



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريش

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

**Etude *in vitro* de l'activité antioxydante et l'activité
antibactérienne de l'extrait brut d'une
Plante médicinale**

Présenté par: M^r BELAKHDAR Zinneddine
M^{lle} BENTERKI Messaouda

Devant le jury :

Président : M^{me} MEZITI Asma MCB (Université de Bordj Bou Arréridj)

Encadrant : M^{me} BOUMERFEG Sabah Professeur (Université de Bordj Bou
Arréridj)

Examineur: M^{me} BENOUADAH Zohra MCB (Université de Bordj Bou Arréridj)

Année universitaire : 2020/2021

DEDICACES



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

A la mémoire de ma mère,

A mon cher père qui m'a doté d'une éducation digne et pour tous ses sacrifices, son amour, sa tendresse, son soutien et ses prières tout au long de mes études,

A mes chères sœurs Lynda, Sabah, Maissa et Yasmine et mon cher frère Mohammed pour leurs encouragements permanents, leurs soutiens moral, et leurs sources de bonheur,

A mes chères amies Fatma Djebarni, Boudchicha Aycha, Tiboub Kahina et Mhemel Imane pour leurs encouragements et leurs motivations,

A toute ma famille pour leurs soutiens tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Benterki Messaouda

DEDICACES



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

A mes chers parents qui m'ont doté d'une éducation digne et pour tous leurs sacrifices, leurs amours, leurs tendresses, leurs soutiens et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chères sœurs Faiza, Fadila, Ratiba, Ahlem et mes chers frères Sami, Laala et Abdeldjaber pour leurs encouragements permanents, leurs soutiens moral, et leurs sources de bonheur,

A mes chers amis Moussa Soualem, Meddour el Mondir, Taibi Hamza, Derradji Ridha, Chenouf Haithem, Khodour Rami, Adel Righi, Fedjiri Nabil, abdel mounaime, Mohammed pour leurs encouragements et leurs motivations,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Belakhder Zineeddine

Remerciements

Avant toutes choses, on remercie Allah, le tout puissant, pour nous avoir donné la force, la volonté, la santé et la patience pour réaliser et finaliser ce travail.

On exprime notre profonde gratitude à Pr. Sabah BOUMERFEG, qui a tout d'abord accepté la conduite et la direction de notre mémoire, pour ses conseils pertinents, ses orientations et ses encouragements qui nous ont permis de mener à terminer un remarquable travail.

A Mme MEZITI asma qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance. Nous lui adressons nos respectueux remerciements.

A Mme BENOUADAH Zohra qui a bien voulu accepter d'examiner ce travail et de participer au jury de ce travail. Nous lui exprimons nos profondes reconnaissances et nos sincères remerciements.

On tient à remercier sincèrement Dr. Faiza Baali pour sa disponibilité tout au long de ce travail, pour nous avoir guidées dans ce travail, pour sa patience, ses encouragements et surtout ses conseils judicieux.

J'adresse mes sincères remerciements à Dr. Benbouguera Nawel et Dr. Alliat Toufik, pour leurs conseils pertinents et leurs encouragements.

Je voudrais également remercier toute l'équipe de laboratoire de BBA, Rebai Khalil, Benyahia Fadhila, Djemouissetti Sabrina, Gahfif Wahiba, Dehamna Wassima, Sahli Ismahane Sabrina, Rahmouni Afef qui nous ont encouragé et aidé durant ce travail.

ملخص

Salvia verbenaca L المعروف باسم "أم المدمد" ، نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في الجزائر. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص الميثانولي *Salvia verbenaca L*. تم استخلاص المركبات الفينولية من الجزء الهوائي للنبات بمزيج من الماء والميثانول حيث كانت مدة الاستخلاص 4 و 24 ساعة بمرود يساوي 2,85 و 9,23 على التوالي. كما تم تقدير المحتوى الكلي للفينولات والفلافونيدات بطرق القياس الطيفية. حيث أظهرت النتائج أن أعلى محتوى من عديدات الفينول والفلافونويدات سجل بالنسبة للمستخلص الخام الخاص ب 24 ساعة ($2,51 \pm 77,38$ ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك (GAE)/مغ مستخلص و $0,3 \pm 10,43$ ميكروغرام مكافئ كيرسيتين (QE)/مغ مستخلص على التوالي) كما بينت نتائج اختبارات النشاط المضاد للأكسدة في المختبر ان للمستخلص الخام EBR (24 ساعة) تأثيراً قوياً في إزالة جذور DPPH ب IC_{50} تساوي $0,96 \pm 30,10$ ميكروغرام / مل مقارنة بذلك الخاص ب EBR (4 ساعة) حيث كانت IC_{50} مساوية ل $1,16 \pm 57,80$ ميكروغرام / مل ، كما تم إجراء اختبارين آخرين وهما اختبار ABTS واختبار استخلاص الحديد حيث أظهرت النتائج فعالية مضادة للجذور الحرة ممتازة ب IC_{50} مساوية ل $0,11 \pm 31,92$ ميكروغرام / مل ، على العكس من ذلك اظهر المستخلص قدرة ضعيفة على استخلاص الحديد حيث ان EC_{50} كانت مساوية ل ($67,26 \pm 564,6$ ميكروغرام / مل). من جهة اخرى تم تقديرالنشاط المضاد للبكتيريا ل EBR (24 ساعة) ضد أربع سلالات بكتيرية (*Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhymurium* و *cereus Bacillus*) حيث أظهرت النتائج ان أحسن نشاط مضاد للبكتيريا كان ضد سلالاتي *Salmonella typhymurium* و *cereus Bacillus*. من خلال النتائج المحصل عليها يمكن ان تكون هذه النبتة مرشحة لتطبيقات صيدلانية.

الكلمات المفتاحية: *Salvia verbenaca L*، مستخلص هيدرو ميثانول ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للبكتيريا.

Résumé

Salvia verbenaca L connue sous le nom: «Oum elmedamed», est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. La présente étude vise à évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique de la plante *Salvia verbenaca* L. L'extraction des polyphénols pendant 24h et 4h de la partie aérienne de la plante a abouti à deux extraits bruts (EBr) avec un rendement de 9,23 et 2,85 respectivement). La teneur en phénols totaux et en flavonoïdes a été quantifiée par des méthodes colorimétriques. Les résultats ont montré que l'extrait de 24h est le plus riche en phénols totaux et en flavonoïdes ($77,38 \pm 2,51$ mg EAG /g Extrait, $10,43 \pm 0,3$ mg EQ/g d'extrait respectivement). A l'issue des tests d'activité antioxydante *in vitro*, l'E.Br de 24h a montré un effet scavenger très puissant du radical DPPH (IC₅₀ $30,10 \pm 0,96$ µg/ml) par rapport à celui de 4h (IC₅₀ de $57,80 \pm 1,16$ µg/ml). Deux autres tests ont été réalisés en utilisant E.Br de 4h ; ABTS et chélation du fer ferreux. Le premier test démontre une bonne activité antiradicalaire avec une IC₅₀ de $31,92 \pm 0,11$ µg/ml, alors que l'extrait a révélé une capacité chélatrice très faible avec une valeur d'EC₅₀ de l'ordre de $564,6 \pm 26,67$ µg/ml. D'autre part l'extrait de 24h a été soumis à un criblage pour leur activité antibactérienne *in vitro*, vis-à-vis quatre souches de bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Bacillus cereus*). Les résultats ont montré que l'extrait semble efficace pour les deux bactéries : *Salmonella typhimurium* et *Bacillus cereus*. Ce qui en fait d'excellent candidat pour application pharmaceutique.

Mots clés : *Salvia verbenaca* L, extrait hydro-méthanolique, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

Salvia verbenaca L. known as «Oum elmedamed» is a medicinal plant widely used in Algerian traditional medicine. The aim of this work is to evaluate the antioxidant and the antibacterial activities of hydromethanolic extract of *S. Verbenaca* L. and to estimate its phenolic compounds content. The phenolic compounds were extracted from the arial parts using hydromethanolic solution for 24 and 4 hours. The total phenolic compounds, flavonoids and tannins were estimated using colorimetric methods while the antioxidant activity was evaluated using DPPH, ABTS and iron chelating assays. The antibacterial potential was screened against four bacterial strains, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhymurium* and *Bacillus cereus*, using the agar diffusion well method. The results showed that the extract of 24-h revealed the highest amount of total phenolic compounds (77.38 ± 2.51 mg EAG/g extract) and flavonoids (10.43 ± 0.3 mg EQ/g extract), as well as a promising antioxidant activity with good antiradical effect against DPPH (IC₅₀ of 30.10 ± 0.96 µg/mL), ABTS (IC₅₀ of 31.92 ± 0.11 µg/mL), and moderate iron chelating activity with an EC₅₀ value of 564.6 ± 26.67 µg/mL. On the other hand, the 4-h extract presented low amount of phenolic compounds and poor antioxidant activity. The results of the antimicrobial activity revealed also that the 24-h extract was very active against *S. typhymurium* and *B.cereus*. We may conclude that the 24-h extract was more efficient than the 4-h extract because of its richness in phenolic compounds and this makes it a good candidate for pharmaceutical application.

Keywords: *Salvia verbenaca* L, hydromethanolic extract, antioxidant activity, antibacterial activity.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS	2, 2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6- acide sulfonique
AC	Absorbance du control
AE	Absorbance de l'échantillon
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butylatedhydroxytoluene
CAT	Catalase
DI	Diamètre d'Inhibition
DMSO	Diméthylsilfoxyde
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG	Equivalent d'acide gallique
E.Br	Extrait brut
EC	Equivalent catéchine
EDTA	Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid
EHM	Extrait hydro-méthanolique
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
EQ	Equivalent de quercétine
Ex	Extrait
GPr	Glutathion Réductases
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathione réduit
HPLC/SM	High Pressure Liquid Chromatography
IC50	Concentration inhibitrice de 50 %
MH	Muller Hinton.
SD	Standard Déviation
SOD	SuperOxydes Dismutases

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Photo de <i>Salvia verbenaca</i> L.....	3
Figure 02 : Etapes de l'extraction des composés phénoliques	6
Figure 03 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique	7
Figure 04 : Courbe d'étalonnage de la quercétine	7
Figure 06 : Courbe d'étalonnage de catéchine	9
Figure 07 : Teneur en pigments liposolubles (mg/g d'extrait sec) de la plante <i>S. verbenaca</i> L	15

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les rendements des extraits bruts de 24h et 4h.....	13
Tableau II : IC ₅₀ des extraits bruts de 24h et de 4h de <i>S.verbenaca</i> L. et du standard (BHT).....	17
Tableau III : IC ₅₀ de l'extrait brut de 4h de <i>S.verbenaca</i> L. et du standard (BHT).....	18
Tableau IV : EC ₅₀ de l'extrait brut de 4h de <i>S.verbenaca</i> L. et du standard (EDTA).....	19
Tableau V : Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'extrait brut de 24h de <i>S.verbenaca</i> L. et la Gentamicine.....	20

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------------	---

MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel.....	5
II.1.1. Matériel végétal.....	5
II.1.2. Souches bactériennes.....	5
II.2. Méthodes.....	5
II.2.1. Extraction.....	5
II.2.2. Analyses phytochimiques.....	5
II.2.2.1. Dosage des polyphénols	6
II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	6
II.2.2.3. Dosage des pigments chlorophylliens	8
II.2.2.5. Dosage des tanins condensés « pro-anthocyanidines ».....	8
II.2.3. Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	9
II.2.3.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH).....	9
II.2.3.2. Test de réduction du radical-cation ABTS•+.....	10
II.2.3.3. Chélation du fer ferreux.....	10
II.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	11
II.2.5. Analyse statistique.....	11

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Rendements des extractions.....	13
III.2. Analyses phytochimiques.....	13
III.2.1. Dosage des polyphénols.....	13
III.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	14

III.2.3. Dosage des pigments chlorophylliens.....	15
III.2.4. Dosage des tanins condensés « pro-anthocyanidines ».....	16
III.3. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	16
III.3.1. Test de DPPH.....	16
III.3.2. Test d'ABTS.....	17
III.3.3. Test de chélation du fer ferreux.....	18
III.4. Activité antibactérienne.....	19
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	22
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	24

INTRODUCTION

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des ERO dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers, le diabète, les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Liguori *et al.*, 2018).

Le concept d'antioxydant biologique se réfère à toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celle d'un substrat oxydable, elle retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat de manière significative (Halliwell et Gutteridge, 1999). Les antioxydants sont des molécules qui peuvent donner des électrons et / ou des atomes d'hydrogène aux oxydants, ainsi arrêter les réactions en chaîne et par ce fait ils vont réduire le stress oxydatif et leurs paramètres de dommages cellulaires (Litescu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Siti *et al.*, 2015). Ils sont classés en antioxydants endogènes qui peuvent être enzymatiques; les superoxydes dismutase (SOD), la catalase (CAT), les glutathion peroxydases (GPx) et les glutathion réductases (GPr)) et non enzymatiques; (Glutathion (GSH), acide urique, bilirubine, mélatonine, coenzyme Q10) et en antioxydants exogènes (Vitamine C et E, caroténoïdes, polyphénols).

Les antioxydants de synthèse, généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides, sont suspectés d'avoir des effets néfastes sur la santé du consommateur. De plus la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques, ce qui pose un grand problème de santé publique. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques. A cet égard, l'homme s'est orienté vers la phytothérapie pour découvrir empiriquement les moyens de préserver sa santé.

Les plantes médicinales et aromatiques constituent une source importante et inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées (Reid *et al.*, 2018; Emilie *et al.*, 2019). Il est largement démontré que ces propriétés thérapeutiques sont fortement corrélées à la présence de centaines de composés bioactifs. Connues sous la dénomination de métabolites secondaires, ces composés constituent une large gamme de biomolécules, telles que les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes, Ces composés sont principalement utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Il est actuellement admis que la

consommation des antioxydants à base de plantes médicinales peut réduire le risque d'apparition de plusieurs maladies humaines liées au stress oxydatif (Tauchen *et al.*, 2015).

Les composés phénoliques constituent un large groupe de produits naturels largement distribués dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires dérivés des voies ; pentoses phosphate, shikimate et phénylpropanoïdes dans les plantes (Balasundram *et al.*, 2006). Ces composés sont d'une importance physiologique et morphologique considérable chez les végétaux, ils jouent un rôle important dans leur reproduction, leur pigmentation et dans leur mécanisme de défense contre les rayonnements ultra violets et les agents pathogènes (Hu et Luo, 2016). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement. Ces composés des plantes ont reçu plus d'attention en raison de leurs activités antimicrobiennes car la plupart sont capables de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbiens comme l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhérence ligands-hôte, et la neutralisation des toxines bactériennes dans les infections bactériennes et montrent un synergisme avec des antibiotiques (Daglia, 2012).

Dans ce contexte, cette étude a été menée sur *Salvia verbenaca* L., plante médicinale de la pharmacopée Algérienne (figure 01). Elle appartient à la famille Lamiacées et connue localement sous le nom de «Oum elmedamed», elle est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies telles que les maladies inflammatoires et les infections bactériennes. Pour cela, notre travail vise à atteindre les objectifs suivants:

- Préparation des extraits hydrométhanoliques à partir de la partie aérienne de *Salvia verbenaca* L.
- Détermination de la teneur en pigments chlorophylliens, caroténoïdes, en polyphénols et en flavonoïdes présent dans les extraits de la plante.
- Évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits hydrométhanoliques par des tests *in vitro*.

Tiges et feuilles: Les tiges sont quadrangulaires et poilues modérément à densément. Les feuilles sont portées par paires le long des tiges et sont de forme assez variable. Elles vont de la forme elliptique à la forme ovale avec des contours dentelés (crênelées), lobés ou profondément divisées (pinnatisées ou pinnatisectes) et sont également un peu velu (pubescent) avec une texture superficielle de grêle (DEEDI, 2016).

Fleurs : sont tubulaires de 7 à 13 mm de long de couleur bleu, portées dans des grappes allongées au bout des branches ou les racèmes terminales. Ces fleurs ont cinq sépales violacés ou verts (de 3.5 à 9 mm de long) moyennement velus. Les sépales sont fusionnés ensemble dans un tube finement nervuré (tube de calice). Les pétales principalement sans poils sont également fusionnés ensemble à la base dans un tube (le tube de la corolle). Chaque fleur a également deux étamines et un ovaire surmonté d'un style et inégalement stigmatisé à deux lobules. La floraison se produit tout au long de l'année (DEEDI, 2016).

Fruits : (le schizocarpe) se divise en quatre segments d'une seule graine (des méricarpes ou des nutlets) à maturité. Ces «graines» brunes sont largement ovales (largement ovoïdes) et de texture lisse (DEEDI, 2016).

La racine : est longue, fibreuse, et pousse une ou deux tiges grêles, un peu velues, presque simples, et hautes de 50 cm.



Figure 01 : Photo de *Salvia verbenaca* L. (Originale, 2021).

Royaume : Plantes

Sous royaume : Tracheobiontes

Embranchement : Spermatophytes

Division : Magnoliophytes

Classe : Magnoliopsides

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia verbenaca* L. (Judd *et al.*, 2002).

Cette plante est utilisée contre diverses maladies infectieuses et inflammatoires, le paludisme, les gonflements durs, les abcès, les tumeurs et le cancer (Khosravi Dehaghi *et al.*, 2014). Il est rapporté aussi que les espèces *Salvia* ont des effets contre les troubles respiratoires et gastro-intestinaux, l'hépatite, les maladies cardiovasculaires, la perte de mémoire, les troubles menstruels, les fausses couches et l'insomnie (Khosravi Dehaghi *et al.*, 2014). En médecine traditionnelle d'Afrique du Nord, le genre *Salvia* est l'un des remèdes de plantes les plus populaires. Cependant, la décoction de la partie aérienne était utilisée comme cholagogue, antiseptique, diurétique et astringent (Khlifi *et al.*, 2006). Beaucoup d'espèces de *Salvia* sont utilisées comme tisanes et arômes alimentaires, ainsi que dans les cosmétiques, la parfumerie et l'industrie pharmaceutique (Taarit *et al.*, 2010).

En ce qui concerne *S. verbenaca* L., dans les environs de la wilaya de Bordj Bou Arreridj en Algérie, les feuilles fraîches hachées sont appliquées, en cataplasme, sur les plaies et les abcès vidés pour faciliter leur cicatrisation (Khlifi *et al.*, 2006; Lahsissene *et al.*, 2009). Il est mentionné aussi dans le catalogue des plantes aromatiques et médicinales du Haut Atlas Oriental, que le décocté des feuilles de *S. verbenaca* L., est consommé pour traiter les spasmes, les coliques, l'anxiété et que la tisane des feuilles peut être utilisée pour traiter la frigidité, grippe, pharyngite, Angines.

MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Salvia verbenaca L. a été collectée au niveau de la région de draa lebyed (El achir), wilaya de Bordj Bou Arreridj au mois de février 2021. Elle a été confirmée par Dr. Alliat Toufik, faculté des sciences, Université Mohamed El bachir El ibrahimi, Bordj Bou Arreridj.

II.1.2. Souches bactériennes

Deux groupes de bactéries ont été sélectionnés:

- Des bactéries Gram positif (Gram+): *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ATCC 10876.
- Des bactéries Gram négatif (Gram-): *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) ATCC 13311.

Ces souches sont conservées dans le milieu MH (Muller Hinton).

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction

L'extraction des composés phénoliques de *S. verbenaca* L. a été effectuée selon la méthode décrite par Markham (1982). Brièvement, 100g de la partie aérienne (tige et feuilles) de la plante a été additionné à 1 litre de méthanol/eau distillée (85/15 %), le mélange a été soumis à une agitation pendant 24 heures, puis laissé reposer quelques heures, ensuite filtré. Le filtrat a été conservé à 4 °C alors que le précipité a été soumis à une deuxième extraction en suivant le même protocole avec 1 litre de méthanol / eau distillée (50/50 %). Le deuxième filtrat a été mélangé avec le premier, et le mélange a été filtré pour la dernière fois sur papier filtre et soumis à une évaporation rotative à 40 °C pour éliminer le méthanol. La solution obtenue est séchée à l'étuve afin d'obtenir une poudre de couleur brun foncé qui représente l'extrait brut (E.Br) (figure 02).



Figure 02 : Etapes de l'extraction des composés phénoliques.

Un autre extrait est préparé en suivant la méthode décrite par Mahmoudi et ses collaborateurs (2013) avec une légère modification. 10g de la partie aérienne de la plante a été macéré dans 100 ml de méthanol/eau (85/15%) pendant 4h à température ambiante, Le mélange par la suite a été filtré sur une mousseline puis par un papier filtre. Le filtrat est soumis à une évaporation rotative à 40°C dans un rota-vapeur (BÜCHI) pour éliminer le méthanol, l'extrait obtenu est séché puis stocké à température de 4°C jusqu'à son utilisation.

II.2.2. Analyses phytochimiques

II.2.2.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques des différents extraits est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Belkhiri *et al.*, 2017). En effet, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 200 μ l d'extrait ou standard avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (7.5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie (Figure 03) avec l'acide gallique (0-160 μ g/ml) et exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg Ex).

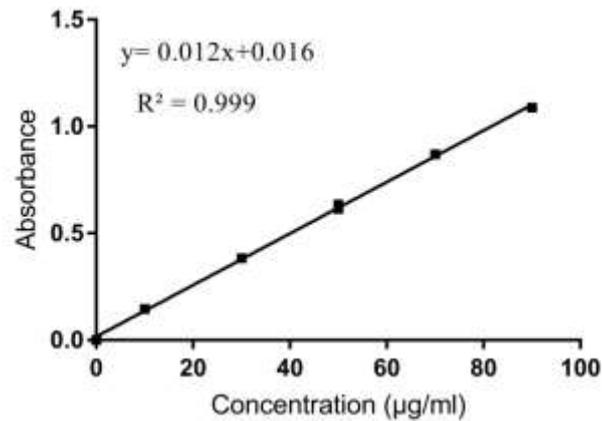


Figure 03 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Baghiani *et al.*, 2010) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. La méthode consistait à ajouter 1 ml d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie (Figure 04) avec la quercétine (0-30 $\mu\text{g/ml}$) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg Ex}$).

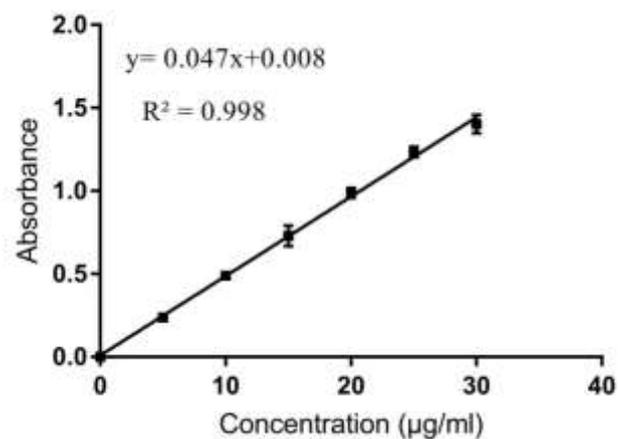


Figure 04 : Courbe d'étalonnage de la quercétine. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

II.2.2.3. Dosage des pigments chlorophylliens

Les teneurs en β -carotène, lycopène et chlorophylle de l'extrait ont été déterminées selon Nagata et Yamashita (1992). Brièvement, 100 mg de l'extrait est ajouté à 10 ml d'un mélange acétone-hexane (4:6 V/V) puis agité vigoureusement pendant 1 min, ensuite filtré à travers un papier whatman N°4. L'absorbance du filtrat est mesurée à différentes longueurs d'onde : 453 nm, 505 nm, 645 nm et 663 nm. La teneur en pigments est calculée suivant les équations indiquées ci-dessous et les résultats sont exprimés en milligramme de chlorophylle, caroténoïdes ou β -carotène /g d'extrait sec.

Calcule :

- β -carotène (mg/100 ml) = $0,216 \times A_{663} - 1,22 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$.
- Licopène (mg/100 ml) = $- 0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} - 0,372 \times A_{505} + 0,0806 \times A_{453}$.
- Chlorophylle a (mg/100ml) = $0,999 \times A_{663} - 0,0989 \times A_{645}$.
- Chlorophylle b (mg/100 ml) = $-0,328 \times A_{663} + 1,77 \times A_{645}$.

II.2.2.4. Dosage des tanins condensés « pro-anthocyanidines »

La teneur en pro-anthocyanidines est mesurée en suivant le protocole de (Sun *et al.*, 1998) in (Oyedmi et Afolayan, 2011) avec quelques modifications. Un volume de 0,5 ml de la solution d'extrait (1mg/ml) est mélangé avec 3 ml de la solution de vanilline (4%, W/V), préalablement préparée dans du méthanol, et 1,5 ml d'HCl (37%). Le mélange est bien agité, puis incubé pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance est lue à 500 nm. Le blanc est préparé en mélangeant 0,5 ml d'extrait avec 3 ml de méthanol et 1,5 ml d'HCl. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. La concentration des tanins est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la catéchine (Figure 06). Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine/g Ex.

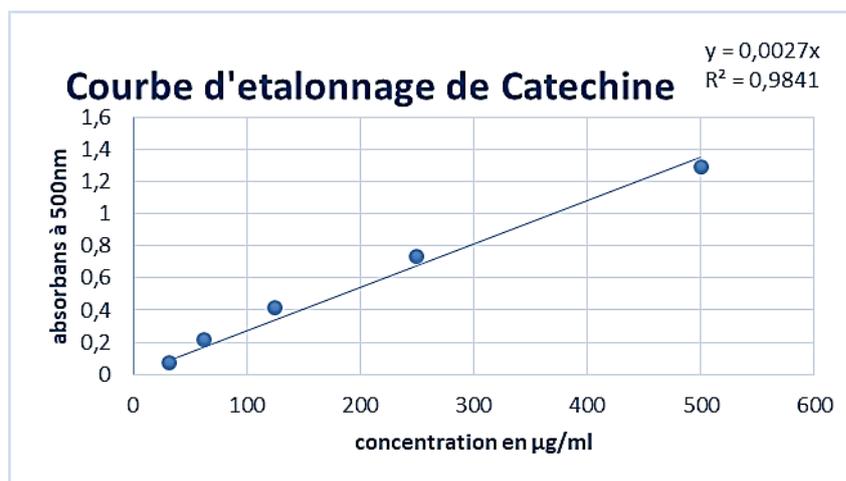


Figure 06 : Courbe d'étalonnage de catéchine. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

II.2.3. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

II.2.3.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)

L'activité anti-radicalaire de l'extrait de *S. verbenaca* L est déterminée en utilisant le DPPH comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par Moldovan et ses collaborateurs (2017). Le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette vire au jaune en présence de capteurs des radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine. Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Un volume de 50 µl de solution d'extrait ou standard (BHT) est ajouté à 1250 µl DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$I (\%) = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

I : Pourcentage d'inhibition exprimé en %.

A_c : Absorbance de la solution du DPPH (contrôle négatif).

A_t : Absorbance de la solution du DPPH en présence de l'échantillon.

La concentration inhibitrice de 50% du DPPH (IC₅₀) de l'extrait est calculée et exprimée en µg/mL et comparée avec celle du BHT.

II.2.3.2. Test d'ABTS⁺

L'activité anti-radicalaire de l'ABTS de l'extrait est mesurée par la méthode (Abu *et al.*, 2017). Une solution d'ABTS (7 mM) est préparée en mélangeant 72 mg d'ABTS avec 13,24mg de persulfate de potassium (2,45 mM) dans 20 ml d'eau distillée et laissée incubé pendant 16 h. La solution d'ABTS (7 mM) est diluée avec l'éthanol afin d'obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,002$ à 734 nm. 1,9 ml de cette solution sont ajoutés à 100 µl de solution d'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant 30 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 734 nm. Le blanc est préparé en remplaçant la solution d'extrait par l'eau distillée. Le BHT est utilisé comme antioxydant de référence.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et en activité antiradicalaire (IC50) de la même façon que ceux décrits précédemment pour le test DPPH.

II.2.3.3. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice de l'extrait est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe²⁺-Ferrozine, à différentes concentrations, selon la méthode de Ademiluyi *et al.* (2018). La solution d'échantillon (500 µl) est initialement mélangée avec 100 µl FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 µl de méthanol. Après 5 min, 100 µl de Ferrozine (5 mM dans le méthanol) sont additionnés au milieu réactionnel, le mélange est bien agité puis laissé agir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la formation d'un complexe avec une couleur violet (Fe²⁺-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. L'EDTA est utilisé comme chélateur de référence à un intervalle de concentration de (0-200 µg/ml).

L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous:

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance du test

Les concentrations (EC₅₀) de l'extrait (4h) qui produisent 50% d'activité chélatrice ont été calculées.

II.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

II.2.4.1. Méthode des puits de diffusion sur gélose

La méthode des puits de diffusion en milieu gélosé est utilisée pour la détermination de l'activité antibactérienne de l'extrait *S.verbenaca* L. selon la méthode décrite par Rahal, (2005) en présence de quatre souches bactériennes pathogènes dont 2 souches bactériennes Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25 923, *Bacillus cereus* ATCC 10876) et 2 Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311).

Les souches bactériennes sont cultivées pendant 24heures à 37 °C sur la gélose Mueller Hinton (MH). A partir de ces cultures jeunes, des suspensions bactériennes sont préparées dans l'eau physiologique stérile (NaCl 0.9 %) pour obtenir une turbidité équivalente à 0.5 McFarland (Aycan *et al.*, 2015). Les concentrations bactériennes de l'inoculum sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm sur un spectrophotomètre. Une DO de 0,08 à 0,1 correspond à une concentration de 1.5×10^8 UFC/ml (units forming colony/ ml).

La gélose Mueller-Hinton (MH) stérilisée, est distribuée dans des boîtes de Petri stériles de 9 cm de diamètre à raison de 15 ml par boîte, après solidification, elles ont été inoculées avec les microorganismes testés. Après l'étalement des souches sur les plats MH, des puits de 07 mm de diamètre sont coupés à partir des géloses inoculées et remplis d'un volume de 30 μ l d'extrait solubilisé dans le DMSO en trois concentrations (100, 200 et 300 mg/ml). Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les diamètres des zones d'inhibition produites par l'extrait sont mesurés en millimètres (Sokmen *et al.*, 2004).

Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm SD. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Graph pad Prism7, en utilisant le test-t de « Student » pour la signification, Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 ($p \leq 0.05$).

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Rendements des extractions

L'extraction des composés phénoliques de *S. verbenaca* L. a été effectuée par les méthodes de Markham (1982) et Mahmoudi et ses collaborateurs (2013) pour obtenir les deux extraits hydro-méthanoliques (Extrait de 24 h et 4h).

Le tableau (I) résume les résultats des rendements de l'extrait de la plante *S. verbenaca* L. obtenus par l'extraction de 24h et 4h des composés phénoliques par le méthanol (85%) exprimés en pourcentage (%) ; par rapport au poids sec de la poudre végétale.

Tableau I : Les rendements de l'extrait brut de 4h et 24h.

Extrait	4h	24h
Rendement (%)	2,85	9,23

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale a montré que l'EBr de 24h représente le rendement le plus élevé (9,23%), tandis que l'EBr de 4h affiche un rendement plus faible qui est de 3 fois inférieur à celui de l'EBr de 24h, peut être est due à la durée d'exposition solvant / plante.

L'EBr de *S. verbenaca* L. a fait objet de quelques études, dont le rendement a été supérieur au notre. Notamment celle de Belkhiri (2018) qui a obtenu un rendement de 14,97%.

De nombreux facteurs influencent le rendement, la teneur, les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique de l'espèce, les conditions environnementales, la technique et durée de l'extraction, le séchage, la période et le milieu de récolte, les pratiques culturales et l'âge du matériel végétal (El oualilalami *et al.*, 2013).

III.2. Analyses phytochimiques

III.2.1. Dosage des polyphénols

Les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes et les tanins, sont des métabolites secondaires impliqués dans de nombreux processus physiologiques et doués d'activités biologiques multiples. Dans le présent travail, leur dosage a été réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, une méthode qui satisfait aux

critères de faisabilité et de reproductibilité, de la disponibilité du réactif de Folin et elle est bien standardisée.

Les polyphénols totaux dans ces extraits sont dosés selon la méthode de Folin-Ciocalteu utilisant l'acide gallique comme un composé phénolique standard.

L'analyse quantitative des polyphénols est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage présentée dans (Figure 03) exprimée en μg équivalent d'acide gallique par mg de la matière sèche.

Les résultats des deux extraits (24h-4h) ont montré que la concentration des polyphénols est de $77,38 \pm 2,51$ mg EAG/g Ex et $36,13 \pm 1,87$ μg EAG/mg Ex respectivement qui est inférieure à celle trouvée dans les travaux de Belkhiri (2018) qui a obtenu une teneur de $177,56 \pm 2,51$ mg EAG/g Ex.

III.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes comme l'un des groupes les plus divers et répandus des composés naturels, se sont probablement les composés phénoliques naturels les plus importants. Ces composés possèdent un large spectre d'activités chimiques et biologiques, y compris les propriétés anti-radicalaires.

La méthode AlCl_3 est simple, peu coûteuse et offre une bonne sensibilité. Cette méthode permet de déterminer la teneur en flavonoïdes totaux, qui forment un complexe avec AlCl_3 même en présence d'autres composés phénoliques, qui ne peut pas former un complexe avec AlCl_3 .

L'analyse quantitative des flavonoïdes est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage présentée dans (Figure 04) exprimée en μg équivalent de quercétine par mg d'extrait.

Les résultats obtenus ont montré que la concentration des flavonoïdes dans l'extrait de 24h et 4h sont de l'ordre de $10,43 \pm 0,3$ mg EQ/g Ex et $04,14 \pm 0,14$ μg EQ/mg Ex, respectivement. La teneur des flavonoïdes dans l'EBr de 24h est similaire par rapport à celle trouvée par Belkhiri (2018) ($08,13 \pm 0,45$ mg EQ/g Ex).

Les résultats du dosage montrent que la proportion en polyphénols est nettement supérieure à celle des flavonoïdes, ceci suggère que les polyphénols présents ne sont pas

tous des flavonoïdes, il peut y avoir présence d'autres polyphénols tels que les tanins catéchiques ainsi que les coumarines (Al-Khateeb *et al.*, 2012). Ces rapports permettent de conclure que la variation des flavonoïdes n'est pas relative à celles des polyphénols, cela peut être expliqué par la prépondérance des polyphénols non flavonoïdes.

Des études récentes ont montré que plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques, et flavonoïdes tels que des facteurs géographiques, climatiques, génétiques, ainsi que le degré de maturation de la plante et la durée de stockage. (Aktumsek *et al.*, 2013).

III.2.3. dosage des pigments chlorophylliens

Les résultats de la (Figure 07) montrent que l'extrait hydro-méthanolique de la plante étudiée est riche en chlorophylles (a-b) avec des valeurs de 103,06 mg et 38,61mg, respectivement et 23,11 mg de β -carotène. Les résultats ont montré aussi l'absence des lycopène dans l'extrait.

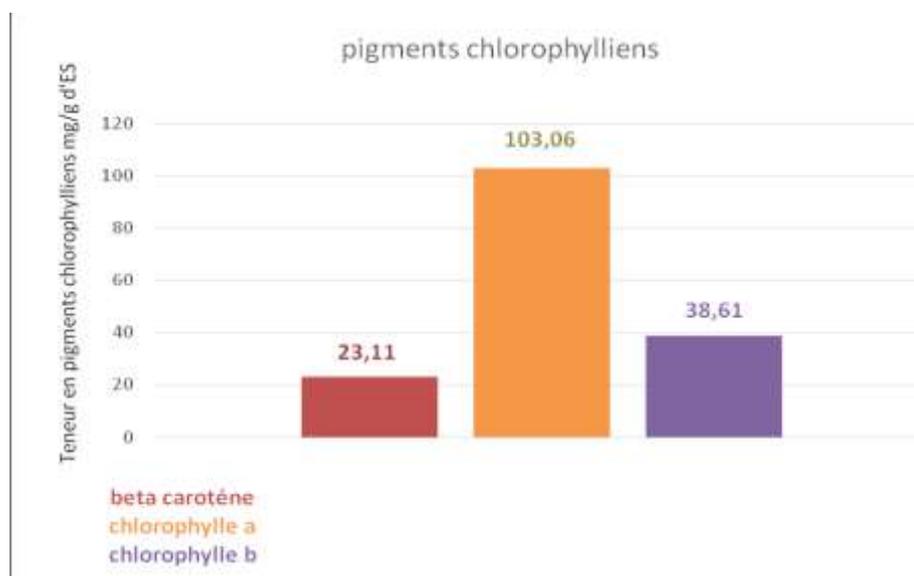


Figure 07 : Teneur en pigments liposolubles (mg/g Ex) de la plante *S.verbenaca* L.

III.2.4. Dosage des tanins condensés « Pro-anthocyanidines »

L'analyse quantitative des tanins condensés est déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage présentée dans (Figure 06) exprimée en mg équivalent catéchine par g d'extrait.

Les résultats montrent que la concentration de Pro-anthocyanidines dans l'EBr de 4h est d'une valeur de $8,39 \pm 0,009$ mg EQ/g Ex.

III.3. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

De nombreuses méthodes qui sont différentes sur le plan de leurs principes d'analyse et les conditions expérimentales et les antioxydants ont des contributions différentes au potentiel antioxydant total (Wojdyło *et al.*, 2007). Pour cette raison l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Ksouri *et al.*, 2009). Dans ce travail, trois tests sont réalisés pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* de la plante étudiée à savoir : DPPH, ABTS et chélation du Fer ferreux.

III.3.1. Test de DPPH

Le test de DPPH est l'un des procédés les plus fréquemment utilisés parmi les tests antioxydants. Cette méthode est utile compte tenu de sa grande reproductibilité, de la facilité de prise de mesures à la température ambiante sans risque de dégradation thermique, de son efficacité, de son coût relativement avantageux et de sa rapidité (Akar *et al.*, 2017). De plus, il peut accueillir de nombreux échantillons sur une courte période et il est suffisamment sensible pour détecter des ingrédients actifs à de faibles concentrations. Au cours de ce test, le radical chromogène violet réagit avec les donneurs d'électrons et d'hydrogènes à l'hydrazine jaune pâle correspondante, et la réaction est surveillée à 517 nm (Musa *et al.*, 2016). En d'autres termes, le test de piégeage du DPPH est basé à la fois sur les voies de transfert d'électrons et de transfert d'atomes d'hydrogène (Liang et Kitts, 2014).

L'IC₅₀ d'un extrait est inversement proportionnelle à sa capacité antioxydante, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration de DPPH de 50%, qui est obtenue par interpolation à partir d'une analyse de régression linéaire (Oliveira *et al.*, 2016). Le tableau (II) représente les IC₅₀ des différents extraits et standard, c'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé.

Tableau II : IC₅₀ des extraits bruts de 24h et de 4h de *S.verbenaca* L. et du standard (BHT).

IC ₅₀ (µg/mL)		
Extrait 24h	Extrait 4h	BHT
30,10±0,96***	57,80±1,16***	18,80±0,31

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3). *** : p ≤ 0.001, comparé avec le contrôle positif BHT.

L'EBr de 24h de *S.verbenaca* L. a montré une forte activité antioxydante vis à vis du radical DPPH avec une valeur de (30,10±0,96 µg/ml) par rapport au BHT (p ≤ 0.001), suivi par l'EBr de 4h (57,80±1,16µg/ml).

Dans une autre étude réalisée par (Tepe *et al.*, 2008) ont trouvé que la capacité anti radicalaire de l'extrait méthanolique de la même plante (IC₅₀ de 14,30 ± 1,42 µg/mg), est supérieur à celle trouvée dans la présente étude. D'après (Hayouni *et al.*, 2007) la nature du solvant est l'un des paramètres les plus susceptibles d'influencer le taux d'extraction et affecter ainsi l'activité antioxydante des extraits.

III.3.2. Test de l'ABTS

La capacité antiradicalaire/antioxydante des produits naturels à partir des plantes est évaluée avec diverses méthodes. Ces méthodes chimiques sont basées sur la capacité des composés à éliminer les radicaux libres synthétiques. Le DPPH et l'ABTS sont des radicaux libres largement utilisés comme modèle pour estimer la capacité antioxydante de plusieurs extraits de plantes (Olszowy et Dawidowicz, 2018; Kasote *et al.*, 2019). L'activité anti-radicalaire *in vitro* des extraits de *S. verbenaca* L. est déterminée par le test d'ABTS, ce dernier en réagissant avec le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) forme le radical ABTS^{•+} de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et conduire à la décoloration du mélange. L'activité anti-radicalaire est estimée par la valeur IC₅₀ qui se lie à la capacité antioxydante, elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la quantité en ABTS, plus la valeur IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Oliveira *et al.*, 2016). Le tableau (III) représente les IC₅₀ de l'extrait brut de 24h et le standard BHT.

Tableau III : IC₅₀ de l'extrait brut de 4h de *S.verbenaca* L. et du standard (BHT).

IC ₅₀ (µg/mL)	
Extrait 4h	BHT
31,92±0,11***	08,29±0,09

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3). *** : $p \leq 0.001$, comparé avec le contrôle positif BHT.

L'extrait brut de 4h de *S.verbenaca* L. a montré une bonne activité anti-radicalaire vis-à-vis le radical ABTS (IC₅₀= 31,92±0,11 µg/ml), mais cette activité reste inférieure par rapport au BHT ($p \leq 0.001$).

Diverses études ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturels à piéger les radicaux libres qui dépend d'un certain nombre de paramètres: la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule (Kitagawa *et al.*, 1992). La capacité anti radicalaire est différente d'une espèce de plante à une autre ce qui explique la différence des résultats entre la présente étude réalisée avec l'espèce *Salvia verbenaca* L. et celle de Kamatou *et al.* (2010) qui est réalisée avec une autre espèce appelée *Salvia amurii* (IC₅₀ de 11,9 ± 1,52 µg/ml).

L'activité antiradicalaire d'antioxydants naturels tels que les flavonoïdes pourrait être due à leur richesse en groupement d'hydroxyles. Plusieurs études sur les antioxydants de plantes du genre *Salvia* ont attribué leurs activités aux principaux composés phénoliques et les flavonoïdes tels que l'abietane, les diterpènes, l'acide rosmarinique, l'apigénine méthylique, le carnosate, le genkwanin et la cirsimaritrine (Tepe, 2008; Ben Farhat *et al.*, 2015a; Ben Farhat *et al.*, 2015b ; Kostic *et al.*, 2015).

III.3.3. Test de chélation du fer ferreux

La capacité de chélation des métaux est importante car elle réduit le métal de transition agissant comme catalyseur pour générer les premiers radicaux et initier les réactions en chaîne oxydantes à médiation radicalaire dans les systèmes biologiques ou alimentaires. Les agents chélateurs ioniques peuvent également inhiber la réaction de Fenton et la peroxydation lipidique (Apak *et al.*, 2016). Ainsi, la capacité d'un antioxydant à chélater les métaux est une propriété antioxydante importante à mesurer. Les ions ferreux sont généralement présents dans les systèmes alimentaires et sont considérés comme des pro-oxydants efficaces. La ferrozine et le Fe²⁺ forment un complexe coloré (couleur

violette). En présence d'agents chélateurs, le complexe ion ferrozine- Fe^{2+} est perturbé, ce qui entraîne une diminution de la couleur du complexe. La mesure de la réduction de couleur a permis d'estimer l'activité de chélation des métaux pour le chélateur coexistant (Kumar et Jain, 2015). Les capacités de chélation augmentaient à mesure que la concentration augmentait (tableau IV).

Tableau IV : EC_{50} de l'extrait brut de 4h de *S.verbenaca* L. et du standard (EDTA).

EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Extrait	EDTA
564,6 \pm 26,67***	05,37 \pm 0,13

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3). *** : $p \leq 0.001$, comparé avec le standard EDTA.

Les résultats montrent que l'extrait brut (4h) de *S.verbenaca* L. présente un effet chélateur modéré avec une concentration effectrice EC_{50} de 564,6 \pm 26,67 $\mu\text{g/ml}$ par rapport au standard utilisé EDTA (EC_{50} de 5,37 \pm 0,13 $\mu\text{g/mL}$) ($p \leq 0.001$).

Egalement une activité chélatrice plus élevée de l'extrait méthanolique de *S.verbenaca* L. a été rapportée dans les travaux de Mamache (2021) (IC_{50} de 70,39 \pm 1,13 $\mu\text{g/ml}$). La nature du solvant est l'un des paramètres les plus susceptibles d'affecter l'activité antioxydante des extraits (Hayouni *et al.*, 2007).

L'activité antioxydante de l'extrait semble être due à la présence des polyphénols, qui agit comme réducteurs en transférant un atome d'hydrogène sur le radical alors il se transforme en une molécule stable (Mathew, S *et al.*, 2015; González *et al.*, 2018). Plusieurs travaux ont mis en évidence les propriétés chélatrices des polyphénols, des acides phénoliques (Capecka *et al.*, 2005) et plus particulièrement des flavonoïdes (Fernandez *et al.*, 2002 ; Heim *et al.*, 2002 ; Guo *et al.*, 2007). Cette capacité à former des complexes stables avec les métaux de transition, notamment le fer et le cuivre est souvent proposée comme l'un des mécanismes d'action antioxydante de ces produits naturels (Laguerre *et al.*, 2007).

III.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le développement de la résistance bactérienne vis-à-vis les antibiotiques disponibles actuellement nécessite de la recherche de nouveaux agents antibactériens.

L'activité antibactérienne de l'extrait brut (24h) de *S.verbenaca* L. est basée sur la méthode des puits de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton agar. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau (V). De manière générale, des effets antibactériens significatifs et variables ont été obtenus avec les différentes doses, aussi bien sur des bactéries Gram-positives que Gram-négatives. Trois concentrations ont été testées 100 mg/ml, 200 mg/ml et 300 mg/ml dont le volume versé dans chaque puits est de 30µl.

Tableau V : Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'extrait brut de 24h de *S.verbenaca* L. et la Gentamicine.

Souches testées	Zone d'inhibition (mm)			
	EBr 100 mg/mL	EBr 200 mg/mL	EBr 300 mg/mL	Gentamicine 10µg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	36
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	6,45±0,37 ***	7,9±0,51 ***	9,12±0,35 ***	22
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	21
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	6,37±0,35 ***	6,46±0,65 ***	7,95±0,82 ***	33

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3). *** : p ≤ 0.001, comparée avec le contrôle positif (Gentamicine). (p < 0.05, test de Dunnett).

Les résultats révèlent des réponses variables en fonction des souches et de la concentration de l'extrait testée. On note que l'extrait n'exhibe aucun effet sur *E. coli* et *S. aureus*, ces souches se sont montrées résistantes. Par ailleurs, *S. typhimurium* et *B. cereus* sont moyennement sensibles à 300 mg/ml d'extrait, les zones d'inhibition enregistrées sont respectivement de 9,12 et 7,95 mm.

L'EBr de 24h à différentes concentrations a montré un effet significatif contre *S. typhimurium* et *B. cereus* (p < 0.001) avec des zones d'inhibitions de 22 et 33 mm, respectivement. Toutes les souches testées ont montré une sensibilité à la Gentamicine.

De nombreuses études ont déjà signalé la sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux Gram- (Riahi *et al.*, 2013 ; Brahmī *et al.*, 2016). La résistance des bactéries Gram négatives peut être attribuée à la présence de la membrane externe entourant la paroi de la cellule, pratiquement imperméable aux composés lipophiles grâce aux charges négatives de la surface de son revêtement lipopolysaccharidique.

De nombreux travaux ont rapporté que plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins favorisent les mécanismes de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes. L'activité antibactérienne des plantes serait attribuée à ces métabolites secondaires (Falleh *et al.*, 2008). Une grande quantité des flavonoïdes synthétisée par les plantes pour lutter contre les infections bactériennes, donc il n'est pas surprenant qu'ils présentent une activité antimicrobienne *in vitro* (Tsuchiya *et al.*, 1996; Cushine et Lamb 2005). L'activité bactérienne des flavonoïdes a été expliquée par leur capacité de former des complexes avec des protéines extracellulaires solubles et avec la paroi cellulaire bactérienne (Tsuchiya et Iinuma, 2000; Cushine et Lamb, 2005).

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Conclusion et perspectives

La phytothérapie représente l'un des domaines les plus importants de la médecine traditionnelle partout dans le monde. Il existe une tendance croissante à corréler les constituants phytochimiques des plantes avec ses activités pharmacologiques. De plus, les plantes médicinales et aromatiques sont considérées comme une source importante de nouveaux médicaments à cause de leur constitution précieuse en molécules bioactives. La présente étude a tenté de contribuer à la valorisation de *S.verbenaca* L. très utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour ses vertus thérapeutiques en établissant une relation entre ses compositions chimiques et ses activités biologiques.

L'extraction des composés phénoliques par macération (méthanol 85%) a permis de montrer que la plante *S.verbenaca* L. est riche en composés phénoliques avec un rendement estimé de 9,23%, ce dernier est important par rapport à d'autres travaux similaires. Le solvant hydro-méthanolique et la durée d'extraction (24h) sont avérés les meilleurs conditions pour un bon rendement d'extraction des composés phénoliques.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux contenus dans les extraits (EBr 4h et 24h) a montré que l'EBr de 24h est relativement riche en polyphénols et en flavonoïdes.

Le criblage préliminaire *in vitro* de l'EBr de 4h réalisé par les trois tests (DPPH, ABTS, Chélation du Fer ferreux) a montré une activité antioxydante importante, alors que l'EBr de 24h s'est montré plus efficaces contre le radical DPPH et cela est due à sa richesse en composés phénoliques par rapport a celui de 4h. D'autre part, une activité antibactérienne considérable vis-à vis quelques souches testées a été marquée.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, mais des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination des composés actifs dans l'extrait de *S.verbenaca* L. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de l'extrait étudié :

- Fractionnement et isolement des différents constituants de l'extrait hydro-méthanolique, afin de connaître la ou les molécules à l'origine des effets antioxydants, antibactériens et l'éventuelle synergie entre elles par l'HPLC/SM afin d'établir une relation structure-activité.

- Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo*.
- Etude de l'efficacité de cet extrait dans le domaine alimentaire afin d'établir son utilité comme agents antioxydants ou antimicrobiens naturels dans la sécurité alimentaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abu F., Mat Taib C. N., Mohd Moklas M. A., & Mohd Akhir S., 2017:** Antioxidant properties of crude extract, partition extract, and fermented medium of dendrobium sabin flower. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Ademiluyi, A. O., Aladeselu, O. H., Oboh, G., & Boligon, A. A. 2018 :** Drying alters the phenolic constituents, antioxidant properties, α -amylase, and α -glucosidase inhibitory properties of *Moringa (Moringa oleifera)* leaf. *Food science & nutrition*, 6(8), 2123-2133.
- Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., & Duran, A. 2013 :** Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 290-296.
- Al-Khateeb, E., Ohan, A. A. & Al-Ani H. 2012:** Cytotoxicity studies of *Tamus communis* root and berries HEP-2 and AMN-3 carcinoma cell. *Hygei: Journal for drugs and medicines*, 4(2), 1-5.
- Auditeau, E., Chassagne, F., Bourdy, G., Bounlu, M., Jost, J., Luna, J., ... & Boumediene, F. 2019 :** Herbal medicine for epilepsy seizures in Asia, Africa and Latin America: A systematic review. *Journal of ethnopharmacology*, 234, 119-153.
- Baghiani, A., Boumerfeg, S., Belkhiri, F., Khennouf, S., Charef, N., Harzallah, D. & MosaadAttia, A.W. 2010:** Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus L* extracts grow wild in Algeria flora. *ComunSci. I*(2), 128-136.
- Belkhiri, F., Baghiani, A., Zerroug, M. M., & Arrar, L. 2017 :** Investigation of antihemolytic, xanthine oxidase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salvia verbenaca L.* aerial part extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(2), 273-281.
- Blumenthal M. 2000:** Herbal medicine, expanded commission E monographs in Integrative Medicine Communications, Newton.
- Brahmi, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., ... & Mohamed, C. 2016 :** Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium L.* and *Mentha rotundifolia (L.)* Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96-105.
- Bruneton, J. 1993 :** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier, Paris, 915 p..
- Capecka, E., Mareczek, A., & Leja, M. 2005 :** Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food chemistry*, 93(2), 223-226.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. 2005 :** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
- DEEDI, 2016:** (Department of Employment, Economic Development and Innovation) Special edition of Environmental Weeds of Australia for Biosecurity Queensland.
- Dougherty, T. J., & Pucci, M. J. (Eds.). 2011 :** *Antibiotic discovery and development*. Springer Science & Business Media.

- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. and Abdelly, C. 2008 :** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- Farhat, M. B., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., Landoulsi, A., & Jordán, M. J. 2015a :** Antioxidant properties and evaluation of phytochemical composition of *Salvia verbenaca* L. extracts at different developmental stages. *Plant foods for human nutrition*, 70(1), 15-20.
- Farhat, M. B., Jordán, M. J., Chaouch-Hamada, R., Landoulsi, A., & Sotomayor, J. A. 2015b :** Changes in phenolic profiling and antioxidant capacity of *Salvia aegyptiaca* L. by-products during three phenological stages. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 791-797.
- Farhat, M. B., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. 2013 :** Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49, 904-914.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., & Pollio, A. 2011 :** Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16(2), 1486-1507.
- González-Paramás, A. M., Ayuda-Durán, B., Martínez, S., González-Manzano, S., & Santos-Buelga, C. 2019 :** The mechanisms behind the biological activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 26(39), 6976-6990.
- Guignard, J.-L. 1996 :** Biochimie végétale. Masson, Paris, 255 p..
- Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F., & Chasteen, N. D. 2007 :** Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions*, (43), 4951-4961.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. 2015 :** *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- 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 chemistry*, 105(3), 1126-1134.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. 2002 :** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Steven, P. 2002 :** Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. 1ere Ed : Paris et Bruxelles. pp. 369-384.
- Kamatou, G. P., Viljoen, A. M., & Steenkamp, P. 2010 :** Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, 119(2), 684-688.
- Khlifi, S., El Hachimi, Y., Khalil, A., Es-Safi, N., Belahyan, A., Tellal, R., & El Abbouyi, A. 2006 :** In vitro antioxidant properties of *Salvia verbenaca* L. hydromethanolic extract. *Indian Journal of Pharmacology*, 38(4), 276.
- KHOSRAVI, D. N., Ostad, S. N., Maafi, N., Pedram, S., Ajani, Y., Hadjiakhoondi, A., & Khanavi, M. 2014 :** Cytotoxic activity of the essential oil of *Salvia verticillata* L.
- KITAGAWA, S., FUJISAWA, H., & SAKURAI, H. 1992 :** Scavenging effects of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by electron spin resonance spectrometry. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 40(2), 304-307.

- Kostić, M., Zlatković, B., Miladinović, B., Živanović, S., Mihajilov-Krstev, T., Pavlović, D., & Kitić, D. 2015 :** Rosmarinic Acid Levels, Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Extracts from *Salvia verbenaca* L. Obtained with Different Solvents and Procedures. *Journal of Food Biochemistry*, 39(2), 199-208.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., ... & Abdelly, C. 2009 :** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical toxicology*, 47(8), 2083-2091.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. 2007 :** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282.
- Lahsissene, H., Kahouadji, A., & Hseini, S. 2009 :** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia, revue de botanique*.
- Lalam, A. E. O., Fouad, E. A., Ouedrhiri, W., CHAHDI, F. O., Guemmouh, R., & Greche, H. 2013 :** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*. *Les technologies de laboratoire*, 8(31).
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... & Abete, P. 2018 :** Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757.
- Litescu, S. C., Eremia, S., & Radu, G. L. 2010 :** Methods for the determination of antioxidant capacity in food and raw materials. In *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 241-249). Springer, Boston, MA.
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., & Manian, S. 2013 :** Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *Journal of food science and technology*, 50(4), 687-695.
- Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. 2013 :** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- Markham, K.R. 1982 :** Techniques of flavonoid identification (Chapter 1 and 2). First edition, Academic Press : London. p.1-113.
- Mathew, S., Abraham, T. E., & Zakaria, Z. A. 2015 :** Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5790-5798.
- Moldovan, Z., Buleandră, M., Oprea, E. & Mînea, Z. 2017:** Studies on chemical composition and antioxidant activity of *Rudbeckia triloba*. *J Anal Methods Chem*. 2017: 3407312.
- Nagata, M., & Yamashita, I. 1992 :** Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39(10), 925-928.
- Oyedemi, S.O & Afolayan, A.j. 2011:** In vitro and in vivo Antioxidant Activity of Aqueous Leaves Extract of *Leonotis* (L.) R.Br. *International Journal of Pharmacology*. 7(2), 248-256.
- Rahal K. 2005 :** Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale
- Riahi, L., Chograni, H., Elferchichi, M., Zaouali, Y., Zoghalmi, N., & Mliki, A. 2013 :** Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 46, 290-296
- Rodriguez-Amaya, D. B. 2001 :** A guide to carotenoid analysis in foods.

- Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M. M., & Toth-Markus, M. 2005** : Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38(8-9), 1023-1029.
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. J. V. P. 2015** : The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular pharmacology*, 71, 40-56.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., ... & Sahin, F. 2004** : The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, 15(8), 627-634.
- Solís-López, M., Durán-Moreno, A., Rigas, F., Morales, A. A., Navarrete, M., & Ramírez-Zamora, R. M. 2014** : Assessment of copper slag as a sustainable Fenton-type Photocatalyst for water disinfection. In *Water reclamation and sustainability* (pp. 199-227). Elsevier.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. 1998** : Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4267-4274.
- Taarit, M. B., Msaada, K., Hosni, K., Amor, N. B., Marzouk, B., & Kchouk, M. E. 2010** : Chemical composition of the essential oils obtained from the leaves, fruits and stems of *Salvia verbenaca* L. from the northeast region of Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 22(5), 449-453.
- Tauchen, J., Duskocil, I., Caffi, C., Lulekal, E., Marsik, P., Havlik, J., ... & Kokoska, L. 2015** : In vitro antioxidant and anti-proliferative activity of Ethiopian medicinal plant extracts. *Industrial Crops and Products*, 74, 671-679.
- Tepe, B. 2008** : Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technology*, 99(6), 1584-1588.
- Tsuchiya, H., & Iinuma, M. 2000** : Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7(2), 161-165.
- Tyler, V.E., Brady, L.R., Robbers, J.E. 1881**: Pharmacognosy. Lea &Febiger, Philadelphia, 520 p..
- Wang, Y., Chun, O. K., & Song, W. O. 2013** : Plasma and dietary antioxidant status as cardiovascular disease risk factors: a review of human studies. *Nutrients*, 5(8), 2969-3004.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. 2007** : Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 105(3), 940-949.