de phytothérapie thérapeutique par les plantes Françaises ».Ed : MASSON, 5, pp 90 - 92.

**Lemaoui A., 2011.** Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*.L Algérienne. Mémoire de Magister.Université de Sétif. 100p.

**Lima C. F., Andrade P. B., Seabra R. M., Fernandes-Ferreira M. et Pereira-Wilsona C. (2005).** The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 383 - 389.

**Lima C.F., Carvalho F., Fernandes E., Bastos M. L., Santos-Gomes P. C., Fernandes-Ferreira M. et Pereira-Wilson C. (2004).** Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 18, 457 - 465.

**Lima C.F., Patricia C., Valentao R., Andrade P.B., Seabra.R.M., Fernandes- Ferreira.M., et pereira-Wilson C. 2007.** Water and méthanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induce oxidative damage. *Chemiobiological interaction.*, 167 : 107-115.

**Lin Y. L., Wu C. H., Luo M. H., Huang Y. J., Wang C. N., Shiao M. S. et Huang Y. T. (2006).** In vitro protective effects of salvianolic acid B on primary hepatocytes and hepatic stellate cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 215 - 222.

**Llaneza Coalla H., Blanco Fernández J.M., Morís Morán M.A. et López Bobo M. R. 2009.** Biogas generation apple pulp. *Bioresource technology* 100.17: 3843- 3847.

**Louli V., Ragoussis N. et Magoulas K. (2004).** Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresources Technology*, 92, 201 - 208.

**Lu Y. et Foo L. Y. (2001).** Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197 - 202.

**Lu Y. et Foo L. Y. (2001).** Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197 - 202.



**Lu Y. et Foo L. Y. (2002).** Polyphenolics of Salvia. *Phytochemistry Review*, 59, 117 - 140.

**Lu Y., Yeap E. (2001):** Antioxidant activities of polyphénols from sage (*salvia officinalis*), *journal food chemistry*,75: 197-202.

**Lutge U., Kluge M. & Bauer G., 2002.** Botanique 3 ème Ed : Technique et documentation.Lavoisier, Paris. 211p.

## « M »

**Macheix J.J., Fleurit A. et Sarni-Manchado P. p 2 in Sarni-Manchado P. et CheynierV., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Tech&. Lavoisier Doc.380p.

**Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. & Jimenez L., 2004.** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5): 727-747.

**Mangambu M., NoihaNoumi V., Zapfack L &Sonké B(2010) :** Etude phytosociologique du groupement à piper capensis (R.D. Congo). *International journal of environmentalstudies*, 67(3) : 417-430.

**Marongiu B. , Porcedda S., Piras A., Rosa A., Deiana M. and A. Dessi, (2004).** Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*, *Phytoter. Res.*, 18; 789-792.

**Martins N., Barros L., Santos-Buelga C., Henriques M., Silva S., Ferreira I. C.F.R. (2015):** Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170: 378–385.

**Masterova I., Uhrin D., Kettmann V., et Suchy V. 1989.** Phytochemical study of *Salvia officinalis* L. *Chemical Papers.*, 43 : 797–803.

**Mathews JM, Etheridge AS, Black SR.** Inhibition of human cytochrome P450 activities by kava extract and kavalactones. *Drug Metab Dispos.* 2002 Nov; 30 (11):1153-7

**Menaker A., Kravets M., Koel M. et Orav A. (2004).** Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs. *Preliminary Communication/Communication*, 7, 629 - 633.

**Merzoug., B. (2009).**Contribution a l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des Apiaceae : *Carummontanum*Coss. & Dur. et *Bupleurummontanum*Coss. Thèse de doctorat. "Phytochimie". UniversitéMentouri-Constantine. P1.

**Miladinović D. et Miladinovic L. J. (2000).** Antimicrobial activity of essential oil of sage from Serbia. Series: Physics, Chemistry and Technology, 2, 2, 97 - 100.

**Miliauskas G., Venskutonis P. R. et Van Beek T. A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry, 85, 231 - 237.

**Milpied H.** : Progrès en Dermato-Allergologie, Ed, John Libbey Eurotext, p126, 128, (2009).

**Mohammadi M., Akhoudzadeh S. et Noroozian M. (2003).** Salvia officinalis extracts in treatment of patient with mild to moderate Alzheimers disease: a double blind, randomized and placebo controlled trial. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 28, 1, 53 - 59.

**Mohammedi Z. 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemecen. Thèse de Magistère de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.

**Moutinho C. (2013).** Antispasmodic activity of aqueous extracts from Mentha piperita native from Trás-os-Montes region (Portugal). International Journal of Indigenous Medicinal Plants 29(1): 1167-1174.

**Mompon B., Lemaire B., Mengal P. & Surbled M., 1998.** Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris.

**Morel Y., et Barouki R., (1999).** Repression of gene expression by oxidative stress. Biochemical Journal 342(3), 481-496.



**Naczki M. et Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054, 95 - 111.

**Najjaa H., Neffati M., Zouari S. and Ammar E. 2007.** Essential oil composition and

**Natália, M., Lillian, B., Celestino, S-B., Mariana, H., Sónia, S., Isabel, F. (2015).** Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from Salvia officinalis L. Food Chemistry, 170, 378-385.

**Newall C.A., Anderson L.A. et Philpson J.D. (1996).** Herbal Medicine: A Guide for Health Care professionals. London, UK: The Pharmaceutical Press; p. 135-137.

**Ninomiya K., Matsuda H., Shimoda H., Nishida N., Kasajima N., Yoshino T., Morikawa T. et Yoshikawa M. (2004).** Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14, 1943 - 1946.

**Ninomiya K., Matsuda H., Shimoda H., Nishida N., Kasajima N., Yoshino T., Morikawa T. et Yoshikawa M. (2004).** Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14, 1943 - 1946.

## « O »

**Oloyede O.I. 2005:**Chemical profile of Unripe Pulp of Carica papaya. *Pakistan journal of nutrition*, 4,p: 379-381

**Omulokoli. E, Khan. B, and Chhabra. S.C. ( 2000).** Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 133-137.

**Ongilagha J., Bala A ., Hallet R .and Gruber M. 2003.** " Leaf flavonoids of the cruceferous species. *Camelina sativa* , *Crambe spp .*, *Thlaspi arvense* and several other genera of the family *Brassicaceae*" *J. Biochemical Systematics and Ecology*, 31(11), 1309-1332.

## « P »

**P. Taboul , J. Duchenne, H. Lefort, C. Zanker, P. Jabre et al.** Prise en charge de la fibrillation atriale en médecine d'urgence, recommandations de la Société française de médecine d'urgence en partenariat avec la Société française de cardiologie. *Ann. Fr. Med. Urgence*. Juillet 2015.

**Pasquier C. (1995) –** Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des laboratoires*. 1995 (276) : 87-92.

**Pastre J., (2005).** Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat. Université Paul – Sabatier, Toulouse. p.22.

**Patrick B., Jean L., and Michel S. (1988).** *Bactériologie : Les bactéries des infections humaines*. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp: 100-108-274.

**Patzer J. A., Dzierzanowska D., Turner P. (2008).** Trends in antimicrobial susceptibility of Gram-negative isolates from a pediatric intensive care unit in Warsaw: results from the Mystic program (1997–2007). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 : 369–375.

**Pavela R. (2004).** Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*, 75, 745 - 749.

**Pereira J. A., Oliveira I., Sousa A, Valenta P.c., Andrade PB., Ferreira I C.F.R., Ferreres F. , Bento A. ,Seabra R., Estevinho LC. (2007).** Walnut (*Juglans regia* L) leaves: Phenolic compounds,antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars *Food and Chemical Toxicology*. 45: 2287–2295.

**Pujuguet pierre. (2008) :** Entre capitelles et lavognes découvrez la flore de la garrigue, Sentier Botanique Vigneron, Bourg-Saint-Andéol Ardèche.

## « Q »

**Quezel, P.,Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2ème Ed: C.N.R.S, Paris. P:781, 793,794, 801,806.

**Quezel, F., Santa, S.** Nouvelle flore de l'algérie et des régions désertiques méridionales. Ed.CNRS, Paris-France 1963 ; 12 :801-802.

## « R »

**Rabbani M., Sajjadi S. E., Jafarian A. et Vaseghi G. (2005).** Anxiolytic affects of *Salvia reuterana* boisson the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 100 - 103.

**Radulescu V., Chiliment S. et Oprea E. (2004).** Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1027,121 - 126.

**Raoui Hilloua et Zellagui Itab. (2014) :** Contribution à une étude phytochimique et biologique des flavonoïdes des plants de la famille des lamiacées. Mémoire de Master, université de Constantine, faculté de la science de la nature et de la vie, département de Biologie et écologie végétale.

**Raven.P.H ; Evert R.F ; Eichhorn.S.E :**Biologievégétale, p32,527,(2003).

**Ré D.B., Nafia I., Nieoullon A., Goff L.K.L et Had-aissouni L. (2005).** Stress oxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate. Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 24 : 502-509.

**Renné T, Nieswandt B, Gailani D .**The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2006; 36:148–151.

**Revel T, Doghmi K.** Physiologie de l'hémostase. *Encyclopédie Médico Chirurgicale* 2004 ; 22-009-D-20.

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

**Ribéreau-Garyon.P. 1968 :** Les composés phénoliques des végétaux.Edition Dunod Paris, p 254. (Ribereau –Gayon J., Peynaud., E 1968).

**Rice-Evans C.A, Miller N.J, Bolwell P.G, Bramley P.M et Pridham J.B.** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 1995, 22, 375-383.

**RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. et PAGANGA, G. 1997.-** Antioxydant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2: 152-159.

**Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinass G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J.** Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Translational Research* 2009; 153:217–223.

**Robestein.M. ;Soerensen.Ch. :** Chimie avancée :préparation au bac et à la maturité, Ed,PPUR Presses polytechnique ,p102,(2011).



**Samama MM, Gerotziafas GT, Elalamy I, Horellou MH, Conard J.** Biochemistry and clinical pharmacology of new anticoagulant agents. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:218-224.

**Samama M-M, Conard J, Flaujac C, Combe S, Horellou M-H.** Hétérogénéité pharmacologique des nouveaux anticoagulants. *J Mal Vasc.* déc 2011;36:S10-S15.

**Santos-Gomes P. C., Seabra R. M., Andrade P. B. et Fernandes-Ferreira M. (2002).** Phenolic antioxidant compounds produced by In vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, 162, 981 - 987.

**SCHALM O.W., JAIN N.C., CARROLL E.J.** Blood coagulation and fibrinolysis. In :*Veterinary hematology*. 3rd ed. Philadelphia : Léa and Fabiger, 1995, 284-300.

**Schauenberg P & Paris F. (2006)** : Guides Des Plantes Médicinales Analyse, Description Et utilisation de 400 plantes. Edition delachaux et niestlé, Paris, pp 33-34.

**Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, et al. 2013.** Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature* 493 45–50.

**Sébahoun G, éditeur.** Hématologie clinique et biologique. Vélizy-Villacoublay, France: Arnette; 1998. 541 p.

**Shah BH, Nawaz Z, Pertani SA, Roomi A, Mahmood H, Saeed SA, Gilani AH.** Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochem Pharmacol*. 1999 Oct 1;58(7):1167-72

**Sies H. (1993)** – Strategies of antioxidant defense. *Europe. Journal. Biochemistry*. 215 : 213-219.

**Skerget M., Kotonik P., Hadolin M Rizner-Hars A., Simoncic M. et Knez Z. 2005.** Phenols, proanthocyanidins flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89:191-198.

**Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J. (2004).** *Microbiology of Waterborne Diseases*. Ed Elsevier Academic Press. pp71-132



**Talbi H., Boumaza A., El-mostafa A., Talbi J. et Hilali A. 2015.** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). CODEN: JMESC. *Mater. Environ. Sci.* 6 (4) (2015) 1111-1117.

**Teixeira B., Marques A., Ramos C. (2013).** Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43: 587–595.

**Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A. et Sokmen A. (2006).** Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, 95, 200 - 204.

**Teuscher E., Anton R. et Lobstein A. (2005).** *Plantes aromatiques*. Ed : Technique et Documentation. LAVOISIER, p 416, 444.

**Teuscher E., Anton R., Lobstein A., 2005.** *Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles*, Tec&Doc, Lavoisier, Paris, 105p.

**Tildesley N. T. J., Kennedy D. O., Perry E. K., Ballard C. G., Wesnes K. A. et Scholey A.B. (2005).** Positive modulation of mood and cognitive performance following administration of acute doses of *Salvia lavandulaefolia* essential oil to healthy young volunteers. *Physiology and Behavior*, 83, 699 - 709.

**Topcu (2006)** Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.* 69: 482-487.

**Tresse E et Evans W.C.(1987).** *Pharmacognosy Billiaire*. Ed. Tindall, London, 13,p:61-62.

**Tsimogiannis D.I. & Oreopoulou V., 2006.** The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 7: 140-146.



**Vaes L.P.J et Chyka P.A. (2000).** Interactions of warfarin with garlic, ginger, ginkgo, or ginseng: nature of evidence. *Ann of Pharmacother.* 34: 1478-82.

**Vansant G. (2004)** – Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.

**Verbois. S.,** *Plantes et herbes aromatique saveurs et vertus*, Fernande Lanore , 234p, 2003.

**Vollardt.P.C. ;Schore N.E. ;Depovere P. :**Traité de chimie organique, Ed,deboeck,p148,(2009). Thèse



**Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E.J., Huang T.C., et Ho C.T. 1998.** Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 46 : 4869–4873.

**Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp C.M. (2007):** Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*,14: 508–516.

**Wichtl M. et Anton R. (1999).** *Salvia folium*. In «Traditional, pratique officinale, Science et thérapeutique ». Ed : Technique et Documentation, pp 490 - 499.

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

**Wichtl. M., Anton. R. (2003).** *Planes thérapeutiques*. Edition Tec & Doc Lavoisier, Paris. P:364, 523, 538.

**Wilson. M., GUYLAINE.G.,** *Fleurs comestibles du jardin à la table*, Fides, 371p, 2008.

« Y »

**Yepez B., Espinosa M., López S. and Bolaños G., (2002).** Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, *Fluid Phase Equilibria* 194/197, 879/884.

**YesilCeliktas, O.; Hames Kocabas, E. E.; Bedir, E.; Vardar Sukan, F.; Ozek, T.; Baser, K. H. C. (2007):** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*100 (2): 553–559.

**Yoon, S-J.,Pereira, M. S., Pavao, M. S.G.,Hwang, J-K.,Pyun, Y-R.,Mourao, P.A.S. (2002).**The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. *Thrombosis Research*, 106 :51– 58.

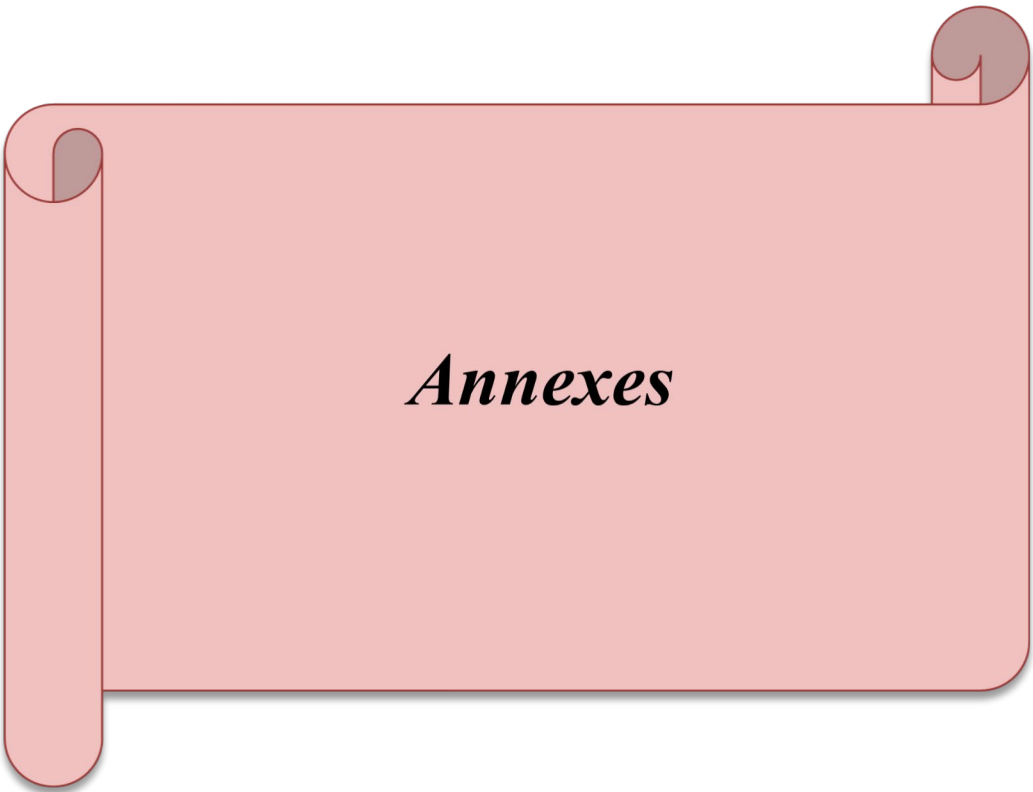
« Z »

**Zeghad, N.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine. **2008 / 2009**

**Zhou, H-Y.,Hong, J-L.,Shu, P.,Juan Ni, Y.,Qin, M. J.(2009).** A new dicoumarin and anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. *Fitoterapia*, 80 : 283–285.















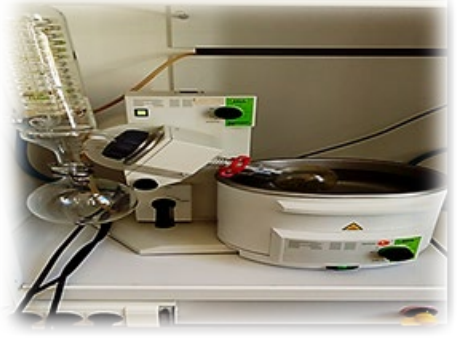







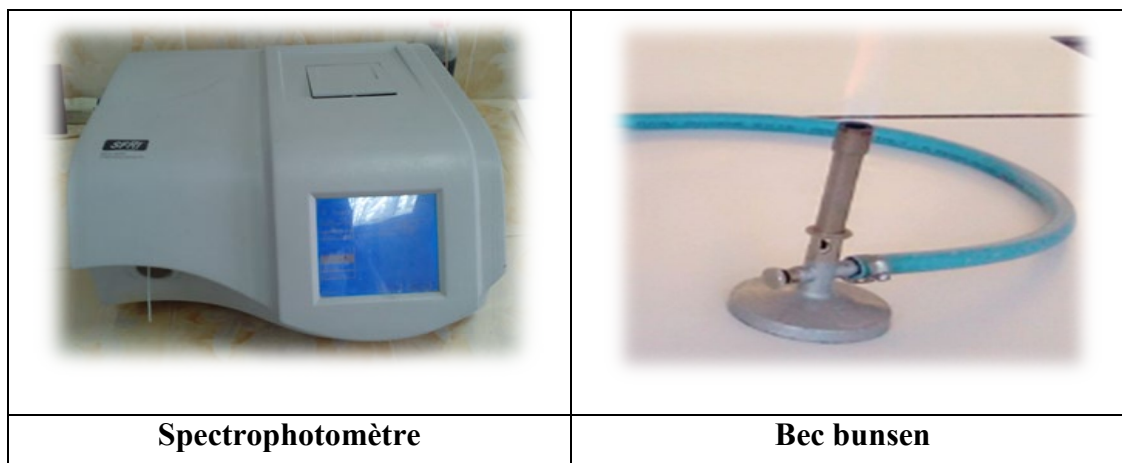
*Annexes*

## Annexe 01 : Le matériel et les produits utilisés

## A) Appareillage

	
<b>Balance</b>	<b>Balance de pression</b>
	
<b>Plaque chauffante</b>	<b>vortex</b>
	
<b>Agitateur magnétique</b>	<b>Agitateur mécanique</b>
	
<b>Etuve</b>	<b>Bain marie</b>

 A white laboratory spectrophotometer with a black control panel and a digital display.	 A black laboratory instrument with a sliding mechanism, possibly a spectrophotometer or a similar device.
<p><b>Spectrophotomètre</b></p>	<p><b>Pied à coulisse</b></p>
 A white laboratory steam rotator with a glass flask and other equipment on top.	 A stainless steel laboratory autoclave with a circular lid and a control panel.
<p><b>Rota vapeur</b></p>	<p><b>Autoclave</b></p>
 A white laboratory coagulometer with a digital display and a control panel.	 A teal laboratory centrifuge with a digital display and a control panel.
<p><b>Coagulomètre</b></p>	<p><b>Centrifugeuse</b></p>
 A white laboratory water bath with a digital display and a control panel.	 A white laboratory centrifuge with a digital display and a control panel.
<p><b>Bain marie</b></p>	<p><b>Centrifugeuse</b></p>



## B) matériel de laboratoire

Bécher ; erlenmeyer ; Fioles; entonnoir ; Flacons en verre ; Eprouvette ; tubes à essai ; Papier filtre; Papier film; Papier d'aluminium; barreau magnétique ; spatule ; pipettes graduée; Portoirs ; verres à montre, micros pipettes, boites de pétries en verre.

### Annexe 02: produits chimiques et réactifs

#### 1) produits chimiques

Méthanol ; éthanol ; éther de pétrole; acide gallique ; folin-ciocalteu ; iodure de potassium ; iode ; Acide chlorhydrique (HCL) ; Hydroxyde d'ammonium ; L'éther diéthylique ; Alcool chlorhydrique ; Alcool iso-amylque ; Chlorure ferrique (FECL3) ; Liqueur de Fehling ; NCL; KOH ; NaOH ; NH4OH ; H2SO4 ; NH4OH ; Anhydride acétique ; Chloroforme ; Carbonate de sodium ; DPPH, Céphalinekaolin, Chlorure de calcium, Thromboplastine calcique, Bouillon nutritive (BN) , Gélose Muller Hinton (MH).

#### 2) Réactifs utilisés pour le screening phytochimique

##### ➤ Réactif de Wagner

Iodure de potassium.....2 g

Iode.....1 ,27 g

Eau distillée.....100 ml

##### ➤ Liqueur de Fehling

#### Solution A

Sulfate de cuivre.....40 g

Eau distillée .....100 ml

**Solution B**

Tartrate de sodium et de potassium .....200g

Hydroxyde de sodium .....150g

Eau.....100 ml

Mélanger lentement, en agitant doucement, les deux solutions (A et B) avec un volume égale (v/v).

➤ **HCL (10%)**

4.15 ml (HCL 37%) → 50ml d'eau distille

➤ **KOH (10%)**

5.6g → 100 ml d'eau distille

➤ **FECL3 (1%)**

1.62g → 100 ml d'eau distille

➤ **FECL3 (2%)**

3.24g → 100 ml d'eau distille

➤ **H2SO4 (10%)**

9.8g → 100 ml d'eau distille

➤ **Alcool éthylique (50%)**

23 ml → 100 ml d'eau distille

**3) Composition des principaux Milieux de culture utilisés pour l'AAB :**

**Milieux liquides**

➤ **Eau physiologique stérile**

Chlorure de sodium (NaCL)..... 0,9g

Eau distillée..... 100ml

➤ **Bouillon nutritive (BN)**

Bouillon nutritive poudre.....12g

Eau distillée..... 600ml

Stérilisation à 121°C/15min

**Milieux solides**

➤ **Gélose Muller Hinton (MH)**

Gélose Mueller Hinton poudre.....38g

Eau distillée.....1L

Stérilisation à 121°C/15min

**Annexe 03 : Activité antioxydant**

**Tableau 01 : Abs d'extrait méthanolique dans les trois temps (30, 45,60 min)**

AAO de l'extrait méthanolique de SO												
Temps	30min				45min				60min			
Concentration	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4
Absorbons	0,128	0,099	0,065	0,025	0,155	0,117	0,067	0,034	0,150	0,099	0,064	0,020
	0,131	0,101	0,069	0,028	0,149	0,109	0,066	0,033	0,131	0,099	0,061	0,019
	0,130	0,097	0,064	0,023	0,123	0,099	0,064	0,038	0,120	0,090	0,055	0,013
Moyenne	0,130	0,099	0,066	0,025	0,142	0,108	0,066	0,035	0,133	0,096	0,060	0,017
Ecartype	0,002	0,002	0,003	0,002	0,017	0,009	0,001	0,003	0,015	0,005	0,004	0,004

**Tableau 02 : Abs d'extrait aqueux dans les trois temps (30, 45,60 min)**

AAO de l'extrait aqueux de SO												
Temps	30min				45min				60min			
Concentration	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4
Absorbons	0,175	0,387	0,502	0,456	0,252	0,35	0,417	0,548	0,256	0,473	0,513	0,652
	0,234	0,393	0,574	0,671	0,298	0,402	0,524	0,560	0,224	0,385	0,538	0,632
	0,246	0,420	0,629	0,721	0,327	0,39	0,540	0,500	0,294	0,438	0,575	0,626
Moyenne	0,218	0,400	0,568	0,616	0,292	0,381	0,493	0,536	0,258	0,432	0,542	0,637
Ecartype	0,067	0,110	0,142	0,143	0,038	0,027	0,067	0,031	0,035	0,044	0,031	0,014

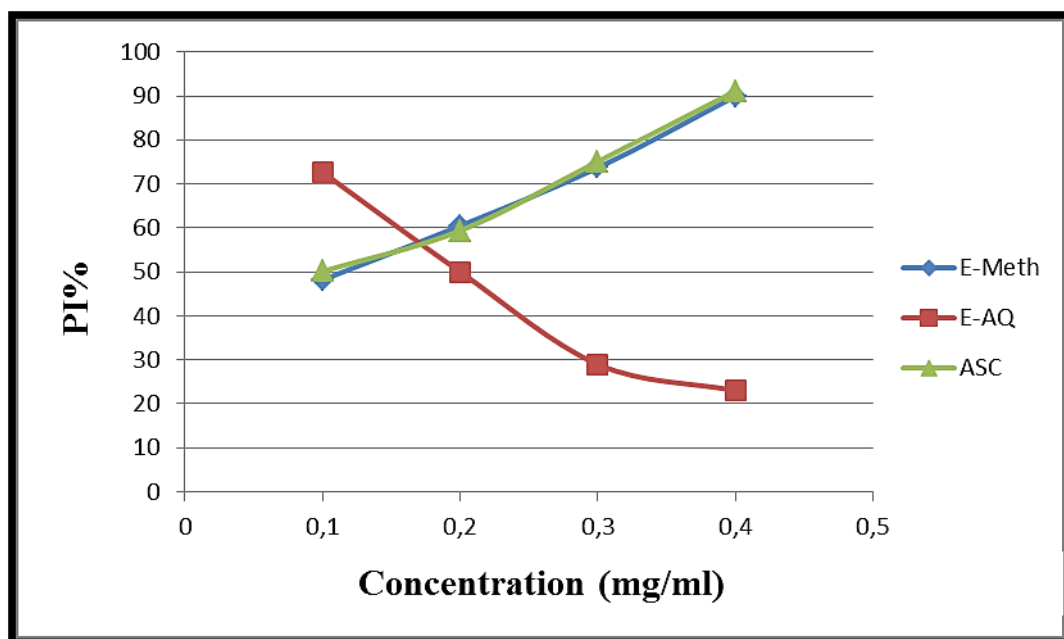
**Tableau 03 : Abs d'Acide ascorbique dans les trois temps (30, 45,60 min)**

AAO de l'Acide ascorbique												
Temps	30min				45min				60min			
Concentration	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4

Absorbons	0,125	0,109	0,065	0,023	0,123	0,096	0,066	0,017	0,119	0,088	0,035	0,006
	0,122	0,107	0,059	0,025	0,127	0,093	0,071	0,014	0,121	0,096	0,033	0,008
	0,127	0,097	0,063	0,029	0,119	0,092	0,061	0,017	0,125	0,087	0,04	0,015
Moyenne	0,125	0,104	0,062	0,026	0,123	0,094	0,066	0,016	0,122	0,090	0,036	0,010
Ecartype	0,003	0,006	0,003	0,003	0,004	0,002	0,005	0,002	0,003	0,005	0,004	0,005

**Annexe 04 : Pourcentages d'activité antioxydants en fonction des différentes concentrations de l'extrait pendant les trois temps**

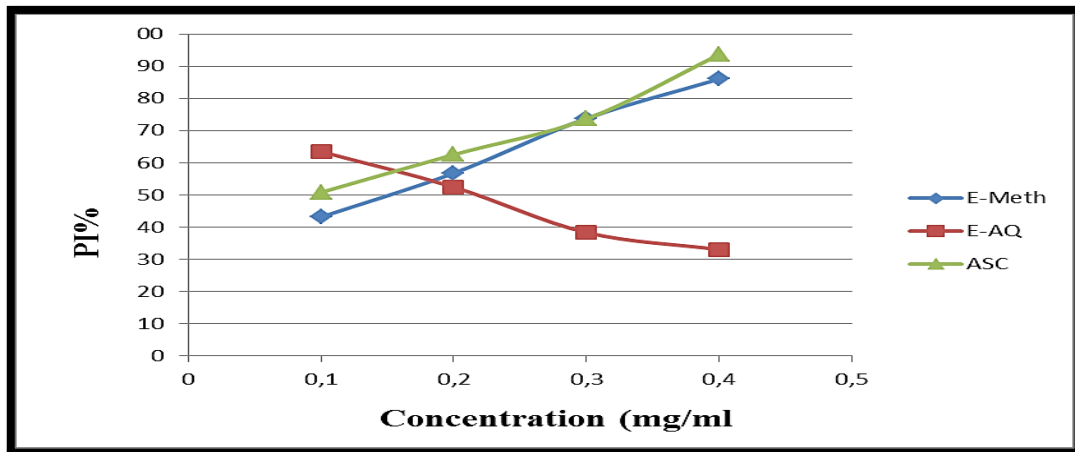
**Temps 30 min :**



**Figure 01 : Pourcentages d'activité antioxydants en fonction des différentes concentrations de l'extrait dans 30 min.**

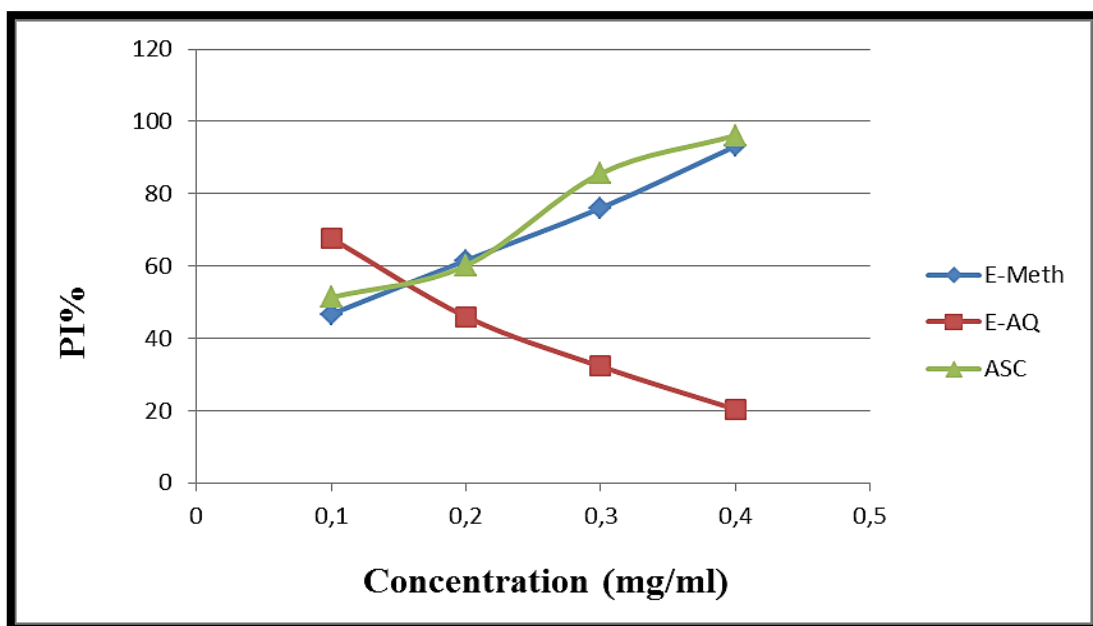
**Temps 45 min :**





**Figure 02 :** Pourcentages d'activité antioxydants en fonction des différentes concentrations de l'extrait dans 45 min.

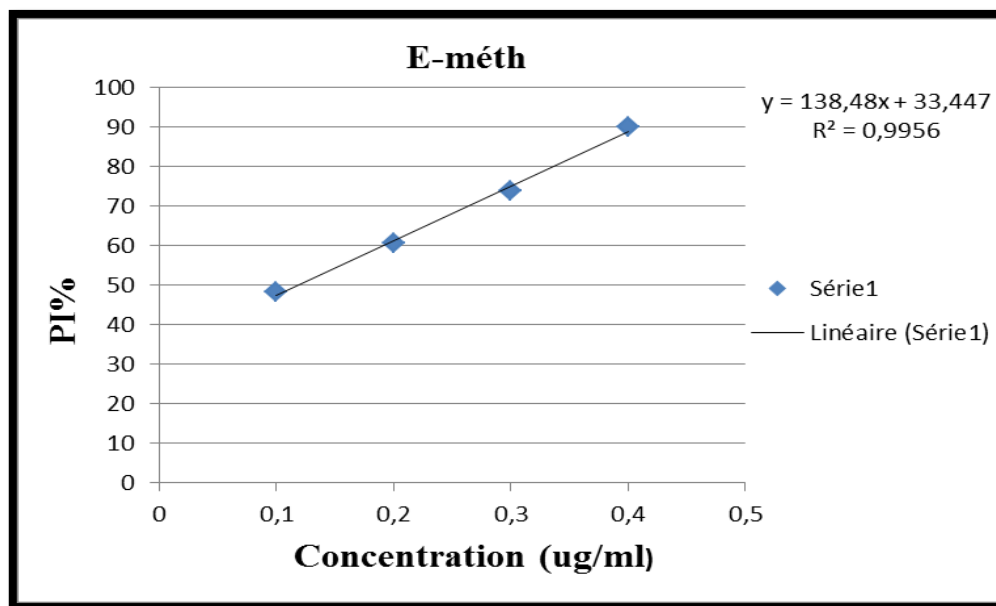
**Temps 60 min**



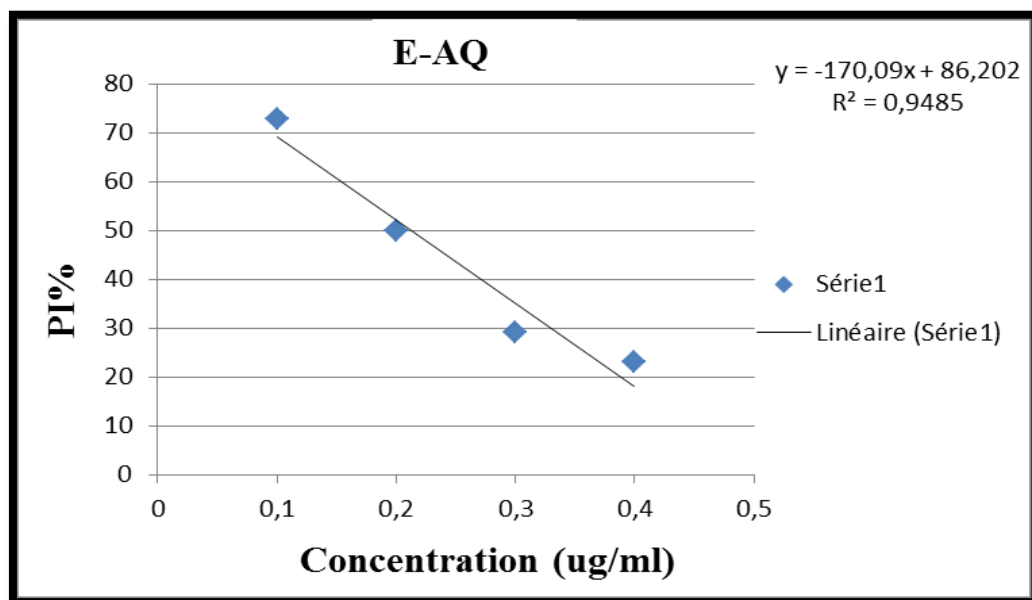
**Figure 03:** Pourcentages d'activité antioxydants en fonction des différentes concentrations de l'extrait dans 60 min.

## Annexe 05 : EC50%

30min :



**Figure 04:** La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique de SO.



**Figure 05 :** La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux de SO.

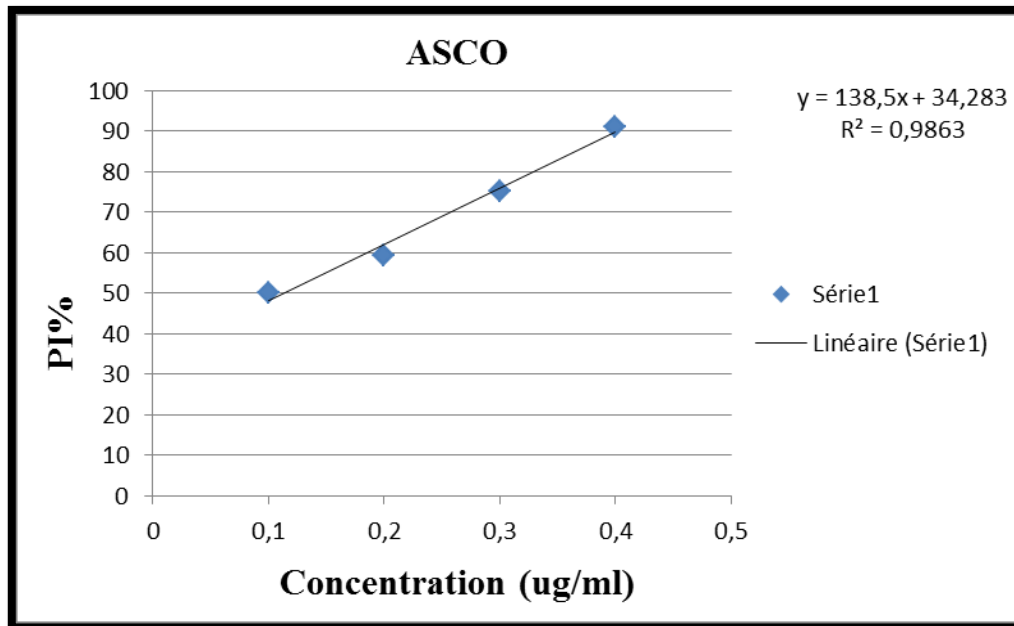


Figure 06: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'ASC.

45min:

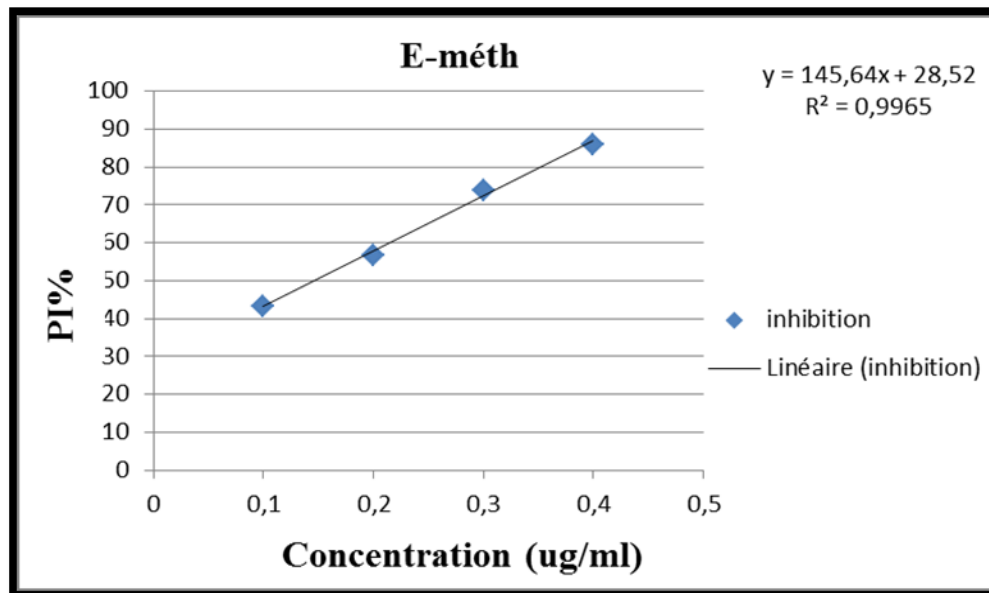
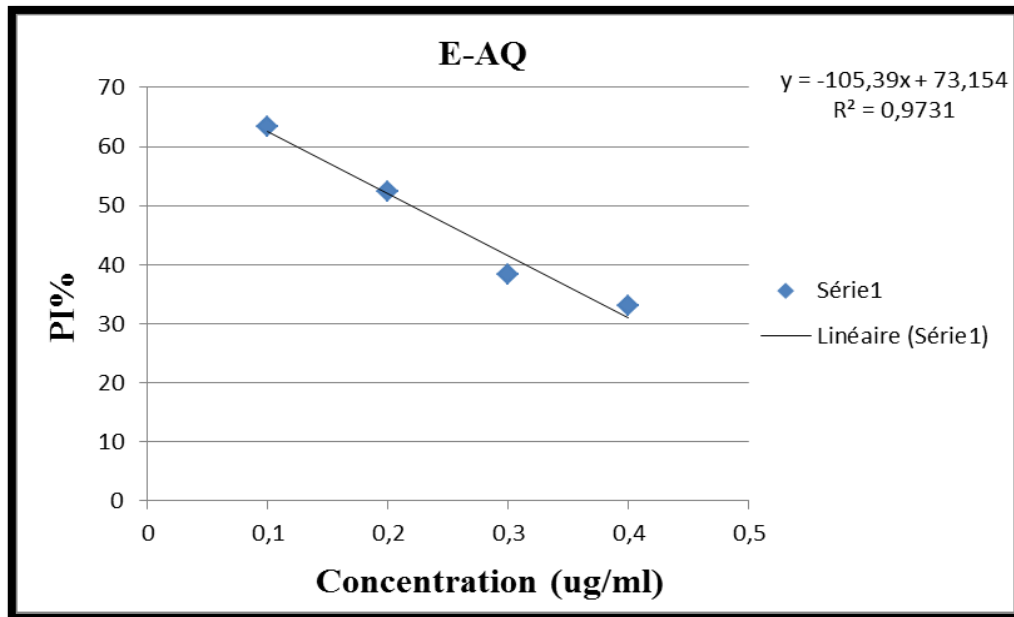
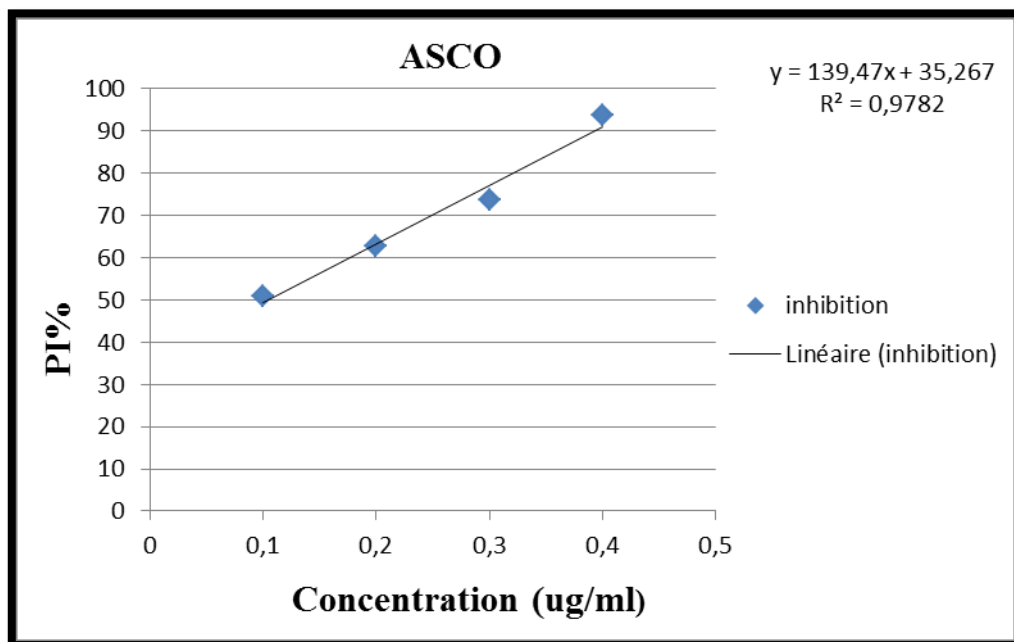


Figure 07 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique de SO.

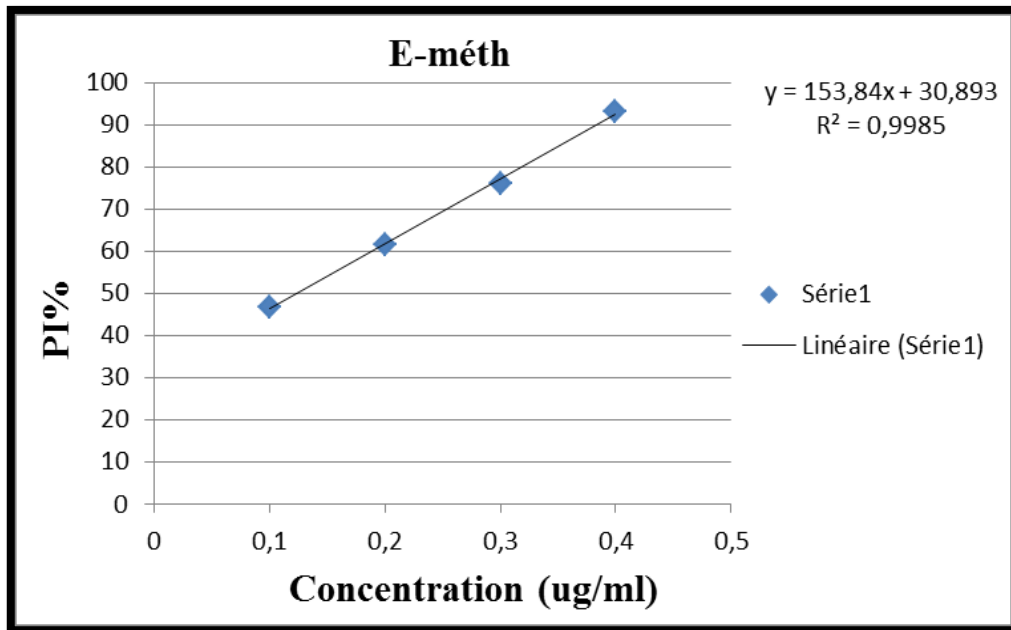


**Figure 08:** La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux de SO.

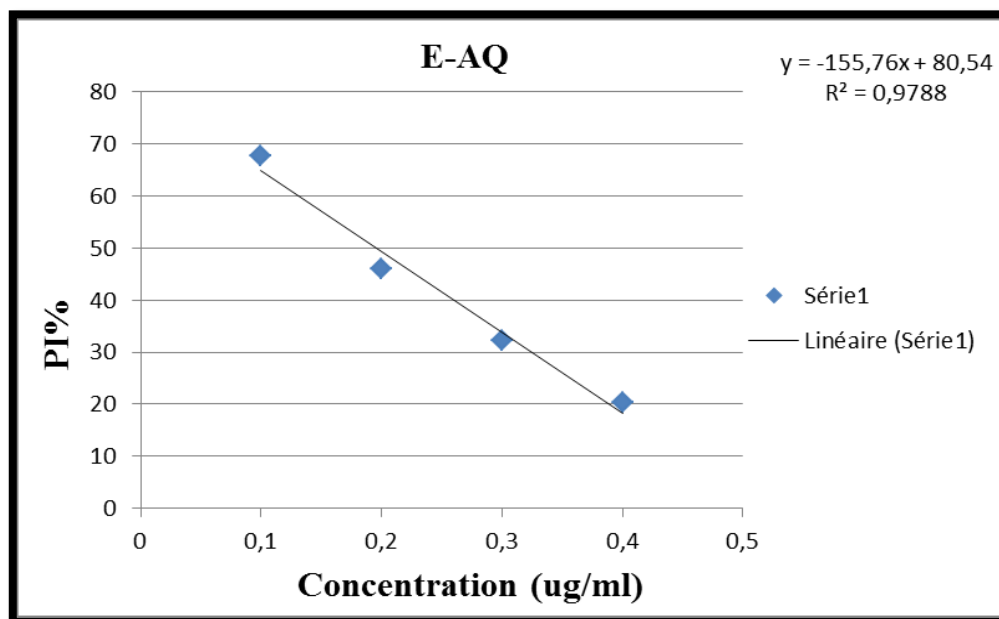


**Figure 09:** La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'ASC.

60min:



**Figure 10:** La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait méthanolique de SO.



**Figure 11:** La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux de SO.

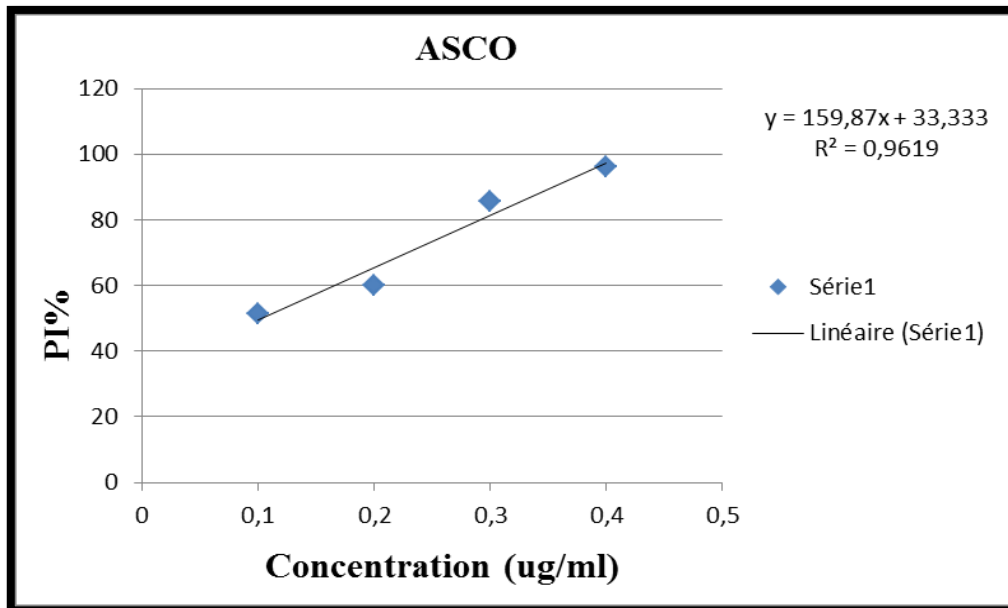


Figure 12: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'ASC.

#### Annexe 06: AAB

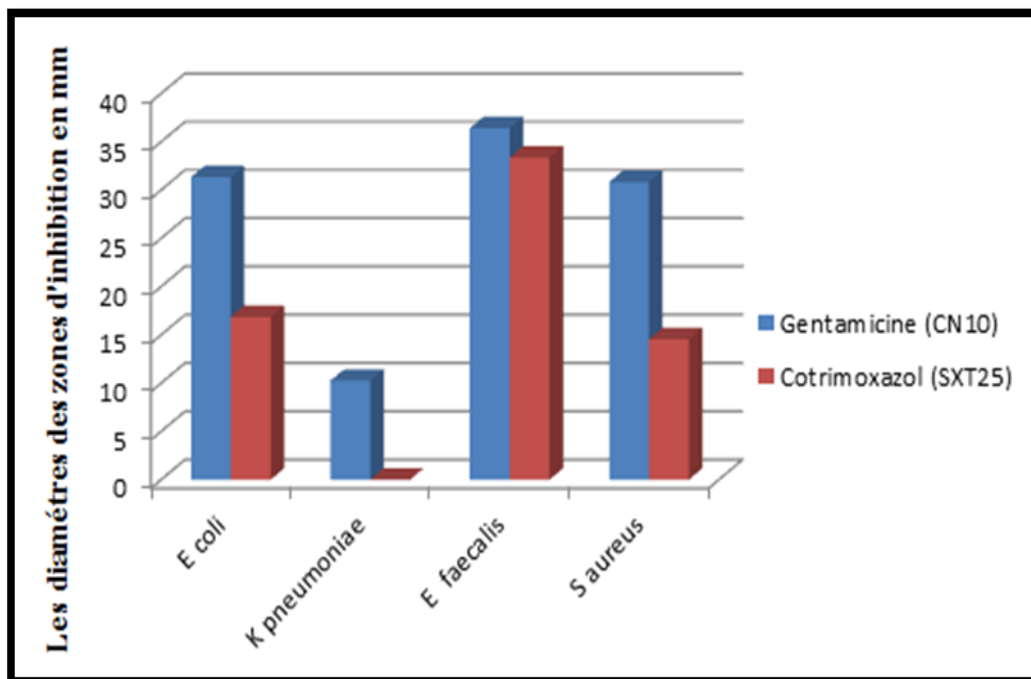
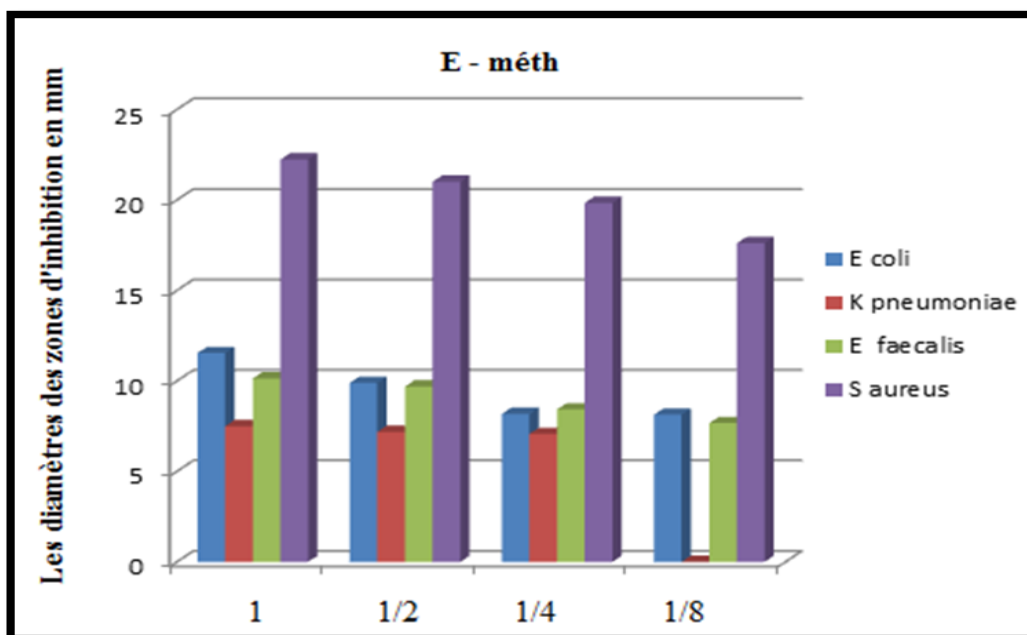
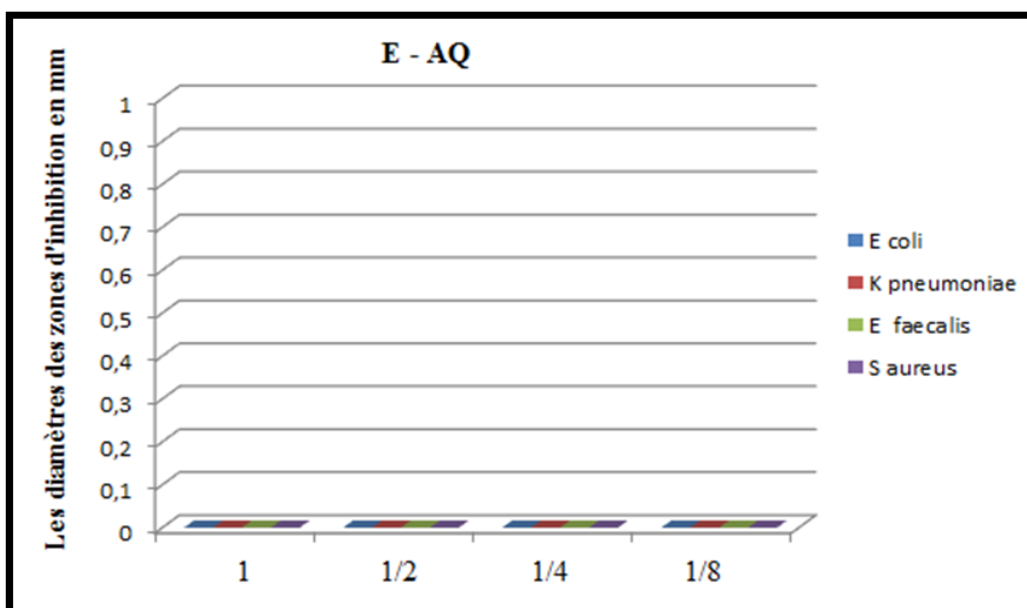


Figure 13 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition des deux antibiotiques sur les différentes souches testées.



**Figure 14** : Représentation graphique de diamètre des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de SO avec différentes bactéries



**Figure 15** : Représentation graphique de diamètre des zones d'inhibition des de l'extrait aqueux de SO avec différentes bactéries

**Thème :**  
**Caractérisation biochimique et évaluation des activités biologiques des extraits  
phénoliques de l'espèce *salvia officinalis* L.**

**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en : Biotechnologie Végétale**

**Résumé**

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de l'une des plantes de la famille des Lamiacées réputées pour leurs vertus thérapeutiques, nous sommes intéressés à l'étude de la plante *salvia officinalis* connue par sa richesse en matière active utilisée par la population locale dans différents thérapies.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante, anticoagulante et antibactérienne des polyphénols obtenus à partir des extraits de feuilles de *S.officinalis*.

Cette étude est initiée par un screening phytochimique réalisés sur différents extraits des feuilles de SO, qui nous a permis d'avoir une idée générale sur les différents groupes chimiques qu'elles contiennent.

Les résultats de dosage des polyphénols, montrent que les extraits méthanolique et aqueux de SO, sont riche en polyphénols totaux mais avec des quantités différentes. L'extrait méthanolique, présente une teneur en polyphénols totaux plus importante que l'extrait aqueux avec des valeurs ( $30.378 \pm 0.0467$  mgEAG/g) et ( $19.896 \pm 0,1176$  mgEAG/g) respectivement.

L'évaluation in vitro de l'activité antioxydante de nos extraits méthanolique et aqueux de SO ,utilisant le radical DPPH , révèle que *S. officinalis* possède de bonne activité antioxydante particulièrement pour l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux . Avec des IC50 de 0.119 mg /ml et de 0.196 mg/ml respectivement.

L'activité anticoagulante des polyphénols de SO a été également évaluée in vitro en utilisant les tests du temps de Quick (TQ) et du temps de céphaline-kaolin (TCK).Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence de ces polyphénols exercent une activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation.

Le temps de coagulation le plus élevé pour les deux tests est obtenu par le volume 30µL,ce dernier est capable d'allonger le temps de coagulation de TCK avec un valeur de 130.4s pour l'extrait méthanolique et un valeur de 36.4s pour l'extrait aqueux . Tandis que le temps d'allongements de TQ est de 107.67s pour l'extrait méthanolique et 15,67s pour l'extrait aqueux.

L'activité antibactérienne des deux extraits étudiés (méthanolique et aqueux) a été déterminée in vitro sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion sur disque. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique exerce un effet très puissant à inhiber

l'ensemble des souches testées particulièrement *S aureus* une zone d'inhibition de  $21,01 \pm 0,97$  mm a été mesurée. Alors que l'extrait aqueux ne présente aucun effet antibactérien vis-à-vis toutes les souches testées.

**Mots clés:** *salvia officinalis*, screening phytochimique, polyphénols, activité antioxydante, activité anticoagulante, activité antibactérienne.

**Mots clés:** *salvia officinalis*, screening phytochimique, polyphénols, activité antioxydante, activité anticoagulante, activité antibactérienne.

**Laboratoires de recherche :** laboratoire du Centre Universitaire Abd elhafide Boussouf Mila ; laboratoire d'analyses médicales de polyclinique de frères BOUAROUJE ; laboratoire d'analyses médicales : Dr. Mirouh.A à Ferdjioua.

Jury d'évaluation :

**Président :** HIMOUR Sara.

**Examineur :** YAHIA Abdelouhab.

**Promoteur :** Boukeria Sabah.

**Date de soutenance : 13 /07/2019**