

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE SAIDA « Dr. MOULAY TAHAR »



Faculté des Sciences

Département de Biologie



Laboratoire Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes

THESE

Présentée par

BENABDESLEM Yasmina

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat En Sciences en Biologie

Thème

Etude ethno-pharmacologique, phytochimique et évaluation des activités biologiques *in-vitro* et *in-vivo* de *Salvia argentea*

Soutenue le 04/07/2019 devant la commission d'examen composée de:

<u>Qualité</u>	<u>Nom et Prénoms</u>	<u>Grade</u>	<u>Etb d'origine</u>
Président	Pr. SLIMANI Miloud	Professeur	Univ. de Saida
Rapporteur	Pr. KAHLOULA Khaled	Professeur	Univ. de Saida
Co-Rapporteur	Dr. HACHEM Kadda	Maitre de conférences « A »	Univ. de Saida
Examineur	Dr. GHOMARI Samia	Maitre de conférences « A »	Univ. de Sidi Bel Abbes
Examineur	Dr. BARKAT Mohamed Salih	Maitre de conférences « A »	Univ. de Tlemcen
Examineur	Dr. ADLI Djallel Eddine Houari	Maitre de conférences « A »	Univ. de Saida

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Même si cette thèse est un travail personnel, je souhaite ici rendre hommage et exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation et à son aboutissement.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon Directeur de thèse, **Pr. Kahloula Khaled**. Tout au long de ce travail, il a su m'apporter un soutien constant, une disponibilité, une écoute, une confiance et des conseils précieux et avisés à la hauteur de ses compétences et de ses réelles qualités humaines.

Ils s'adressent aussi à **Dr. Hachem Kadda**, Maître de Conférences « A » à l'Université de Saida, qui a également encadré ce travail de recherche. Son écoute, ses connaissances, ses critiques et ses conseils constructifs m'ont guidé tout au long de cette thèse.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance à notre **Pr. SLIMANI Miloud**, Professeur à l'Université de Saida, pour les conseils judicieux qu'il a su me donner tout au long de ce travail et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Mes remerciements s'adressent aussi à **Dr. Barkat Mohamed Salih**, Maître de Conférences « A » à l'Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail et en siégeant à ce jury.

J'exprime ma gratitude à **Dr. Ghomari Samia**, Maître de Conférences « A » à l'université Djillali Liabes de sidi bel abbes, pour ses conseils pertinents au cours de cette thèse mais aussi pour l'hommage qu'elle me fait en participant à ce jury.

Que **Dr. ADLI Djalel Eddine Houari**, Maître de Conférences « A » à l'Université de Saida, trouve l'expression de mon profond respect pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens, tout particulièrement, à témoigner une vive reconnaissance aux professeurs : **Kaid-Harche meriem**, **Bouabdallah Louisa**, **Ighilhariz Zohra**, **Benaceur Malika**, **Vincent Gloaguen** et **Manuelle Bodin**. Votre compétence, votre rigueur scientifique et votre clairvoyance m'ont beaucoup aidé pour l'accomplissement de ce travail.

Je tiens à adressé un hommage à la mémoire de **Mme Khouaidjia Malika** enseignante à l'Université d'Oran. Que Dieu lui accorde sa sainte miséricorde.

Les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mes parents. Votre confiance, vos encouragements, me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Mention spéciale à mon mari, que je ne remercierai jamais assez pour son soutien pendant mes périodes de doutes et pour ses multiples encouragements répétés.

Enfin je renouvelle toute ma sympathie à ceux qui m'ont accordé du temps et m'ont témoigné un soutien constant durant ce long travail de recherche. Merci tout spécialement à Tema, Amira, Asmaa, Lamia et Amel ainsi qu'à toute ma famille et belle famille.

Table des matières

Introduction générale	1
Données bibliographiques	5
I. <i>Salvia argentea</i>	6
1. Généralité sur la plante	6
2. Répartition géographique de <i>Salvia argentea</i>	7
3. Description botanique de <i>Salvia argentea</i>	7
4. Systématique de <i>Salvia argentea</i>	8
5. Caractères morphologiques de <i>Salvia argentea</i>	8
6. Composition chimique de <i>Salvia argentea</i>	11
7. Les thrichomes glandulaires des sauges	12
8. Les thrichomes glandulaires de <i>Salvia argentea</i>	13
9. L'utilisation traditionnelle de <i>Salvia argentea</i>	16
II. Les plantes médicinales et les métabolites secondaires	17
1. Les plantes médicinales	17
1.2. Propriétés et principes actifs des plantes médicinales	17
1.2.1. Les plantes à alcaloïdes	18
1.2.2. Les plantes à flavonoïdes	18
1.2.3. Les plantes à saponosides	18
1.2.4. Les plantes à hétérosides	18
1.2.5. Les plantes à vitamines	19
1.2.6. Les plantes à tanins	19
2. Les métabolites secondaires	20
2.1. Généralités sur le métabolisme secondaire des plantes supérieures	20
2.2. Principaux champs d'application	23
2.3. Principes généraux de classification des métabolites secondaires	23
2.4. Classification des métabolites secondaires	25
2.4.1. Les composés azotés.....	25
2.4.2. Les composés aromatiques-composés phénoliques	29
2.4.3. Les esters, alcools et aldéhydes et dérivés simples de l'acide cinnamique	31
2.4.4. Les Isoprénoïdes ou terpénoïdes.....	36
2.4.5. Les Hétérosides.....	39
3. Compartimentation tissulaire et sub-cellulaire de la synthèse et de l'accumulation des métabolites secondaire.....	45
4. Relations entre métabolisme secondaire et métabolisme primaire.....	45

III. Activités biologiques des métabolites secondaires	47
1. Activité antioxydante	47
2. Activité microbienne	47
3. Activité antivirale	50
4. Activité insecticide et antiparasitaire	50
5. Activité anti-inflammatoire	51
IV. Nickel	52
1. Les propriétés physico-chimiques du Nickel	52
2. Les dérivés du Nickel et leurs utilisations	53
3. Principales sources d'exposition	54
4. L'apport alimentaire	55
5. La toxico-cinétique du Nickel	55
6. La toxicité du Nickel	56
7. Effets du Nickel sur les différents organes	57
8. Effets cancérogènes	59
Matériels et méthodes	60
I. Matériel végétal	61
II. L'étude ethno-pharmacologique	62
1. Présentation de la zone d'étude	62
2. Méthodes d'études	62
III. Caractérisation de la poudre de feuilles de <i>Salvia argentea</i>	63
1. Analyses physico-chimique de la poudre de feuilles de <i>Salvia argentea</i>	64
2. Analyses de control de qualité microbiologiques de la poudre de feuilles de <i>Salvia argentea</i>	65
3. Analyses du criblage phytochimique de la poudre de feuilles de <i>Salvia argentea</i>	67
IV. Evaluation de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des différents extraits des feuilles de <i>Salvia argentea</i>	70
1. Matériels biologique (Souches microbiennes)	70
2. Méthodes d'extractions	71
3. Tests microbiologique	72
V. Evaluation de l'activité thérapeutique <i>in vivo</i> de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Salvia argentea</i> vis-à-vis d'une intoxication subchronique au Nickel	76
1. Animaux d'expérimentation	76

2. Répartition des groupes	77
3. Prélèvement des échantillons	77
4. Techniques histologiques	77
5. Analyses statistiques	77
Résultats et discussions	79
I. Etude ethnopharmacologique de la poudre des feuilles de <i>Salvia argentea</i>	80
1. Enquête ethno pharmacologique	80
2. Caractérisation physicochimique de la poudre de feuilles de <i>Salvia argentea</i>	83
3. Analyse phytochimique	84
4. Analyses microbiologiques	86
II. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des différents extraits des feuilles de <i>Salvia argentea</i>	87
1. Résultats.....	87
2. Discussions	97
III. Résultats de l'évaluation de l'activité thérapeutique <i>in vivo</i> de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Salvia argentea</i>	101
1. Résultats.....	101
2. Discussions	108
Conclusion générale	111
Références bibliographiques	114
Annexes	134
Article	142

Résumé

Une étude ethno-pharmacologique a été menée à l'échelle de la région de Saida auprès des herboristes en vue d'évaluer l'utilisation de *Salvia argentea*, une espèce végétale originaire d'Afrique du Nord, appartenant à la famille des Lamiacées. Ainsi 42 herboristes ont été interviewés individuellement. L'étude a montré que *Salvia argentea* est utilisée exclusivement dans le traitement des maladies respiratoires. Les feuilles constituent la partie la plus utilisée, généralement sous forme de poudre et administrée par voie orale. Les résultats de la caractérisation physico-chimiques, microbiologiques et du screening phytochimique de la poudre des feuilles de *Salvia argentea* attestent d'une sécurité certaine et lui confèrent une assurance de qualité phytothérapeutique. La mise en évidence du pouvoir thérapeutique des différents extraits de *Salvia argentea in vitro* a été réalisée, en testant l'activité antimicrobienne sur 16 souches bactériennes et 4 souches de levures. Cette évaluation a été réalisée en utilisant deux techniques : La méthode de diffusion en milieu gélosé et celle des micro-dilutions. Les résultats montrent que les trois extraits (éthanolique, méthanolique et aqueux) se sont montrés efficaces sur la majorité des germes testés avec des zones d'inhibitions allant jusqu'à (23±2,6) mm chez les bactéries et (24±1,5) mm chez les levures. De même, la méthode des dilutions en milieu liquide a révélé des résultats importants avec des valeurs de CMI entre 3,90 et 7,81 mg/ml pour les souches bactériennes (*K. pneumonia*, *P. multocida*, *S. aureus MR*, *C. freundii*,) et une valeur de CMI de l'ordre de 3,90 mg/ml enregistrée pour la souche de levure (*S.cerevisiae*). Les valeurs du rapport CMB/CMI enregistrées pour la majorité des souches bactériennes attribuent aux extraits de *Salvia argentea* une action bactéricide vis-à-vis des souches bactériennes multi-résistantes. En outre, les valeurs du rapport CMF/CMI exprimées pour les différents extraits vis-à-vis des levures montrent clairement une action fongicide sur les trois souches de *C. albicans*. Tandis que pour *S. cerevisiae* les extraits exercent une action fongistatique. Le pouvoir thérapeutique de l'extrait aqueux de *Salvia argentea in vivo* a également été évalué. Des modifications biochimiques et histologiques ont été rapportées chez les rats wistar suite à une intoxication au sulfate de nickel administré par voie orale à une concentration de 0,2% et une co-administration par gavage de l'extrait aqueux de *Salvia argentea* à une dose de (100mg/kg) de poids corporel, durant une période de 21 jours. Les résultats obtenus des dosages biochimiques principalement relatifs à la fonction hépatique et rénale (ALAT, ASAT, urée, créatinine) montrent une régulation des valeurs de ces paramètres chez les rats intoxiqués suite à l'administration de l'extrait aqueux comparés aux rats intoxiqués et non traités. En effets, l'étude histologique montre une protection de l'architecture hépatique et pulmonaire chez les rats traités par l'extrait aqueux comparé aux rats intoxiqués. Cette série d'expériences *in vivo* a montré que l'EAS est doté d'un pouvoir protecteur contre les dommages causés par les effets toxiques du Nickel. Ces résultats des valorisations *in vitro* et *in vivo*, viennent en appui à l'utilisation traditionnelle de *Salvia argentea* contre les maladies infectieuses et inflammatoires du système respiratoire.

Mots clés : *Salvia argentea* ; ethnopharmacologie ; phytochimie ; activités biologiques ; *in vitro* ; *in vivo*

Abstract

An ethno-pharmacological study was conducted in the Saida region among herbalists to assess the use of *Salvia argentea*, a plant species originating from North Africa, belonging to the Lamiaceae family. Thus 42 herbalists were interviewed individually. The study showed that *Salvia argentea* is used exclusively in the treatment of respiratory diseases. The leaves are the most commonly used part, usually in powder form and administered orally. The results of the physico-chemical, microbiological and phytochemical characterization and screening of the powder of *Salvia argentea* leaves attest to a certain safety and give it a phytotherapeutic quality assurance. The therapeutic power of the various *Salvia argentea* extracts was demonstrated in vitro by testing the antimicrobial activity on 16 bacterial strains and 4 yeast strains. This evaluation was carried out using two techniques: the agar diffusion method and the micro-dilutions method. The results show that the three extracts (ethanolic, methanolic and aqueous) were effective on the majority of germs tested with inhibition zones up to (23±2.6) mm in bacteria and (24±1.5) mm in yeasts. Similarly, the liquid dilution method revealed significant results with MIC values between 3.90 and 7.81 mg/ml for bacterial strains (*K. pneumonia*, *P. multocida*, *S. aureus* MR, *C. freundii*) and an MIC value of about 3.90 mg/ml recorded for the yeast strain (*S. cerevisiae*). The CMB/CMI values recorded for the majority of bacterial strains attribute to *Salvia argentea* extracts a bactericidal action against multi-resistant bacterial strains. In addition, the CMF/CMI values expressed for the different extracts against yeasts clearly show a fungicidal action on the three strains of *C. albicans*. For *S. cerevisiae*, however, the extracts have a fungistatic action. The therapeutic efficacy of the aqueous extract of *Salvia argentea* in vivo was also evaluated. Biochemical and histological changes have been reported in wistar rats following oral nickel sulfate intoxication at a concentration of 0.2% and co-administration by gavage of the aqueous extract of *Salvia argentea* at a dose of (100mg/kg) body weight over a 21-day period. The results obtained from biochemical assays mainly related to hepatic and renal function (ALAT, ASAT, urea, creatinine) show a regulation of the values of these parameters in intoxicated rats following administration of the aqueous extract compared to intoxicated and untreated rats. Indeed, the histological study shows protection of the hepatic and pulmonary architecture in rats treated with aqueous extract compared to intoxicated rats. This series of in vivo experiments has shown that EAS has a protective power against damage caused by the toxic effects of nickel. These results of in vitro and in vivo valuations support the traditional use of *Salvia argentea* against infectious and inflammatory diseases of the respiratory system.

Key words: *Salvia argentea*; ethnopharmacology; phytochemistry; biological activities; *in vitro*; *in vivo*

المخلص

أجريت دراسة عرقية - فارماكولوجية في منطقة سعيدة لدى أخصائيين في علم الاعشاب لتقييم استخدام نبات *Salvia argentea* وهو نوع من النباتات في شمال أفريقيا ، ينتمي إلى عائلة لامياسية. وهكذا تم إجراء استجابات مع 42 اخصائي في علم الاعشاب كل على حد ي . و اظهرت الدراسة ان النبات يستخدم حصرى في علاج أمراض الجهاز التنفسي الأوراق هي الجزء الأكثر استخدامًا، وعادةً ما تكون في شكل مسحوق ويتم إعطاؤها عن طريق الفم. نتائج الفحوصات الكيميائية الفيزيائية والميكروبيولوجية والكيميائية النباتية لمستخلص أوراق نبات *Salvia argentea* تشهد على مطابقتها لمعايير السلامة والجودة المتعارف عليها وتعطيها ضمانا للاستعمال في العلاج. تسليط الضوء على قوة الخلاصات العشبية من *Salvia argentea* لظهار فاعلية مختلف المستخلصات في مقاومة الميكروبات المجهرية المتمثلة في 20 سلالة ميكروبية (16 بيكتيريا و04 خمائر) وذلك باستخدام طريقتين: طريقة الزرع علي وسط جيلوزي صلب و طريقة التراكيز السائلة. تظهر النتائج أن المستخلصات الثلاثة (إيثانولي ،ميثانولي ومائي) فعالة على معظم الجراثيم التي تم اختبارها بمناطق تثبيط تتراوح من 8.5 إلى 24 ملم . بالمثل، أظهرت طريقة التخفيف في الوسط السائل نتائج مهمة مع MICs بين 3.90 و 15.62 ملغ / مل. النتائج المسجلة لدى 12 سلالات بكتيرية تعزى الى أن المستخلصات الثلاثة ذات فاعلية مضادة للميكروبات وذلك في نسبة التراكيز التثبيط المنخفضة بالنسبة للسلالات البكتيرية متعددة المقاومة التالية: *P. multocida*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *C. fetus*, *E. cloacae* et *C. freundii*, تم تقييم القدرة المضادة للالتهاب للمستخلص المائي *Salvia argentea* على الفئران المسمومة بالنيكل 0.2 % بالإضافة الى ذلك أظهرت لائحة قيم المؤشرات الحيوية في الفئران المسمومة بعد إعطاء المستخلص المائي مقارنة مع الجرذان المسمومة غير المعالجة تحسنا ملحوظا. من جهة اخرى أظهرت الدراسة النسيجية حماية الأنسجة الكبدية والرئوية في الفئران التي عولجت بالمستخلص المائي 100 ملغ/كغ مقارنة بالفئران المسمومين. وقد أظهرت هذه السلسلة من التجارب في الفئران ان المستخلص المائي *Salvia argentea* له تأثير وقائي ضد الأضرار الناجمة عن التأثيرات السامة للنيكل. هذه النتائج تدعم الاستخدام التقليدي لنبات *Salvia argentea* ضد الأمراض الالتهابية و الميكروبات المجهرية في الجهاز التنفسي.

الكلمات المفتاحية: *Salvia argentea* , دراسة عرقية – فارماكولوجية , الكيميائية النباتية , الفاعلية البيولوجية.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01. Biométrie des différents organes de <i>Salvia argentea</i>	9
Tableau 02. Propriétés physico-chimiques du nickel (OEHHA, 2001)	52
Tableau 03. Les différentes formes physiques du nickel (INRS, 1992 ; INERIS, 2005 ; Brignon <i>et al.</i> , 2006)	54
Tableau 04. La situation géographique du lieu de récolte	61
Tableau 05. Les souches microbiennes utilisées	70
Tableau 06. Paramètres physico-chimiques des échantillons de poudre de feuilles de <i>Salvia argentea</i>	83
Tableau 07. Résultats du screening phytochimiques de la poudre de feuilles de <i>Salvia argentea</i>	85
Tableau 08. Résultats des analyses de contrôle de qualité microbiologique des échantillons de poudre de feuilles de <i>Salvia argentea</i>	86
Tableau 09. Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus	87
Tableau 10. Sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits de <i>Salvia argentea</i> . (Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm)	88
Tableau 11. Sensibilité des souches de levures aux différents extraits de <i>Salvia argentea</i> . (Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm)	89
Tableau 12. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides de l' E.A.S vis-à-vis des bactéries testées (mg/ml)	91
Tableau 13. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales fongicides de l' E.A.S vis-à-vis des levures testées (mg/ml)	92
Tableau 14. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides de l' E.E.S vis-à-vis des bactéries testées (mg/ml)	93
Tableau 15. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales fongicides de l' E.E.S vis-à-vis des levures testées (mg/ml)	94
Tableau 16. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides de l' E.M.S vis-à-vis des bactéries testées (mg/ml)	95
Tableau 17. Réponses de (<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la pénicilline) aux contrôles antibiotiques	95
Tableau 18: Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales fongicides de l' E.M.S vis-à-vis des levures testées (mg/ml)	96

LISTE DES FIGURES

Figure 01. Répartition géographique du genre <i>Salvia</i> . Nombre approximatif d'espèces répertoriées dans chaque région (Jay <i>et al.</i> , 2004).	6
Figure 02. <i>Salvia argentea</i> au stade de floraison (Benabdesslem <i>et al.</i> , 2017)	7
Figure 03. Aspect général de <i>Salvia argentea</i> L et ses différentes parties selon Quezel et Santa (1962)	10
Figure 04. Des trichomes glandulaires sur la surface des feuilles de sauge observés par microscopie électronique à balayage. (Venkatachalam <i>et al.</i> , 1984)	13
Figure 05. Observations par microscopie électronique à transmission des trichomes glandulaires tecteurs de <i>Salvia argentea</i> L.	14
Figure 06. Observations par microscopie électronique à transmission des trichomes glandulaires sécréteurs de <i>Salvia argentea</i> L.	15
Figure 07. Acides aminés non-protéinoogènes	26
Figure 08. Exemples de Bétalaines	26
Figure 09. Molécules utilisées comme poisons (strychnine)	27
Figure 10. La colchicine	28
Figure 11. La caféine	28
Figure 12. Exemple de glycoalcaloïde : la Solanine	29
Figure 13. Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes	30
Figure 14. Structure des alcools	31
Figure 15. Coumarine	32
Figure 16. Les flavonoïdes	33
Figure 17. Les principales catégories de flavonoïdes	33
Figure 18. Proanthocyanidines	35
Figure 19. Pentagalloylglucose	36
Figure 20. Les composés terpéniques	36

Figure 21. Exemples du pinène constituant majeur de l'essence de térébenthine et du menthol	38
Figure 22. Sesquiterpène linéaire (farnésol) et sesquiterpène bicyclique (le caryophyllène)	38
Figure 23. Les caroténoïdes	39
Figure 24. L'amygdaline	41
Figure 25. Les différents composés des glucosinolates	42
Figure 26. Saponoside triterpénique : glucoside de l'acide médigénique	43
Figure 27. La digitoxine	44
Figure 28. Relations entre métabolisme secondaire et métabolisme primaire (Gravot, 2009)	46
Figure 29. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques (Hemaiswarya et al., 2008)	49
Figure 30. <i>Salvia argentea</i> au stade de la floraison	61
Figure 31. Carte de la situation géographique de la wilaya de Saida	62
Figure 32. Répartition des points d'enquête à l'échelle de la wilaya de Saida	63
Figure 33. La récupération du solvant (eau, éthanol ou méthanol) dans le ballon réceptacle.	72
Figure 34. L'évaporateur rotatif de type heidolph G1.	72
Figure 35. La concentration à sec du filtrat (évaporation progressive et totale du solvant).	72
Figure 36. Les microplaques préparées avant l'incubation	75
Figure 37. Informations sur les herboristes enquêtés	80
Figure 38. Type de collecteurs de <i>Salvia Argentea</i>	81
Figure 39. L'avis des herboristes sur l'efficacité de <i>Salvia argentea</i>	81
Figure 40. La partie utilisée de <i>Salvia argentea</i>	82
Figure 41. Mode de préparation	82
Figure 42. L'évolution du poids corporel chez les différents lots de rats	101
Figure 43. L'évolution des poids des organes (poumons et foie)	102
Figure 44. Variation des taux de l'Aspartame Amino transférase pour les différents lots expérimentaux de rats	103

Figure 45. Variation des taux de des ALAT pour les différents lots expérimentaux de rats	104
Figure 46. Variation des taux de l'urée pour les différents lots expérimentaux de rats	104
Figure 47. Variation des taux de créatinine pour les différents lots expérimentaux des rats	105
Figure 48. Evolution du taux des thrombocytes pour les différents lots expérimentaux de rats	106
Figure 49. Observations microscopiques des coupes histologiques des parenchymes pulmonaires des différents lots de rats	107
Figure 50. Observations microscopiques des coupes histologiques des tissus hépatiques des différents lots de rats	108

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association française de normalisation.

ATCC : American Type Culture Collection

CF : les coliformes fécaux

CHCl₃ : trichlorométhane

CMB : la concentration minimale bactéricide

CMF: la concentration minimale fongicide

CMI : la concentration minimale inhibitrice

Co: lot co-administratif

CT : coliformes totaux

DMSO : Le diméthylsulfoxyde

DO : la densité optique

EAS : l'extrait aqueux de *Salvia argentea*

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EES : l'extrait éthanolique de *Salvia argentea*

EMS : l'extrait méthanolique de *Salvia argentea*

FeCl₃ : Le chlorure de fer

FMAT : Flore mésophile aérobie totale

FNS : Numération de la formule sanguine

H₂SO₄ : l'acide sulfurique

HCl : l'acide chlorhydrique

I_m : indice de mousse

L x H x P : les dimensions des cages

MR: Méthicilline-resistant

N : numéro de tube

NaCl : le chlorure de sodium

NaOH : hydroxide de sodium

NH₄OH : l'ammoniaque

Ni : le Nickel

NiS₂ : le sulfure de nickel

PCA : la gélose pour dénombrement, ou PCA standard (*Plate Count Agar*)

pH : potentiel d'hydrogène

QACQE : laboratoire régional de contrôle de la qualité et de la répression des fraudes Saida

S.a : *Salvia argentea*

SPSS: Statistical Package for the social sciences

T: lot témoin

TRt : lot traité

TSE : le bouillon Tryptone-sel

UFC : unité formant une colonie

UV : Le rayonnement ultraviolet

VRBG : la gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre

WTA : la teneur en cendre exprimée en pourcentage

Introduction Générale

Depuis des siècles, l'homme a utilisé les plantes dans plusieurs domaines, tels que la parfumerie, la pharmacologie et l'agroalimentaire, grâce à leurs propriétés découvertes par hasard. Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas leur rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. C'est après le développement de la chimie que les huiles essentielles extraites de plantes commencent à livrer leurs secrets et leurs composants principaux ont été identifiés (**Fleurentin, 2013**).

Ces dernières années, plus de 100 000 substances sont connues. Des recherches récentes ont montré que bon nombre d'entre elles ont un rôle défensif pour les plantes (**El Haib, 2008**). Les plantes se défendent par divers moyens physiques (feuilles hérissées de spinules) et chimiques en synthétisant des métabolites secondaires extraordinairement diversifiés. Ainsi plus de 2000 espèces végétales dotées de propriétés insecticides ont été répertoriées. Les molécules du métabolisme secondaire des plantes appartiennent à des familles chimiques très diverses telles que les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les stéroïdes. Les Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) constituent une véritable banque de ces molécules chimiques (**Benayad, 2008**).

Lorsque la médecine expérimentale fit son apparition au XVIII^e siècle, on arriva à isoler, puis à produire plusieurs substances actives. Ainsi donc, les chimistes prirent la première place pour l'élaboration des médicaments : la chimiothérapie était née. Les médicaments de synthèse apparurent et rapidement s'étendirent à tous les domaines thérapeutiques. Les résultats étaient là : ces traitements étaient très efficaces, tous les espoirs étaient permis d'une longue vie à ces produits. Mais petit à petit, les succès devinrent moins spectaculaires, les résultats se révélèrent de plus en plus douteux, des effets nocifs firent même leur apparition. Ces constatations provoquèrent « le retournement » de nombreux chercheurs qui portèrent alors leur intérêt sur la médecine par les plantes, la phytothérapie. Celle-ci remet à l'honneur de très anciennes médications, mais n'a pas encore dévoilé tous ses secrets, l'une de ses branches principales ouvre quantité d'horizons : il s'agit de ce mode de traitement qui utilise les essences des plantes : l'aromathérapie (**Morand et al., 1974**).

De même pour les antibiotiques, qui depuis leur découverte au début au XX^e siècle, ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribuer à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables.

L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme. La montée des résistances est due à la prescription immodérée et souvent inappropriée des antibiotiques. Administrés à titre curatif ou préventif, les antibiotiques favorisent l'élimination des bactéries sensibles et la sélection des plus résistantes. Ce phénomène de résistance aux antibiotiques est général et concerne toutes les espèces bactériennes (**Morand et al., 1974**).

La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par les bactéries résistantes entraînent souvent une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité. L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour, finalement, conduire à une impasse thérapeutique. Aussi, au vu de la propagation du phénomène de résistance et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme la plus prometteuse car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives (**El amri et al., 2014**).

Depuis quelques années, un nombre croissant de médecins et de pharmacologues redécouvrent avec intérêt la valeur thérapeutique et l'innocuité des végétaux. Les agents cliniques sont recherchés pour guérir une grande diversité de maladies dues aux tumeurs, aux virus et au dysfonctionnement du système nerveux central (**Fleurentin, 2013**).

Le présent travail s'inscrit dans l'axe de recherche de la phytothérapie. Il se veut une évaluation des activités biologiques d'une plante appartenant à la famille des Labiées (Lamiaceae). Cette famille comprend environ 6000 espèces et près de 210 genres dont la plupart ont une importance économique due à leur richesse en huiles essentielles. Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiaceae sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et iridoïdes glycosylés.

Des études portant sur des huiles essentielles de différentes espèces du genre *Salvia* ont montré leurs activités, anti-microbiennes, anti-inflammatoires, en plus de leurs utilisations en cosmétique et en agro-alimentaire.

Cependant les travaux sur l'espèce *Salvia argentea* comme plante à propriétés médicinales sont rares voir inexistantes, c'est la raison pour laquelle il nous a paru primordial de commencer par un travail d'enquête, premier de son genre.

Cette étude consiste d'une part à mener une enquête ethno-pharmacologique dans la région de Saïda, auprès des herboristes en contact avec les plantes médicinales. Les résultats de l'enquête ethno pharmacologique vont nous permettre d'identifier le rôle potentiel de *Salvia argentea* dans la pharmacopée traditionnelle et l'impact induit dans la prophylaxie.

L'enquête doit être suivie d'une caractérisation physico-chimique, microbiologique et d'un criblage phytochimique cherchant à éclairer et déceler la présence des groupes de familles chimiques dans une préparation médicamenteuse à base de *Salvia argentea*.

D'autre part une évaluation des activités biologiques des différents extraits de *Salvia argentea* s'avère inévitable et cela par :

- Une extraction aqueuse et hydro-alcoolique des parties aériennes de *Salvia argentea*.
- La mise en évidence des propriétés antibactériennes et antifongiques des différents extraits de *Salvia argentea* vis-à-vis de 16 souches bactériennes et 4 souches de levures.
- Une évaluation *in-vivo* des effets thérapeutiques de l'extrait aqueux de *Salvia argentea* sur des rats wistar intoxiqués au Nickel.

Synthèse Bibliographique

I. *Salvia argentea*

1. Généralités sur la plante

Salvia a toujours été considérée comme une plante magique qui sauve des vies humaines. Le mot *Salvia* provient de l'italien "salvare" qui veut dire sauver. Depuis très longtemps, les racines de l'espèce chinoise *S. miltiorriza* sont utilisées pour traiter des maladies cardiovasculaires, hépatiques et rénales. Les diterpénoides sont les principaux métabolites secondaires responsables des diverses activités des espèces *Salvia*. L'activité antituberculeuse a été établie pour les espèces *Salvia blepharochlyna* et *S. multicaulis*, également connues pour leur activité antifongique ainsi que *S. prionitis* qui possède également des propriétés antiphlogistique et antibactérienne. L'espèce espagnole *S. canariensis* a manifesté une activité antibiotique tandis que l'activité antimicrobienne a été mise en évidence pour les espèces. *S. albocaerula*, *S. forskhalei*, *S. lanigera* et *S. officinalis* (Kabouche.,2005).

Le genre *Salvia*, famille des Lamiaceae, représente un assemblage énorme et cosmopolite de près de 1000 espèces présentant une gamme remarquable de variation. La répartition géographique des espèces de *Salvia* s'étend sur trois régions du monde ; Amérique centrale et du sud (500 spp), Asie centrale / méditerranée (250 spp) et l'Asie orientale (90 spp) (Figure 01) (Walker *et al.*, 2004).

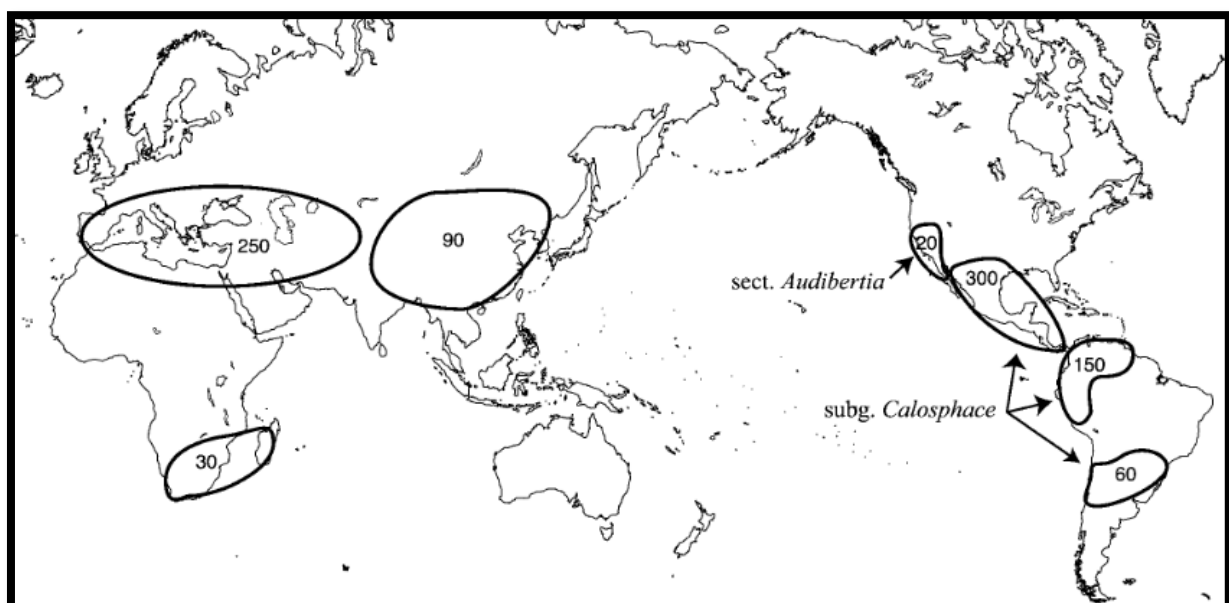


Figure 01. Répartition géographique du genre *Salvia*. Nombre approximatif d'espèces répertoriées dans chaque région (Walker *et al.*, 2004)

2. Répartition géographique de *Salvia argentea*

Salvia argentea est une plante herbacée vivace originaire de la région méditerranéenne, au nord-ouest de l'Afrique (Maroc, nord de l'Algérie, Tunisie), le sud de l'Europe (Espagne, Portugal, Italie, Sicile, Malte, Albanie, Slovénie, Croatie, Bosnie, Kosovo, Monténégro, Serbie, Macédoine et Grèce) et à l'extrême ouest de l'Asie (Turquie) (**Riccobono et al., 2016**).

3. Description botanique de *Salvia argentea*

La Saugue argentée (*Salvia argentea*), connue sous ce nom par référence à son aspect laineux et à son feuillage d'argent dû à l'existence de poils denses sur les deux côtés des feuilles (**Hedge., 1972**). C'est une plante herbacée, annuelle ou bisannuelle de la famille des Lamiacées. Originaire d'Afrique du Nord, elle s'adapte bien à un climat tempéré. Elle forme une rosette de feuilles la première année, et fleurit la seconde année. Les feuilles sont recouvertes d'un duvet argenté, très doux au toucher, qui rend cette sauge populaire auprès des horticulteurs. Les fleurs, blanches, sont verticillées le long des tiges d'environ 50 cm de haut. La période de floraison se situe entre les mois de juin et juillet avec un ordre de maturation protandre. *Salvia argentea* est caractérisée par une couleur blanche dominante des fleurs et des Inflorescence en glomérules spiciformes (**Figure 02**).



Figure 02. *Salvia argentea* au stade de floraison (**Benabdesslem et al., 2017**)

L'espèce se rencontre sur les parcours, les prairies, la clairière de broussailles, aux bords des routes, des champs cultivés ou abandonnés. Indifférente au substrat, elle se développe sur les sols rocheux et les endroits ensoleillés. À une altitude comprise entre 50 et 1.700 m.

Le développement et la survie de *S. argentea* dépendent des conditions climatiques. En effet, les précipitations et les températures élevées, supérieures à celles caractérisant les régions d'origine sont jugées défavorables à la croissance de l'espèce et se sont même révélés être nuisible (Mossi *et al.*, 2011).

S. argentea L Diffère de *S. patula*, d'après M. Pomel, par ses feuilles non cordiformes à la base; par la lèvre supérieure du calice à dents moins inégales et plus écartées; par son connectif plus fortement denté au point où il s'élargit. *S. patula* est considéré comme une espèce très polymorphe (Battandier et Trabut, 1888).

4. Systématique de *Salvia argentea*

Selon Quezel et Santa (1963), l'espèce *Salvia argentea* est classée comme suit :

Règne : Plantae

Sous Règne : Tracheobiontes

Embranchement : Spermatophytes

Division : Magnoliophytes

Classe : Magnoliopsides

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia argentea*

Les noms vernaculaires de *Salvia argentea*:

Arabe : Ferrache en neda

Français : la sauge argentée

5. Caractères morphologiques de *Salvia argentea*

Dans un travail de Baran *et al.*, (2008), les paramètres morphologiques de *Salvia argentea* L. ont été étudiés. *S. argentea* possède une racine pivotante vivace avec une couche externe épaisse d'une couleur brune foncé. La tige est dressée et quadrangulaire. Les feuilles sont simples et diffèrent entre une forme ovale et oblongue, dont les bords sont irréguliers, dentés

et aux nervations flabelliformes. L'inflorescence est généralement de type cyme verticillée. La tige, feuilles et pétioles sont couverts d'une couche pileuse. Les fleurs zygomorphes situées à la base de bractées sont positionnées de 2 - 4, 6 par verticille. La lèvre supérieure du calice est tridentée et la lèvre inférieure est bidentée.

La lèvre supérieure de la corolle bilabée est blanche, lilas claire, fortement falciformes. Tandis que la lèvre inférieure est de couleur crème. Le stigmate est inégalement bifurqué et les étamines de type B. Le fruit est constitué de quatre nucules secs brun clair, trigone, mucilagineuse. Les semences ont la surface à motif réticulaire et les bractées sont acuminées. La plante entière est couverte d'une dense couche de poiles dans certains cas glandulaires et dans d'autres non (**Tableau 01, Figure 03**).

Tableau 01. Biométrie des différents organes de *Salvia argentea*.

		Min-Max	Moyenne ± S.D.*(cm)
		(cm)	
Racine	Longueur	15 – 55	29.3 ± 15.3
Tige	Longueur	20 - 56	42.5 ± 10.8
Feuille	Longueur	2 - 19.5	8.2 ± 3.9
	Largeur	1 -12	4.6 ± 2.5
Pétiole	Longueur	0.8 - 9.5	3.7 ± 2.5
	Longueur du pédicelle	0.3 - 0.6	0.42 ± 0.08
	Longueur du calice	0.8 - 1.7	1.14 ± 0.22
	Longueur de l'extrémité du calice	0.02 - 0.5	0.27 ± 0.14
Fleur	Longueur de la corolle	1.7 - 3	2.29 ± 0.4
	Longueur du filet	0.4 - 0.6	0.49 ± 0.05
	Longueur de l'anthere	0.4 - 0.5	0.41 ± 0.03
	Longueur du pistil	4 - 4.6	4.28 ± 0.2
Bractée	Longueur des bractées	0.6 - 1.8	1.08 ± 0.32
	Largeur des bractées	0.6 - 1.5	1.06 ± 0.22
semence	Longueur des semences	0.3 - 0.4	0.35 ± 0.05
	Largeur des semences	0.22 - 0.4	0.29 ± 0.05

*S.D. : *Déviatiion standard.*

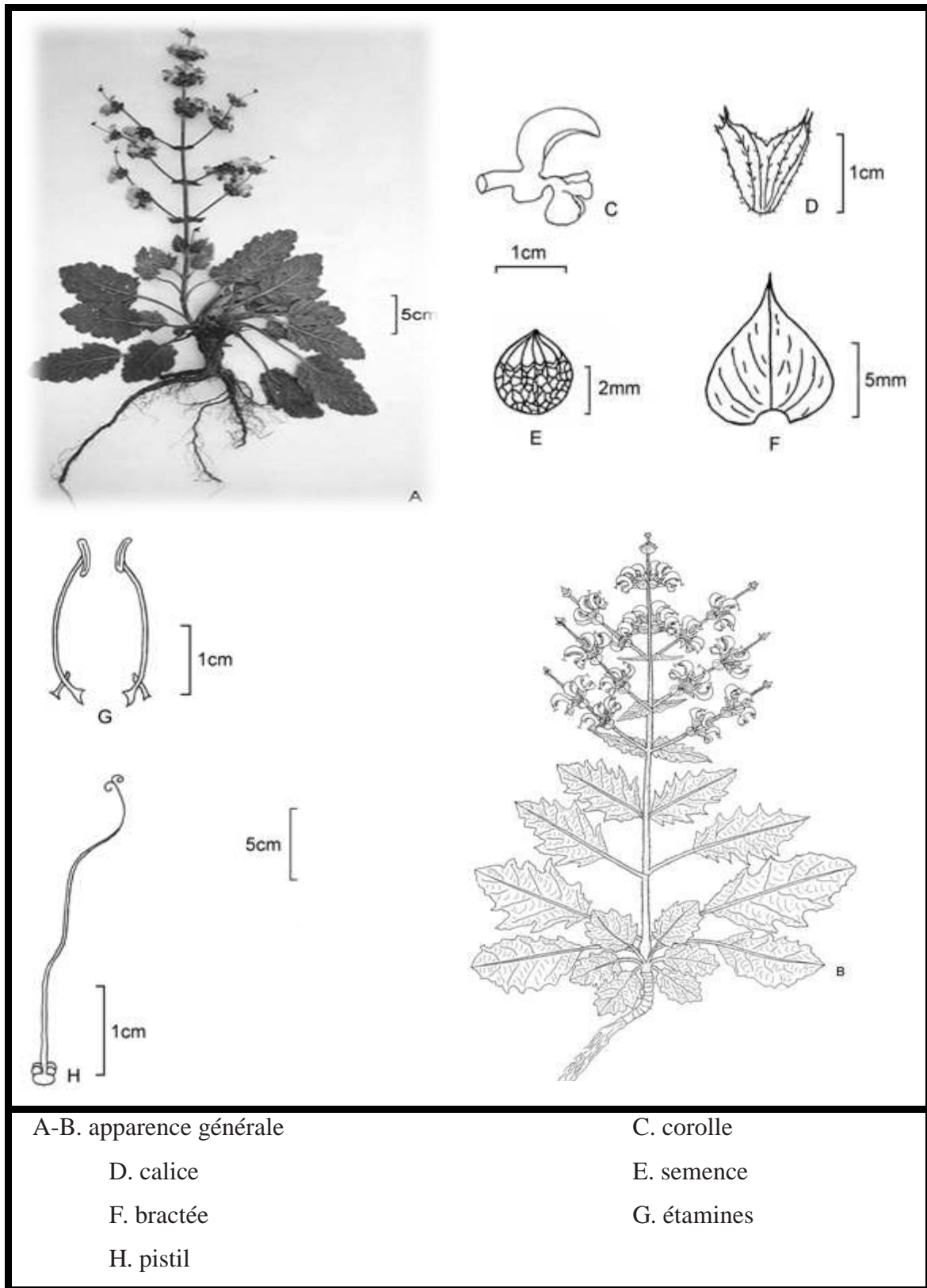


Figure 03. Aspect général de *Salvia argentea* L et ses différentes parties selon **Quezel et Santa (1963)**

6. Composition chimique de *Salvia argentea*

Les résultats d'une étude s'intéressant à la composition chimique de l'huile essentielle et des extraits non polaires (éther de pétrole, dichlorométhane) des parties aériennes (fleurs, feuilles et tiges) de *Salvia argentea*, a révélée après chromatographie couplée à un spectromètre de masse, les constituants suivants : 14 -hydroxy- α - humulène (40,1%) qui a été reconnu comme étant le principal constituant de l'huile essentielle de *S. argentea*, avec 1,3,8 -p-menthatriène (12,1%), globulol (7,4%) et β - sesquiphellandrene (5,8 %). Tritriacontane (9,9 % et 14,1 %), heptacosane (8,4 % et 10,5 %), hentriacontane (8,3 % et 10,9 %), tétradécanal (8,4 % et 10,2 %) et méthyldotriacontane (7,9 % et 7,6 %) ont été reconnus comme étant les principaux constituants des extraits dans l'éther de pétrole et de dichlorométhane, respectivement, alors que le linoléate de méthyle (36,6 % et 13,5 %) et le myristoléate de méthyle (10,5 % et 18,5 %) ont été reconnus comme étant les principaux constituants des extraits méthylés (**Riccobono et al., 2016**).

De nombreuses espèces du genre *Salvia* ont été étudiées pour leurs constituants et composés chimiques biologiquement actifs. Les principaux composés des parties aériennes sont les flavonoïdes, triterpénoïdes et substances volatiles, précisément les monoterpènes alors que les diterpénoïdes sont généralement trouvés dans les racines (**Kuzma et al., 2007**). Certains types d'acides phénoliques, à savoir les dérivés de l'acide caféique, ont également été trouvés dans ce genre (**Lu et Foo, 2002**).

Le genre *Salvia* contient des salvinorines, principalement de la salvinorine-A et de la salvinorine-B. Il contient également les composants parents psychoactifs suivants : salvinorine T G A, salvinorine F (activité inconnue), divinorines A, divinorines D, divinorines E, salvicinase A.

Seul la salvinorine-A semble être à l'origine des effets psychotropes, elle est donc couramment appelée simplement salvinorine. C'est un diterpène de formule chimique $C_{23}H_{28}O_8$. Contrairement à la plupart des composants psychoactifs connus, la salvinorine A n'est pas une amine ni un alcaloïde, ce qui signifie qu'elle ne contient aucun groupement azoté fonctionnel. Elle n'agit pas non plus sur les récepteurs classiques (5-HT_{2A}) (**Siebert, 1994**).

Il a été démontré que les effets de la salvinorine A sont bloqués par les antagonistes récepteurs opioïdes kappa (**Zhang et al., 2005**). Ceci signifie que les effets de *Salvia* peuvent être largement, si non entièrement, imputés à l'antagonisme kappa. La salvinorine A serait

unique, car elle est la seule substance naturelle connue induisant un état hallucinogène via ce mode d'action (**Stephen et al., 2004**).

7. Les trichomes glandulaires des sauges

C'est souvent chez les végétaux supérieurs qu'on rencontre les huiles essentielles. Les plantes qui les élaborent sont réparties dans différentes familles comme : les Lamiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Poaceae, Rutaceae, etc.) (**Desmares et al., 2008**). On les rencontre dans tous les organes des végétaux ; écorce (cannelier) ; rhizomes (gingembre) ; racines (vétiver) ; bois (camphrier) ; feuilles et sommités fleuries (lavande). Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes avec une composition variée d'un organe à l'autre. La teneur en HE d'un végétal varie selon l'espèce: (géranium: 0,15-0,3%) ; (vétiver: 1-2,5%) ; (ylang-ylang: 1,6-2,0%) ;(rose de Provence: 0,007%). Il existe, cependant, quelques exceptions comme les clous de girofle (15-20%) ou la badiane de Chine (5%) (**Smadja, 2009**).

La production des HEs dans les plantes est, généralement, associée avec la présence des structures sécrétrices spécialisées ; des cellules sécrétrices, des poils sécréteurs, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs et des trichomes glandulaires qui existent dans toutes les parties aériennes de la plante (**Karousou et al., 2000; Smajda, 2009**).

Chez les lamiacées, l'organe sécréteur majeur est le trichome glandulaire (**Figure 04**) (**Venkatachalam et al., 1984**). Deux types de trichomes glandulaires sont décrits, les trichomes tecteurs et les trichomes sécréteurs, qui sont distingués l'un de l'autre par la structure et le mode de sécrétion. Le premier est formé par une base cellulaire épidermique, un col cellulaire et une tête de 4-16 cellules. Dans les trichomes matures, la sécrétion est accumulée au large de l'espace sub-cuticulaire, qui forme au-dessus les cellules sécrétrices. Les trichomes sécréteurs sont très différents en forme (court, long, avec une tête unicellulaire ou pluricellulaire) (**Maleci Bini et Giuliani, 2006**).

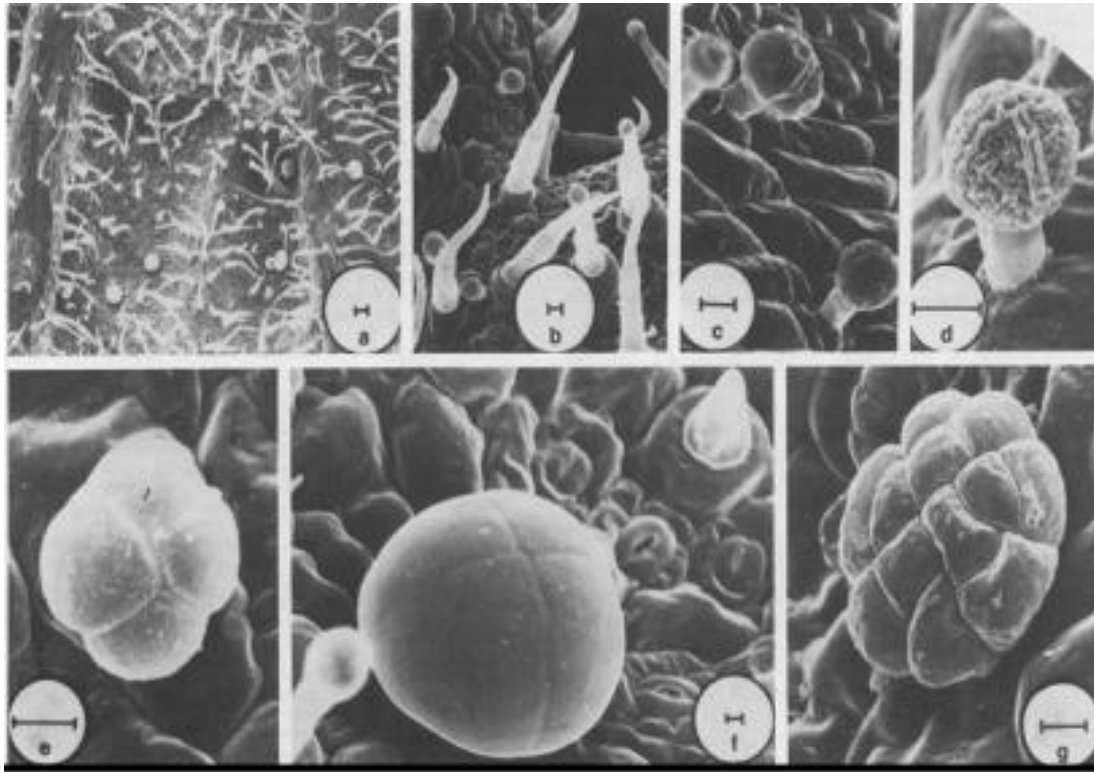


Figure 04. Des trichomes glandulaires sur la surface des feuilles de sauge observés par microscopie électronique à balayage. (Venkatachalam *et al.*, 1984)

8. Les trichomes glandulaires de *Salvia argentea*

Les trichomes glandulaires sont largement répartis sur les parties aériennes des Lamiaceae. Ils sont les principaux organes de sécrétion de ces plantes, leurs structures peuvent varier considérablement d'une espèce à l'autre (Serrato-Valenti *et al.*, 1997).

Les trichomes glandulaires de *Salvia argentea* L. ont été étudiés sur le plan morphologique, anatomique ainsi que leur distribution sur les organes aériens. Deux principaux types de trichomes glandulaires morphologiquement distincts ont été déterminés selon la classification de Werker *et al.* (1985) et Özdemir et Şenel (2001) :

- Des trichomes formant une base constituée de 1 à 7 cellules avec une tige de 1 à 5 cellules, ils peuvent être sans tige et munis d'une tête uni- ou bicellulaire avec différentes formes. Il a été démontré que la cellule du cou joue un rôle important, en particulier chez les plantes xéromorphes, agissant pour empêcher le reflux de substance sécrétée à travers l'apoplaste.

- Des trichomes glandulaires ayant une grande tête sécrétrice pouvant contenir de 5 à 8 cellules centrales et 8 à 14 cellules périphériques. Les trichomes peltés sont présents sur tous les organes aériens à l'exception du pétiole, ils sont plus abondants sur le calice et la corolle (Figure 05 et 06) (Baran *et al.*, 2010).

L'huile essentielle produite par les trichomes glandulaires est l'un des traits caractéristiques de la famille des Lamiacées (Ascensao *et al.*, 1995). Les trichomes glandulaires qui se développent à partir des cellules épidermiques sont généralement considérés comme le site de biosynthèse ou d'accumulation des huiles essentielles (Nishizawa *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 2000).

Huile essentielle produite par les trichomes glandulaires de la famille des Lamiacées est importante pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique, sa valorisation comme bio-pesticide s'avère très prometteuse. (Serrato-Valenti *et al.*, 1997; Zeybek et Zeybek, 2002). Cette huile qui donne un parfum spécial est caractéristique pour beaucoup d'espèces du genre *Salvia* (Stace, 1991). Ce dernier possède le trichome glandulaire le plus riche et le plus diversifié de la famille (Metcalf & Chalk 1972).

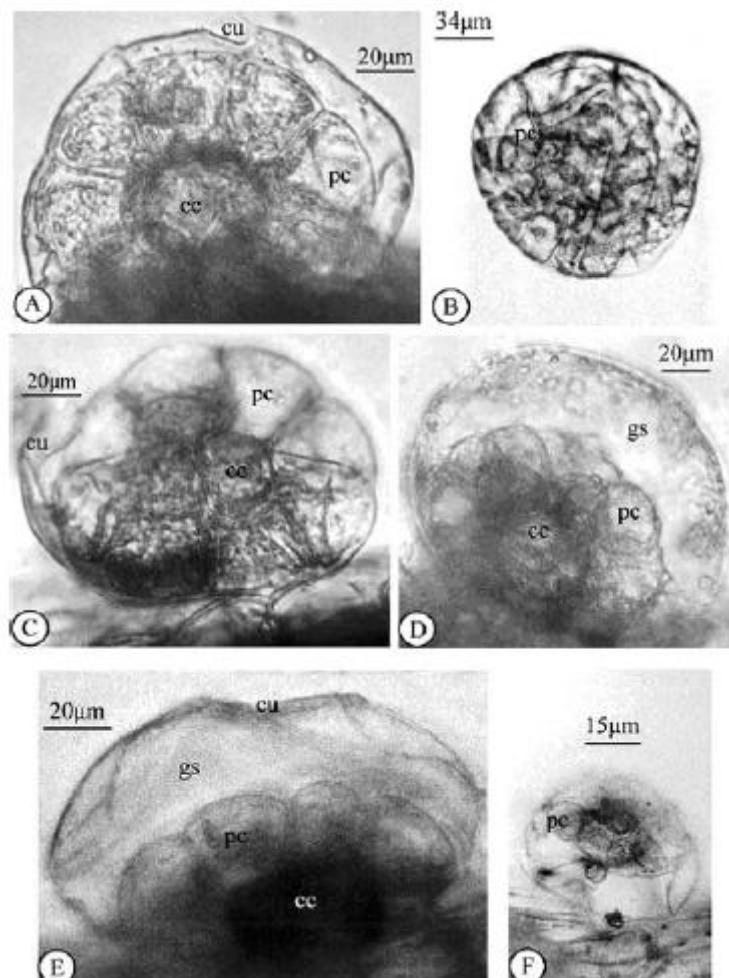


Figure 05. Observations par microscopie électronique à transmission des trichomes glandulaires tecteurs de *Salvia argentea* L. (A-F), hc : cellule de la tête, nc : cellule du cou, sc : cellule de la tige, cu : cuticule, bc : cellule basale, gs : espace glandulaire, pc : cellules périphériques, cc : cellules centrales (Baran *et al.*, 2010)

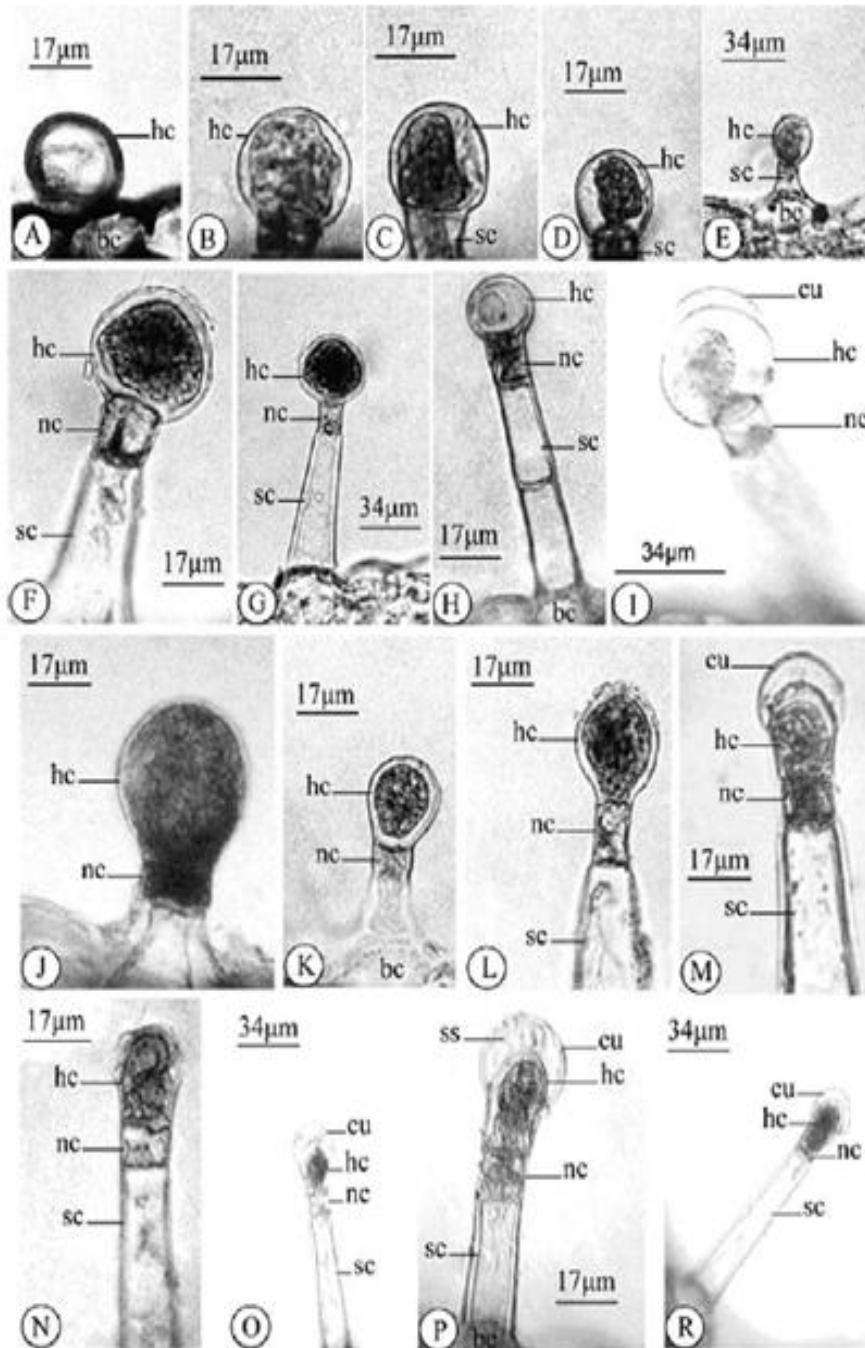


Figure 06. Observations par microscopie électronique à transmission des trichomes glandulaires sécréteurs de *Salvia argentea* L. (A-H) : trichome de type I, (I-R) : trichome de type II, hc : cellule de la tête, nc : cellule du cou, sc : cellule de la tige, cu : cuticule, bc : cellule basale (Baran *et al.*, 2010)

9. L'utilisation traditionnelle de *Salvia argentea*

Les différentes espèces du genre *Salvia* constituent un important groupe de plantes médicinales, qui n'ont pas perdus leur importance au fil des ans. Comme leur appellation l'indique, *Salvia* désigne en langue latine « Qui sauve », c'est une plante qui est utilisée pour guérir de nombreuses maladies (**Baran et al., 2008**).

Salvia, communément appelée sauge, a de multiples usages tel que : condiment, additif alimentaire, assaisonnement, épices et tisane (**Demirci et al., 2005**). Les graines des espèces de *Salvia* forment des mucilages, grâce à leur forte teneur en polysaccharides, qui gonflent en présence d'eau et qui forment une gélatine qui est utilisée pour produire des boissons et des desserts agréables (**Estilai et al., 1990**). Tandis qu'aux pays de l'Est, ces mêmes mucilages sont utilisés pour traiter les maladies oculaires (**Baytop, 1999**). En plus de leurs propriétés médicales les espèces de *Salvia* sont aussi utilisés dans les jardins comme plantes ornementales (**Nakipoglu et al., 1993**).

Historiquement, Les feuilles de *Salvia argentea* ont été utilisées contre les blessures, probablement comme hémostatique (**Pieroni et al., 2004**).

II. Les plantes médicinales et métabolites secondaires

1. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (feuille, tige, racine.. etc.) peut être employée dans le but de se soigner. Elles sont utilisées depuis au moins 7.000 ans avant notre ère par les Hommes et sont à la base de la phytothérapie. Ces plantes doivent leur pouvoir thérapeutique à des substances, dites alors actives, qu'elles renferment. Pour l'évaluation de l'activité biologique de ces plantes, il est impératif de recourir à des tests biologiques appropriés et à des méthodes de screening chimique (**Tyihák et al., 2007**).

Depuis la plus haute antiquité, les plantes ont fait partie de la vie quotidienne des hommes, puisqu'ils s'en servent pour se nourrir, se soigner et parfois dans leurs traditions superstitieuses et religieuses. Les propriétés odorantes et thérapeutiques des plantes étaient, déjà, connues par l'ancienne Egypte et en Chine (**Fellah et al., 2006**).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 75 à 95% des populations rurales (particulièrement dans les pays en développement) font recours à la médecine traditionnelle faite en grande partie à base de plantes.

Dans la plupart des cas, l'activité biologique des métabolites secondaires est reconnue bien avant la détermination de leurs structures chimiques (**Sofowora, 2010**). Il est néanmoins important de noter que la nature active de ces composés peut engendrer des effets bénéfiques, aussi bien que des effets néfastes, sur les organismes vivants.

1.2. Propriétés et principes actifs des plantes médicinales

Dans l'antiquité, certaines plantes étaient vénérées pour des vertus qu'on leur avait reconnues. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissaient, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet, il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir, ou tout au moins soulager un état maladif ou des troubles organiques. La recherche scientifique, en analysant et étudiant les effets thérapeutiques des plantes, n'a pas pour but de diminuer cette confiance en la nature, mais elle veut préciser, comparer et classer les diverses propriétés pour grouper les plantes à effet similaires, choisir les plus efficaces et les faire connaître. (**Schauenberg et Paris, 2010**).

1.2.1 Les plantes à alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques, le plus souvent d'origine végétale. La présence d'azote confère à la molécule, un caractère basique plus ou moins prononcé, de distribution restreinte et douée d'activité biologique, à faibles doses. Les drogues à alcaloïdes ont une importance considérable en thérapeutique. Certaines agissent au niveau central, d'autres sur le système nerveux autonome : sympatholytique (ergotamine) et d'autres ont des propriétés anesthésiques, anti-tumorales, Elles agissent à faibles doses, mais peuvent même être très toxiques à très faible dose.

1.2.2 Les plantes à flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés poly phénoliques, presque toujours hydrosolubles et très répandus dans le règne végétal. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical. Les flavonoïdes agissaient sur le cœur et sur la circulation sanguine. Elles diminuent aussi la fragilité des vaisseaux capillaires d'une manière générale, on les emploie surtout comme spasmolytique et diurétique, des propriétés reconnues depuis longtemps. **(Paul et Ferdinand, 2010).**

1.2.3 Les plantes à Saponosides

Ce sont les principaux constituants de nombreuses plantes médicinales (Saponaire officinale), les saponines doivent leur nom au fait que, comme le savon, ils ont des propriétés moussantes, c'est des hétérosides capable d'agir sur la perméabilité des membranes cellulaires. Les saponosides possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-œdémateuses. Ils sont particulièrement toxiques pour les poissons et autres animaux aquatiques. Actuellement, les recherches montrent que les saponosides isolés à partir des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques. **(Paul et Ferdinand, 2010).**

1.2.4 Les plantes à hétérosides

Ce sont des sucres (glucosides) combinés à des substances actives. Celles-ci ont comme particularité de pouvoir agir sélectivement dans le corps humain, sur un ou plusieurs organes. Ainsi, le groupe des anthracénosides dérivés des quinones se rencontrent chez l'aloès, les rhubarbes, les sénés, la bourdaine, le cascara, le nerprun. Toutes ces plantes sont laxatives.,

avec une action concentrée sur le gros intestin, Tandis que le groupe cardénolide agit au niveau du cœur et des reins. **(Paul et Ferdinand, 2010)**.

La glycone (la partie « sucre » du glycoside) peut être un sucre simple (le glycoside est alors un monosaccharide) ou comporter plusieurs sucres (le glycoside est alors un oligosaccharide ou polysaccharide).

L'aglycone (partie non sucrée) peut être de nature chimique très variée : il peut s'agir d'un alcool, d'un phénol, d'une substance à fonction aminée ou à fonction thiol, d'un stéroïde, etc. C'est elle qui confère à l'hétéroside l'essentiel de ses propriétés spécifiques (thérapeutiques).

1.2.5 Les plantes à vitamines

Les vitamines sont des substances organiques, que l'organisme n'est pas capable de synthétiser, qui sont nécessaires à sa croissance, à son fonctionnement et qui doivent donc lui être apportées de façon régulière et harmonieuse par le régime alimentaire.

On les classe selon leur solubilité dans l'eau (vitamines hydrosolubles) dont la vitamine C ou dans les lipides (vitamines liposolubles) dont la vitamine A et la vitamine E **(Paul et Ferdinand, 2010)**.

Par exemple:

La vitamine A : elle agit également comme substance protectrice des tissus de l'épiderme et des muqueuses, son action s'étend aussi sur l'ouïe et sur la vue, car elle empêche le durcissement de la cornée. Enfin, elle aide à lutter contre l'infection.

La vitamine B1 : elle contribue au bon fonctionnement du système nerveux.

La vitamine C : est nécessaire à la formation des os. Elle active la respiration des cellules et le fonctionnement des vaisseaux sanguins et lutte contre les infections.

Les plantes restent par excellence, la source inépuisable de ces précieuses vitamines, qui nous sont si utiles pour assurer nos fonctions vitales.

1.2.6 Les plantes à Tanins

Substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines. Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles et de brûlures. Ils sont utilisés comme anti-diarrhéiques et hémostatiques, mais surtout comme protecteur veineux dans le traitement des varices. En cosmologie, les tanins sont des astringents très utilisés, sous

forme de lotions. Ils sont largement employés dans l'industrie, notamment dans l'industrie du cuir, des vernis et de la peinture (Paul et Ferdinand, 2010).

2. Les métabolites secondaires

2.1 .Généralités sur le métabolisme secondaire des plantes supérieures

La faible différenciation observée chez les végétaux contraste avec ce que nous voyons chez les animaux, pourvus d'appareils digestif, sensitif, locomoteur....etc. En réalité, la principale spécialisation des plantes est une spécialisation chimique qui n'apparaît pas au premier regard.

Les végétaux sont, en effet, de véritables « usines chimiques » fournissant aux animaux l'ensemble des aliments nécessaires à la vie : l'herbivore broute les jeunes tiges et les feuilles des plantes, le carnivore mange l'herbivore ...

Cette usine chimique a pour particularité fondamentale de pouvoir synthétiser les constituants complexes des tissus vivants à partir de molécules minérales simples (eau, sels minéraux des sols tels que les nitrates, sulfates, phosphates, gaz carbonique de l'air) grâce à la captation de l'énergie solaire par un pigment assimilateur, la chlorophylle.

Les plantes, capables de subvenir elles-mêmes à leur nourriture, sont dites autotrophes, les animaux qui doivent emprunter leurs aliments sont des hétérotrophes.

Qui peut le plus peut le moins et les plantes sont, bien sûr, capables d'assimiler, comme les animaux après action des sucs digestifs, des molécules organiques simples. Si l'on ajoute un sucre, un acide organique ou une substance azotée de faible poids moléculaire (urée, acide aminé...) dans un milieu de culture *in vitro* aseptique, dans lequel croît un explant ou une plante verte entière. Mais ce ne sont là que des conditions exceptionnelles réalisées en laboratoire ; dans la nature, les matières organiques présentes dans le sol sont utilisées par les Bactéries et les Champignons, et les plantes supérieures se nourrissent uniquement d'éléments minéraux.

L'autotrophie, faculté qui montre d'emblée la puissance des processus anaboliques chez les végétaux, s'accompagne d'un certain nombre de caractères permettant de différencier plus précisément la biochimie des plantes et animaux.

Un premier caractère consiste dans l'importance de l'anabolisme glucidique. Les plantes synthétisent des quantités d'hydrates de carbone (saccharose, amidon...) excédant de beaucoup leur besoin. De plus, la paroi squelettique qui enveloppe chaque cellule végétale est principalement composée de cellulose, substance glucidique.

Une seconde particularité concerne l'importance de la synthèse des dérivés aromatiques (essences, flavones...), lesquels sont formés par une réaction de condensation entre deux substances appartenant au métabolisme des sucres : acide phosphoénolpyruvique, érythrose phosphate. La synthèse du noyau aromatique est notamment à l'origine des lignines, constituants caractéristiques du bois, lesquelles permettent la formation d'organes aériens rigides et de grande taille.

Un autre fait remarquable est la présence chez de nombreuses plantes de substances particulières (terpènes des essences et des latex, flavones des fleurs et des fruits, hétérosides, alcaloïdes ...) dont le rôle est mal connu.

Le fait que ces substances ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre clairement qu'elles n'entrent pas dans le métabolisme général. Ce sont des métabolites dits secondaires. Ils sont les témoins de la complexité du métabolisme végétal.

Par contre, le catabolisme est plus simple chez les végétaux que chez les animaux. L'énergie nécessaire au métabolisme est, en partie, apportée directement par l'énergie solaire (phosphorylation) et non pas, comme chez les animaux, uniquement due à la dégradation des glucides, lipides et protéines.

Pour des raisons économiques, l'étude biochimique de ces composés a fait l'objet d'intenses efforts, contribuant au développement de plusieurs pans entiers de la phytochimie ayant des rapports étroits avec la pharmacie et les différents domaines de l'industrie. Devant la quantité et la diversité des molécules caractérisées s'est rapidement posée la question de leur rôle biologique éventuel. Dans la mesure où ces molécules ne sont retrouvées que chez quelques espèces uniquement, on a d'abord pensé qu'elles ne pouvaient avoir aucun rôle réellement important en comparaison des métabolites universellement représentés comme les glucides, les protéines, les lipides ou les acides nucléiques et dont les fonctions biologiques commençaient déjà à être solidement établies. Une opposition s'est ainsi dessinée entre :

- d'un côté le métabolisme primaire, désignant un métabolisme à la fois universel et participant aux fonctions cellulaires,
- et de l'autre le métabolisme secondaire, désignant un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante.

A mesure de l'accumulation de données, il est apparu que la distribution taxonomique de certains composés était parfois centrée sur des groupes taxonomiques très ciblés. L'idée a alors germé d'utiliser ces composés comme des outils pour aider à la résolution de problèmes

taxonomiques, ce qui a conduit à tout une série d'excellents développements dans le cadre de ce qu'on a appelé la « **chimiotaxonomie** » (Tyihák *et al.*, 2007).

Après l'énoncé il y a plus d'un siècle par Ernst Stahl de l'hypothèse que les métabolites secondaires pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, de nombreux métabolites dits secondaires se sont avérés jouer des rôles essentiels dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation, la présence de phytoanticipines détermine parfois la résistance à des pathogènes. Ces questions ont conduit au développement d'une discipline extrêmement féconde et absolument passionnante qu'on appelle la « **Chimie environnementale** ». Dont certains développements actuels concernent à la fois des aspects très fondamentaux des relations plantes / insectes mais rejoignent également les problématiques d'amélioration variétale (la biosynthèse d'un métabolite secondaire explique-t-elle la résistance d'une variété à tel ou tel parasite ?). Par la suite encore, le rôle de métabolites secondaires dans la croissance et le développement est apparu de plus en plus évident (par exemple certains flavonoïdes régulent le transport de l'auxine, une phytohormone qui induit la croissance racinaire). En ce sens la frontière entre certains métabolites dits secondaires et ce qu'on a appelé les phytohormones ou « substances de croissance » a en partie perdu de son étanchéité (Guignard, 1974).

Si on veut souligner encore les limites de la notion de métabolisme secondaire, il faut noter que les caroténoïdes sont par exemple issus du métabolisme secondaire alors que certains sont notoirement impliqués dans la photosynthèse. Par ailleurs, la lignine est un composé extrêmement fréquent chez les plantes et clairement indispensable pour la plupart à leur croissance et développement. Elle ne correspond donc pas à l'idée que l'on se fait du métabolisme secondaire. Malgré tout, dans la mesure où il s'agit d'un polymère de phénylpropanoïdes, composé dont l'étude rentre historiquement dans le champ d'étude du métabolisme secondaire.

La plupart des auteurs reconnaissent aujourd'hui l'utilité didactique du terme de métabolisme secondaire, mais soulignent également les limites que nous venons d'évoquer. Certains auteurs anglo-saxons ont plus récemment introduit la notion de « **natural products** » dont la définition n'est pas plus aisée mais qui, au moins dans son intitulé, insiste moins sur l'opposition traditionnelle entre métabolisme primaire et secondaire et évoque davantage les utilisations humaines.

2.2. Principaux champs d'applications

L'étude et la connaissance de ces composés trouvent en effet des applications évidemment dans le domaine médical, et les perspectives de retour sur investissement ont largement contribué à leurs développements. Mais au-delà de ces applications, il faut avoir conscience que beaucoup de métabolites secondaires sont réellement au cœur d'une stratégie très concrètes de substitution des composés chimique, et cela dans différents domaines : agroalimentaire (arômes, parfums, conservateurs, colorant), horticulture (pigments floraux), foresterie (problèmes de qualité du bois), écologie (allélopathie, résistances aux bioagresseurs). De très nombreux professionnels de ces filières utilisent quotidiennement tel ou tel métabolite secondaire comme critère de qualité (répression des fraudes...), comme objectif de production (exemple du latex) ou de sélection variétale...etc.

Malheureusement, quand on cherche à approfondir la connaissance d'une famille de métabolites secondaires, survient rapidement des problèmes de définition et de vocabulaire, qui reflètent souvent une mauvaise compréhension du système de classification. Ce système a été établi progressivement au cours des XIXe et XXe siècles par plusieurs générations d'éminents phytochimistes et pharmaciens. Cependant, bien que globalement cohérent et fonctionnel, il faut reconnaître qu'on y retrouve pour partie des aspects arbitraires (qui sont insolubles car liés à l'impossibilité fondamentale à réduire la diversité biochimique à un système parfait) mais aussi des contradictions dont on peut penser que le maintien relève de la tradition (**Peeking et al., 1987**).

2.3. Principes généraux de classification des métabolites secondaires

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les **alcaloïdes et composés azotés**
- Les **composés phénoliques**
- Les **composés terpéniques**

Auxquelles on ajoute classiquement

- la catégorie des **hétérosides**, constituée de dérivés glycosylés de composés terpéniques, phénoliques et plus rarement d'alcaloïdes. Ces glycosylations affectent largement leurs propriétés biochimiques (dont l'extractibilité dans différents solvants) mais également leurs effets biologiques (toxicité, propriétés pharmacologiques).

- les molécules désignées sous le terme de « **composés mixtes** » ou « composés d'origine mixte », qui correspondent à des condensations de molécules provenant des catégories citées plus haut. Mais souvent, les composés mixtes peuvent être rattachés à l'une des catégories précédentes. (**Guignard, 1974**)

On distingue enfin d'autres familles de métabolites secondaires plus restreintes en termes de nombre de composés et de nombre d'espèces végétales concernées, désignées parfois comme la catégorie des « **miscellaneous compounds** », on peut citer par exemple les composés dérivés du soufre présents dans les Aillacées, mais également chez certaines algues et plantes maritimes.

Dans chacune de ces grandes catégories, on distingue une quantité de catégories inférieures. Les classifications sont généralement basées sur

- La nature biochimique des molécules, leurs propriétés et effets biologiques (dans le cas des alcaloïdes)
- et/ou de leur origine biosynthétique

Dans cette optique de classification, une première difficulté provient du fait qu'un même métabolite secondaire est susceptible d'être synthétisé par des voies biochimiques différentes d'une espèce à une autre. C'est particulièrement vrai quand on compare des plantes avec des champignons (exemple des dérivés de quinones). De même, pour un grand nombre de métabolites secondaires identifiés dans des plantes non cultivées et peu étudiées, l'origine biosynthétique reste largement hypothétique. (**Paul et Ferdinand, 2010**).

Une seconde difficulté vient du fait que les définitions des familles ne se font pas toujours sur des critères homogènes, puisque les composés terpéniques sont définis par leur origine biosynthétique alors que les alcaloïdes sont définis par leurs propriétés biochimiques et leurs effets biologiques. On peut citer l'exemple des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM), issus de la voie des alcaloïdes indoliques d'une part et des terpènes d'autre part.

Généralement, on classe ces AIM avec les « alcaloïdes » parce que la définition générale des alcaloïdes sera moins restrictive.

Dès lors que l'on cherche à présenter une classification claire des principales molécules d'intérêt, on se retrouve confronté à cette difficulté. Quelques exemples :

- Faut-il classer les cardénolides dans les hétérosides plutôt que dans les composés terpéniques ? La réponse est qu'en général, et au vu de l'importance médicale de ces composés, on les classe dans les hétérosides

- Faut-il classer les glucoalcaloïdes dans les hétérosides plutôt que dans les alcaloïdes ? On les retrouve de fait souvent parmi les alcaloïdes mais parfois quand même dans les hétérosides. Les deux choix se justifient
- Les dérivés glucosylés de l'acide cinnamique sont ils des hétérosides ou des composés phénoliques ? Ces dérivés sont généralement traités dans la catégorie « composés phénoliques », sauf par exemple le melilotoside, une coumarine glucosylée dont la toxicité sous forme glycosylée est très spécifique.

Une troisième difficulté provient du fait que de nombreuses molécules n'ont pas eu le « privilège » d'être regroupées dans des sous-catégories, ce qui donne un défaut supplémentaire d'homogénéité dans le système de classification. Exemple : la catégorie des phénylpropanoïdes est une sous-catégorie des composés phénoliques. Les phénylpropanoïdes sont définis par leur origine biosynthétique commune, alors que les composés phénoliques sont définis par leur nature biochimique avec des origines biosynthétiques parfois différentes. Il existe cependant beaucoup de composés phénoliques, dont l'acide salicylique, qui ne sont pas des phénylpropanoïdes mais qui n'ont pas été regroupés dans une quelconque autre sous-catégorie.

Il convient donc de ne pas se formaliser au vu de divergences identifiées éventuellement entre différentes littératures, mais de tâcher de repérer les clés principales qui permettent de se retrouver dans l'univers incroyablement complexe du métabolisme secondaire (**Newman et Cragg, 2012**).

2.4. Classification des métabolites secondaires

2.4.1. Les Composés azotés

a- Acides aminés non-protéinogènes

Pas toujours intégrés dans le métabolisme secondaire. Ces composés (très grande variété > 300) sont caractéristiques de certaines Légumineuses. Ils présentent une structure proche d'acides aminés protéinogènes par exemple **la canavanine** et l'arginine (**Figure 07**) et peuvent interférer avec les processus de synthèse des protéines chez les animaux qui les consomment. Certains composés comme le Beta-N-oxalyl-L-alpha-beta-diaminopropionic acid (β -L-ODAP) sont responsables de troubles neurologiques par un effet mimétique vis-à-vis du glutamate en tant que neurotransmetteur. Les acides aminés non-protéinogènes toxiques peuvent être accumulés à fortes teneurs dans les graines de légumineuses où ils

peuvent jouer à la fois un rôle de stockage de carbone et d'azote, et un rôle protecteur vis-à-vis de phytophages. Ce phénomène pose problème pour plusieurs plantes utilisées en alimentation humaine et animale (plusieurs espèces de fèves cultivées et spontanées), ce qui implique des procédés de traitement post-récolte pour limiter leur toxicité. Certains insectes spécialistes de plantes accumulant des acides aminés non-protéinogènes sont capables de détoxifier et métaboliser ces composés. Ces spécialisations constituent des exemples intéressants de mécanismes de coévolution au niveau biochimique.



Figure 07. Acides aminés non-protéinogènes

Bétalaïnes

Ces composés sont inclus par certains auteurs parmi les alcaloïdes malgré une faible activité biologique, les bétalaïnes sont souvent associées dans les manuels aux composés phénoliques en raison de l'équivalence fonctionnelle avec les anthocyanes. Les bétalaïnes sont des pigments hydrosolubles à hétérocycles azotés dérivés de la tyrosine et qui s'accumulent dans les vacuoles. On distingue deux sous-familles (**Figure 08**) : les **bétaxanthines** (pigments jaunes, non glycosylés) et les **bétacyanines** (pigments pourpre/rouge, le plus souvent les molécules sont glycosylées) dans les pétales ou les tissus d'un certain nombre de plantes comme la betterave (*Chenopodiaceae*), les cactus (*Cactaceae*) et la lavande de mer (*Limonium vulgare*, une *Plombaginaceae*). Deux caractéristiques des bétalaïnes ont suscité beaucoup d'intérêt d'un point de vue taxonomique et phylogénétique :

- Les plantes accumulant des bétalaïnes ne contiennent pas d'anthocyanes et vice-versa
- Presque toutes les espèces contenant des bétalaïnes appartiennent aux Caryophyllales, bien que certaines familles comme les *Caryophyllaceae* n'en synthétisent pas et contiennent à la place des anthocyanes (Oeillets) (**Guignard, 1996**).

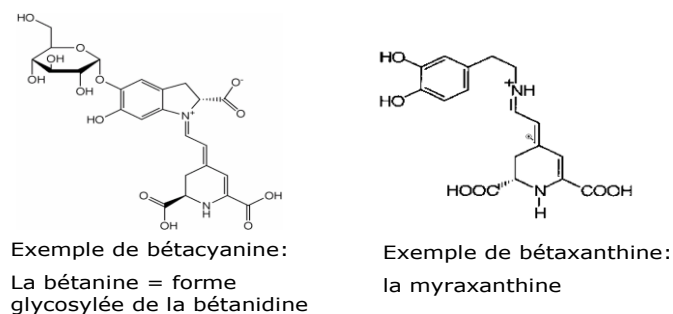


Figure 08. Exemples de Bétalaïnes

b- Les Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques qui s'extraient soit dans l'eau acide soit dans des solvants comme le chloroforme après alcalinisation. Ils précipitent généralement avec des réactifs iodométalliques (réactif de Dragendorff) et sont très souvent biologiquement actifs. On retrouve en effet des molécules comme la quinine, des drogues (cocaïne), des anticancéreux (la vincristine et le taxol), des molécules utilisées comme poisons (strychnine) (**Figure 09**) et des stimulants (caféine).

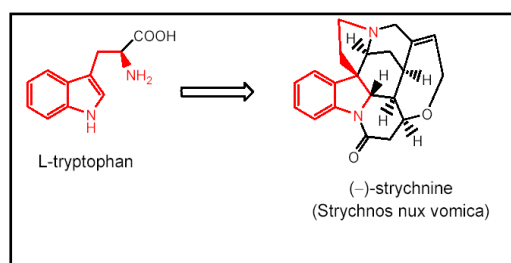


Figure 09. Molécules utilisées comme poisons (strychnine)

La plupart des alcaloïdes naturels sont d'origine végétale (il existe des exceptions dans le monde animal), on les retrouve essentiellement chez les angiospermes, avec encore des exceptions (lycopodine du lycopode, palustrine chez *Equisetum*) Cette famille de métabolites secondaires a été particulièrement étudiée du fait des enjeux économiques qui y sont associés. Leurs actions biologiques les place également au cœur de phénomènes d'interactions de défense face aux pressions biotiques (herbivores, microorganismes). L'amertume une caractéristique anti-nutritionnelle est une spécificité des alcaloïdes. Par contre très peu sont volatiles, à l'exception de la coniine à l'origine de l'odeur de souris dégagée par le froissement de feuilles de cigüe. (**Bruneton, 2009**).

On distingue généralement :

- **les alcaloïdes vrais**, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle : exemple la strychnine dérivée du tryptophane
- **les proto-alcaloïdes**, qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine) (**Figure 10**).

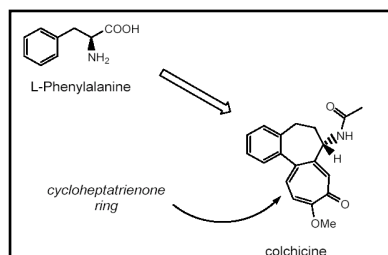


Figure 10. La colchicine

- **Les pseudo-alcaloïdes**, qui ne dérivent pas d'acides aminés (exemple : la caféine) (Figure 11).

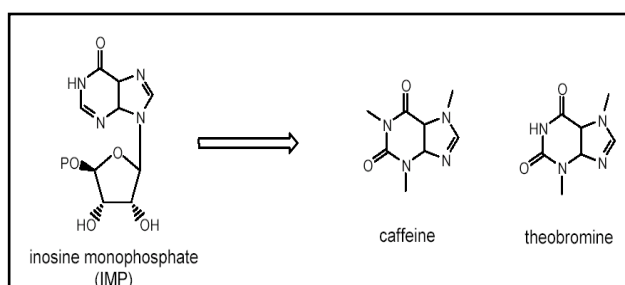


Figure 11. La caféine

Il existe une très grande diversité de sous-familles d'alcaloïdes, qui ont été classés en fonction de leurs origines biosynthétiques et de la nature des hétérocycles azotés (dépendamment bien sûr de l'avancée des connaissances sur les voies de biosynthèse). Certains alcaloïdes complexes associent des noyaux azotés dérivés d'acides aminés, à des résidus terpènes (exemple : alcaloïdes indoliques monoterpéniques de la pervenche de Madagascar qui sont utilisés comme anticancéreux) (**Gonzalez et al., 1984**).

Les alcaloïdes présentent fréquemment des propriétés pharmacologiques marquées et ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau du système nerveux central, du système nerveux autonome et du système cardiovasculaire (**Gazengel et Orecchioni, 2013**). On notera aussi l'existence d'anti-tumoraux, d'anti-parasitaires, de curarisants, les alcaloïdes sont utilisées comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (**Iserin et al., 2007**).

Ces nombreuses activités conduisent à une utilisation importante des drogues à alcaloïdes, soit sous forme de préparation galéniques, soit le plus souvent, pour l'extraction des alcaloïdes qu'elles renferment, ces alcaloïdes étant utilisés eux mêmes ou servant de matière première d'hémi-synthèse (**Gazengel et Orecchioni, 2013**).

Au-delà des implications médicales, certains alcaloïdes sont directement au cœur de considérations agronomiques. Les graines de lupin peuvent par exemple contenir des quantités importantes d'alcaloïdes quinolizidiniques (dérivés de la lysine) qui posent à la fois des problèmes de toxicité (dans le cadre de l'alimentation animale, il existe cependant des variétés de lupin blanc pauvres en alcaloïdes) mais également d'amertume (alimentation humaine, le problème est résolu par des procédés de saumures qui permettent de s'affranchir des alcaloïdes).

Les seuls alcaloïdes glycosylés sont les alcaloïdes stéroïdiens (=glucoalcaloïdes) dont le squelette carboné est largement dérivé des terpènes. On retrouve ces molécules chez les solanacées, avec par exemple la solanine (**Figure 12**), un composé toxique présent chez la pomme de terre parfois même dans les tubercules, ou la tomatine impliquée dans la résistance de la tomate à certains pathogènes. Dans les tubercules de pommes de terre, on ressent la présence de glycoalcaloïdes à partir d'environ 14 mg par g, la sensation de brûlure dans la bouche et le système digestif survient à partir de 20 mg par g. Cependant, les faibles doses contribuent à l'arôme de pomme de terre attendu par le consommateur. (**Gonzalez *et al.*, 1984**).

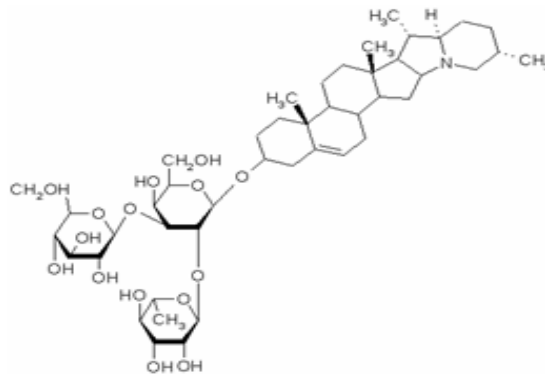


Figure 12. Exemple de glycoalcaloïde : la Solanine

2.4.2. Les Composés aromatiques – Composés phénoliques

Cette vaste famille regroupe des composés non azotés présentant des cycles aromatiques, le plus souvent solubles dans l'eau et présents sous forme de glycoconjugués.

Elle comprend des petits composés biologiquement actifs comme l'acide salicylique et certaines isoflavones, des composés présents dans certaines huiles essentielles (en association avec des terpènes à faible poids moléculaire), mais aussi des composés anti-nutritionnels comme les tannins, et la lignine, un polymère de haut poids moléculaire formé à partir d'unités dérivées de l'acide cinnamique.

D'un point de vue biosynthétique (**Figure 13**), la majeure partie des composés aromatiques est constituée de la famille des phénylpropanoïdes, qui dérivent de la phénylalanine. La désamination de cet acide aminé par une enzyme clé – la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), conduit à l'acide cinnamique (**Bruneton, 1999**).

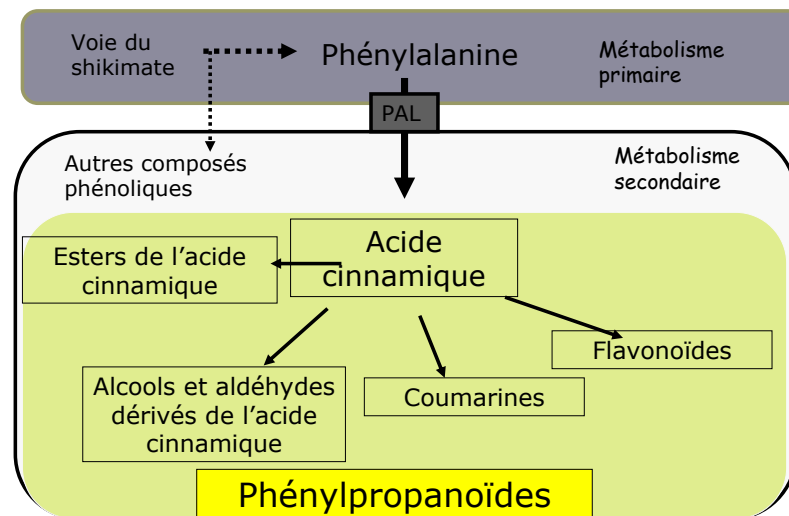


Figure 13. Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

D'un point de vue évolutif, l'apparition de cette enzyme chez les végétaux (présente déjà chez les bryophytes) constitue une étape majeure dans la mesure où elle conditionne la possibilité de synthétiser ce pilier de la croissance érigée qu'est la lignine. L'acide cinnamique, un composé en C6-C3 (un noyau phényl + un acide propénoïque) constitue un carrefour métabolique intermédiaire entre le métabolisme primaire et secondaire.

En plus des phénylpropanoïdes, les composés aromatiques regroupent également des composés issus d'étapes de biosynthèse situées en amont de la synthèse des acides aminés aromatiques, **la voie du shikimate** (**Gorham, 1977**).

Cette voie du shikimate est très spécifique des végétaux et conduit à la synthèse des trois acides aminés essentiels suivants : tryptophane, phénylalanine et tyrosine. Le **glyphosate** (Round Up®) est un inhibiteur spécifique de cette voie qui est largement utilisé en agriculture comme désherbant non-sélectif. L'acide shikimique est accumulé dans l'anis étoilé d'où il est extrait industriellement pour réaliser la synthèse de composés antigrippaux (Tamiflu®). Il est parfois difficile de savoir pour les composés en C6-C1 s'ils proviennent de composés en C6-C3 dérivés de l'acide cinnamique où s'ils sont dérivés d'étapes en amont dans la voie du shikimate. Par exemple, la question de l'origine d'une molécule aussi importante que l'acide salicylique, un acteur majeur des réponses aux stress biotiques, a fait encore jusqu'à très récemment l'objet d'interrogations (**Macheix et al., 2006**).

De la même façon que pour les alcaloïdes, certains composés aromatiques sont en réalité des composés mixtes formés par ajout de résidus terpènes (exemple : formation du noyau furane des furocoumarines) ou par condensation de plusieurs unités C2 à partir du malonyl-CoA. Par exemple, l'initiation de la voie de synthèse des flavonoïdes à partir d'un phénylpropane et de 3 unités malonyl-CoA, est catalysée par la chalcone synthase une enzyme de la famille des polykétide synthases (**Haslam, 1994**).

2.4.3. Les esters, alcools et aldéhydes et dérivés simples de l'acide cinnamique

Regroupent des composés dont certains sont utilisés dans des domaines alimentaires et cosmétiques. On retrouve notamment l'éthyl-cinnamate dans le parfum de la cannelle, l'acide rosmarinique comme constituant des huiles essentielles de Labiées. La vanilline, l'anéthol de l'aneth, l'eugénol du clou de girofle... Ces composés présentent souvent des propriétés antimicrobiennes (**Bruneton, 1999**) et (**Haslam, 1994**).

a-Les Monolignols

Trois alcools dérivant de l'acide cinnamique ont un statut particulier : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapique (**Figure 14**). La polymérisation de différentes proportions de ces composés *via* des liaisons C-O et C-C aboutit à la formation des lignines, des polymères à très haut poids moléculaire qui – au-delà du renforcement des parois végétales - limitent fortement la digestibilité des tissus lignifiés. La composition des lignines est différente entre les gymnospermes (100% coniférylique), les dicotylédones (coniférylique + sinapylrique) et les monocotylédones (coniférylique + sinapylrique + coumarylique). Ces différences ont un impact direct sur des propriétés du polymère telles que la résistance vis-à-vis de procédés utilisés en papeterie pour purifier la cellulose. Contrairement à la cellulose, la lignine n'est pas digérée par les polygastriques, elle constitue un facteur antinutritionnel par exemple dans l'ensilage de maïs (**Privas, 2013**).



Figure 14. Structure des alcools

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à leur double origine biosynthétique (la voie de l'acide shikimique et celle issue de l'acétate-malonate), est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies de synthèse dans l'élaboration de composés d'origine mixte (**Martin et Tsiotaina, 2002**).

b- Les Coumarines

Ces composés issus de la cyclisation du résidu C3 de dérivés du cinnamate, sont souvent synthétisés en réponse à des attaques pathogènes. On parle de coumarines pour les dérivés du noyau de base qu'est la coumarine. Plusieurs coumarines ont des propriétés bactériostatiques, ces composés représentent donc des phytoalexines chez un certain nombre de plantes (ex : la scopolétine qui s'accumule chez le tabac au cours de la réaction hypersensible). La coumarine est une molécule aromatique (au sens olfactif) (**Figure 15**).

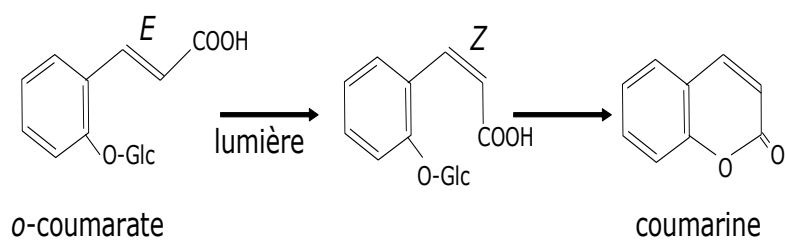


Figure 15. Coumarine

Elle est présente sous forme glycoconjuguée chez certaines graminées (ex : la flouve odorante), mais c'est lorsque les tissus sont endommagés par la coupe que les glycosidases libères la coumarine libre à l'origine de l'odeur de foin coupé. La coumarine est utilisée dans la composition de nombreux parfums (**Haslam, 1994**).

c- Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés phénylpropanoïdes solubles dans l'eau, souvent incolores ou jaunes (sauf exceptions dont les anthocyanes). Ces composés sont des dérivés de la naringénine-chalcone, elle-même issue de la condensation de trois résidus malonyl-CoA avec une molécule d'acide cinnamique (**Figure 16**).

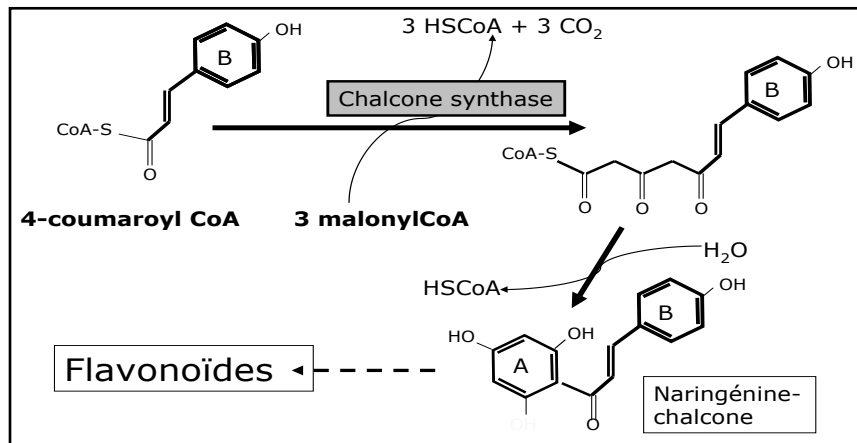


Figure 16. Les flavonoides

Il s'agit donc de dérivés phénylpropanoïdes. La structure de base comporte deux cycles aromatiques à 6 carbones joints par un hétérocycle à oxygène. Les flavonoïdes constituent en eux même une famille de composés extrêmement vaste, jouant des rôles physiologiques importants (interactions Légumineuses/Rhizobium, filtres UV...). La variété des composés est essentiellement liée au degré d'hydroxylation/méthylation/glycosylation de chacun des trois cycles des molécules de base. De nombreux flavonoïdes présents dans produits de consommation présentent un intérêt d'un point de vue de la santé humaine et font l'objet de nombreuses allégations concernant la santé, particulièrement de par leur caractère anti-oxydant. (Heller et Forkmann, 1993).

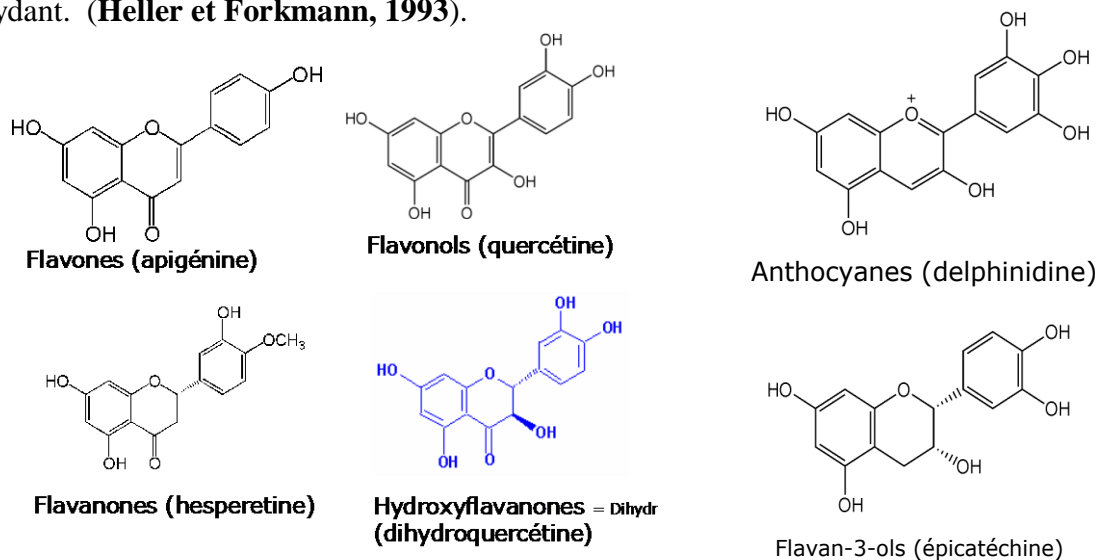


Figure 17. Les principales catégories de flavonoides

Les principales catégories de flavonoïdes sont définies par (**Figure 17**) :

1/ la présence ou l'absence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du cycle C, qui déterminent la planéité de la molécule. Les flavones, flavonols et dérivés présentent une double liaison et sont des molécules planes, contrairement aux flavanes, flavanones et dérivés

2/ la présence de fonctions cétones, alcools et méthoxy (**Yao et al., 2004**).

On peut souligner certains dérivés remarquables :

- **Les anthocyanes** : Contrairement aux autres flavonoïdes qui absorbent en général essentiellement dans le spectre ultra violet, les anthocyanes sont des composés colorés (orange, pourpre à bleu). Ils sont largement impliqués dans la coloration des pétales mais on les retrouve également dans de nombreux tissus (exemple du chou rouge). Leur synthèse dans les organes foliaires est souvent activée par des stress (froid, carences, sénescence...). Ces composés sont beaucoup utilisés comme colorants alimentaires et présentent des propriétés anti-oxydantes. (**Yao et al., 2004**).
- **Les isoflavones** : composés particuliers retrouvés chez les légumineuses (exemple le daidzéine du soja dont les propriétés phytoestrogènes sont particulièrement étudiées), pour lesquels le cycle B est relié au carbone 3 du cycle C. Certains dérivés d'isoflavones sont des bactériostatiques et sont spécifiquement induits lors d'infections par des organismes phytopathogènes. On retrouve en particulier de nombreuses phytoalexines des légumineuses (ex : phaseolline du haricot, glyceolline du soja)
- **Les flavan-3-ols** : composés phagodétendants ayant la propriété de faire précipiter les protéines et impliqués dans la défense contre les pathogènes et phytophages. Ces propriétés font qu'on assimile parfois aux tanins ces molécules de faible poids moléculaire (**Guignard, 1996**).

d- Les tanins

- les tanins non-hydrolysables = Proanthocyanidines

Ces polymères de 2 à 7 résidus flavan-3-ols reliés (catéchine, épicatechine → on parle également de **tanins catéchiques**) par des liaisons C-C non-hydrolyables sont des composés phagodétendants capables de faire précipiter les protéines (en particulier celles de la salive → astringence conférée par les tanins par exemple dans le vin). Cette propriété provoque une baisse d'appétence chez le bétail et surtout une diminution de la digestibilité des protéines (problème des tanins dans le tourteau de colza pour l'alimentation animale).

La précipitation par les tanins des enzymes secrétées par les champignons phytopathogènes nécrotrophes est une propriété qui peut contribuer à la résistance chez certaines plantes. La synthèse des tanins est dans certains cas induite par la perception de stress et médiée par des mécanismes de signalisation impliquant l'acide jasmonique et/ou l'éthylène (**Kamra et al., 2006**).

Il est possible d'oxyder les tanins dans certaines conditions, ce qui permet de libérer des monomères colorés d'anthocyanes (d'où l'appellation synonyme assez courante de proanthocyanidines) (**Figure 18**).

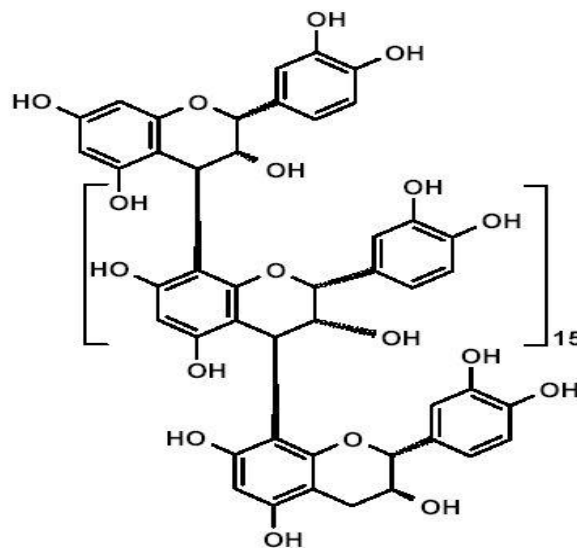


Figure 18. Proanthocyanidines

- Tanins hydrolysables : les gallotanins et les ellagitanins

Ces composés phénoliques présentent des propriétés semblables à celles des proanthocyanidines mais ce ne sont pas des flavonoïdes. Il s'agit d'esters d'acide gallique ou d'acide élagique (dérivé du shikimate) et de glucose (**Figure 19**). On retrouve des gallotanins accumulés dans certaines galles de végétaux qui étaient utilisées pour la fabrication d'encres. Les tanins libérés dans le vin par les tonneaux de chênes sont des ellagitanins, contrairement à ceux apportés par la peau des baies de raisin qui sont des tanins non-hydrolysables (**Rira, 2006**).

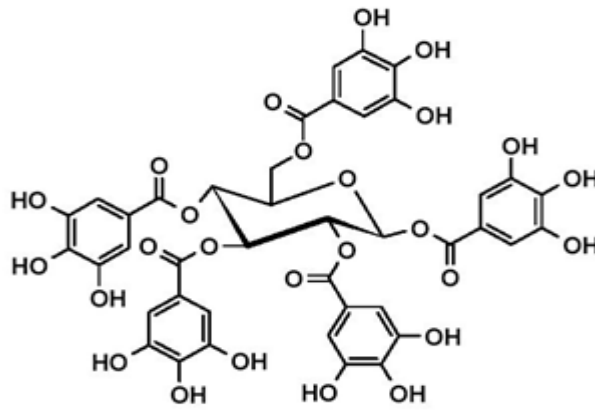


Figure 19. Pentagalloylglucose

2.4.4. Les Isoprénoïdes ou terpénoïdes

Les isoprénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes (**Figure 20**).

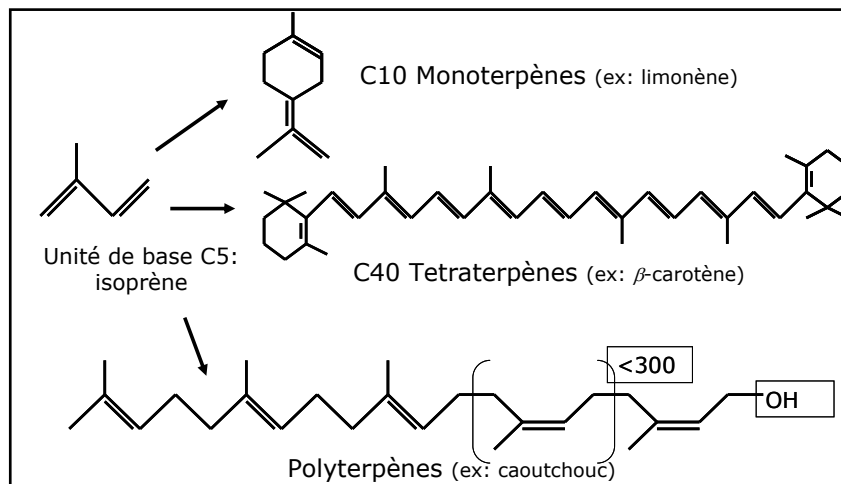


Figure 20. Les composés terpéniques

De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc. Cette voie de biosynthèse donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires, mais participe également à la synthèse de composés comme le α -carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire.

a- Origine biosynthétique de l'isoprène

L'unité de base de biosynthèse est en réalité l'isopentényl diphosphate (IPP = isopentényl pyrophosphate) et son isomère le diméthylallyl-diphosphate. Ces deux composés sont associés en géranyl-diphosphate (précurseur des monoterpènes), en farnésyl diphosphate (précurseur des sesquiterpènes et des triterpènes) et en geranyl-geranyl diphosphate (précurseur des diterpènes et des tetraterpènes) par des isoprényltransférases. Deux voies de biosynthèse conduisent à ces unités de base à 5 carbones.

La première est la **voie du mévalonate**. Elle débute par la condensation de 3 unités acetyl CoA, passe par un composé en C6 (le mévalonate) et débouche sur l'IPP.

La seconde voie – **voie du MEP** ou encore nommée **voie indépendante du mévalonate** - est spécifique des végétaux et se déroule dans les plastes. Elle débute par la condensation d'une unité pyruvate (C3) avec une unité glyceraldéhyde 3-phosphate (C3) et conduit au methylerythritol phosphate (MEP) un composé intermédiaire en C5. Plusieurs étapes enzymatiques conduisent ensuite à la synthèse de l'IPP. Cette voie n'a été mise en évidence qu'à la fin des années 90, elle est absente de la plupart des manuels antérieurs à l'année 2002 mais il s'est rapidement avéré qu'il s'agit de la voie majoritaire pour la biosynthèse de la majeure partie des terpènes. Ce « point de détail » a révélé toute son importance dans le cadre de projets visant à augmenter la synthèse de composés terpénique par transgénèse, par la modulation des niveaux d'expression des enzymes de la voie du MEP.

b- Classification des composés terpéniques

La classification des terpenoïdes repose sur le nombre d'unités terpéniques

C5 : hémiterpènes (une unité isoprène)

C10 : monoterpènes (deux unités isoprène)

C15 : sesquiterpènes (trois unités isoprène)

C20 : diterpènes (quatre unités isoprène)

C30 : triterpènes

C40 : tetraterpènes (caroténoïdes)

C45 et C50 : queues terpéniques des molécules d'ubiquinone et de plastoquinones

Au-delà : polyterpènes (caoutchouc...)

Certains composés importants sont des produits du catabolisme des terpènes, par exemple certains arômes de la tomate et l'acide abscissique (une hormone en C15 de réponse au stress

hydrique, très importante chez les plantes) sont des produits du catabolisme de caroténoïdes (C40) (Guignard, 1974)

- **Monoterpènes**

Composés à 10 carbones, souvent volatils, aromatiques (sens olfactif) et biologiquement actifs (bactériostatiques, signalisation plantes-insectes). Ils sont largement présents dans les résines et les huiles essentielles (**Figure 21**).

On distingue les monoterpènes linéaires, des monoterpènes monocycliques et bicycliques.

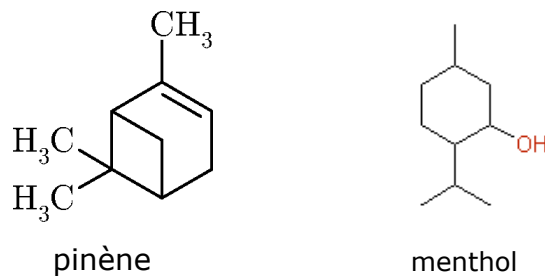


Figure 21. Exemples du pinène constituant majeur de l'essence de térébenthine et du menthol

- **Sesquiterpènes**

Composés à 15 carbones assez universellement représentés les végétaux. Exemple : le farnésol un sesquiterpène linéaire de nombreuses huiles essentielles, abondamment utilisé en parfumerie. On distingue également les sesquiterpènes monocycliques et polycycliques (exemple : le caryophyllène, un sesquiterpène bicyclique en partie responsable du piquant du poivre) (**Figure 22**).

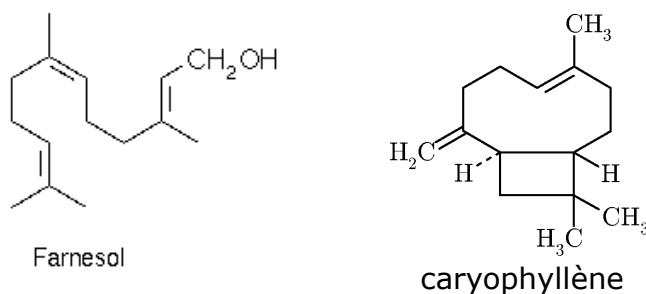


Figure 22. Sesquiterpène linéaire (farnésol) et sesquiterpène bicyclique (le caryophyllène)

- **Diterpènes**

Composés terpénique à 20 carbones. On retrouve parmi les dérivés de diterpènes la queue phytol des chlorophylles a et b et les résidus terpéniques du tocophérol (vitamine E) et de la phylloquinone (vitamine K1).

- **Triterpénoïdes**

Cette famille regroupe des composés dérivés d'une unité à 30 carbones, le squalène. On distingue en fonction du nombre de cycles les monoterpènes pentacycliques des monoterpènes stéroïdiens (tetracycliques). Bien que les composés stéroïdiens soient largement représentés dans le monde animal, de nombreux phytostérols sont spécifiques des végétaux. Les saponosides et les cardénolides sont des hétérosides formés à partir d'un triterpène qui constitue **la génine (= fraction aglycone)** et de résidus glucidiques.

- **Tetraterpènes**

Cette famille de terpènes à 40 carbones, compte en particulier les caroténoïdes (**Figure 23**) dont un pigment photosynthétique majeur (le beta-carotène) mais également des pigments aux propriétés anti-oxydantes comme le lycopène de la tomate (**Guignard,2004**)

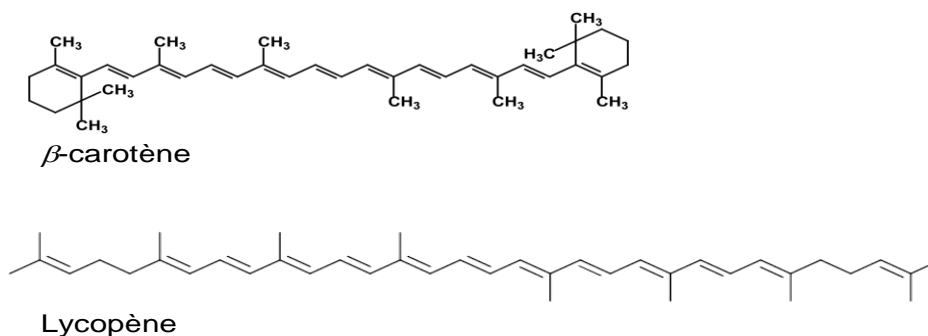


Figure 23. Les caroténoïdes

2.4.5. Les Hétérosides

La littérature anglo-saxonne parle de **glycosides**, terme qu'on peut retrouver dans certaines traductions. Famille de composés issus de la condensation d'un ose avec un composé non-glucidique appelé **la génine** ou encore la **fraction aglycone**. L'origine biosynthétique de ces génines est très hétérogène (composés phénoliques, certains monoterpènes, triterpènes, alcaloïdes terpéniques, composés soufrés...). La glycosylation modifie les propriétés de

solubilité des molécules (composés phénoliques glycosylés plus hydrosolubles, saponines amphiphiles) (Hennebelle *et al.*, 2004).

On peut citer 4 familles importantes d'hétérosides :

- Les **hétérosides cyanogènes**
- Les **glucosinolates**
- Les **saponosides**
- Les **hétérosides cardiotoniques**

On peut citer également les glucoalcaloïdes (ex : chez de nombreuses Solanacées) et de nombreuses formes glycosylées des composés phénoliques. Ces composés sont cependant peu souvent associés aux chapitres « hétérosides » des manuels et autres guides de plantes médicinales.

Bon nombre d'hétérosides correspondent à des formes biologiquement inactives accumulées dans les tissus végétaux, souvent stockées dans les vacuoles (**hétérosides cyanogènes, glucosinolates**). Lors de la rupture des tissus (consommation humaine ou animale, attaques pathogènes), ces composés sont mis en présence avec des enzymes cytoplasmiques qui libèrent les formes toxiques.

Au contraire, dans le cas des **saponosides et des hétérosides cardiotoniques**, les résidus glucidiques peuvent être indispensables aux propriétés biologiques des composés.

a- Hétérosides cyanogènes

Hétérosides dérivés d'acides aminés capables de libérer de l'acide cyanhydrique suite aux actions successives de deux enzymes : une glucosidase qui libère la fraction glucidique, et une hydroxynitrile lyase qui libère l'acide cyanhydrique (toxique) plus la fraction aglycone. Dans le cas de l'amygdaline (**Figure 24**), un hétéroside cyanogène présent dans **les noyaux de certaines Rosacées**, la fraction aglycone correspond à du benzaldéhyde responsable d'un arôme caractéristique d'amande amère. Les quantités d'acide cyanhydrique libérées peuvent poser des réels problèmes dans le cadre de l'alimentation animale et humaine.

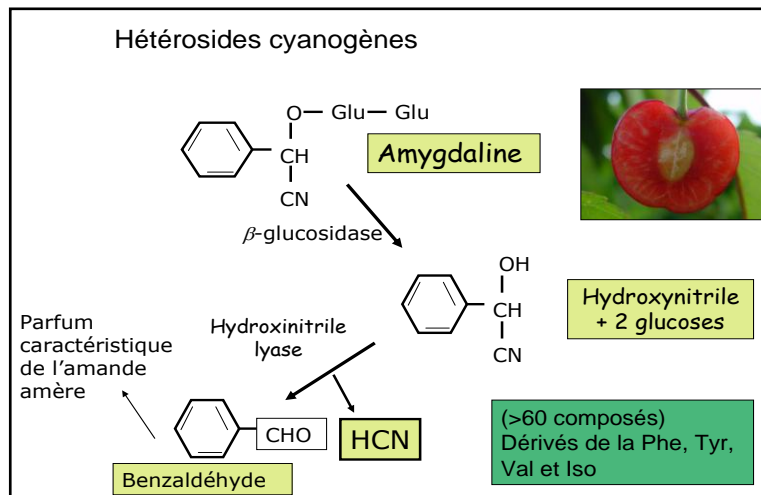


Figure 24. L'amygdaline

On considère qu'une plante est cyanogène à partir de 10 mg de HCN par kg de masse fraîche. Les exemples classiques sont le **sorgho** et le **manioc**. Les jeunes pousses de sorgho contiennent des quantités importantes de dhurrine pouvant provoquer des intoxications du bétail. La consommation du manioc nécessite donc une étape de cuisson qui permet de volatiliser l'acide cyanhydrique. Tous les tissus animaux contiennent une thiosulfate sulfurtransférase qui convertit l'acide cyanhydrique en thiocyanate, c'est uniquement lorsque les capacités de détoxication sont dépassées que survient l'intoxication (neuropathie ataxique tropicale associée à la consommation de manioc : beaucoup de symptômes dont le goitre associé à des niveaux élevés de thiocyanate dans le sang).

Pour l'alimentation animale, c'est surtout le sorgho qui pose problème. La dhurrine est contenue dans les cellules épidermiques et que les glucosidases sont dans le mésophylle, toute action de blessure provoque une élévation des teneurs en HCN. Les dégâts foliaires provoqués par le gel sont responsables de nombreuses intoxications (**Guignard,2004**).

b- Glucosinolates

Hétérosides soufrés (**thioglucosides**) dont les génines sont dérivées d'acides aminés, relativement caractéristiques des plantes de l'ordre des Brassicales et responsables du goût âcre caractéristique des choux, de la moutarde. L'hydrolyse de ces composés par des enzymes spécifiques des plantes qui les synthétisent produit différents composés toxiques (**Figure 25**):

- les isothiocyanates, volatiles et impliqués dans les odeurs caractéristiques des Brassicacées comme le radis noir par exemple, mais également des capucines (Tropaéolacées)
- les thiocyanates
- Les nitriles.
- Les isothiocyanates ont à haute dose un effet goitrogène lié à l'inhibition de l'absorption de l'iode par la thyroïde. Ces composés sont également des phagodéterrants puissants bien que certains insectes spécialistes aient contourné le problème et même à faire de la présence de glucosinolates un déterminant de leur comportement alimentaire et reproducteur. Des variétés de colza à faibles teneurs en glucosinolates dans les graines ont été développées dès le début de la seconde moitié du XXe siècle pour limiter les phénomènes d'inappétence concernant l'utilisation des tourteaux en alimentation animale.

Remarque : la distribution taxonomique des glucosinolates est beaucoup plus restreinte que celle des hétérosides cyanogènes (**Gravot, 2009**).

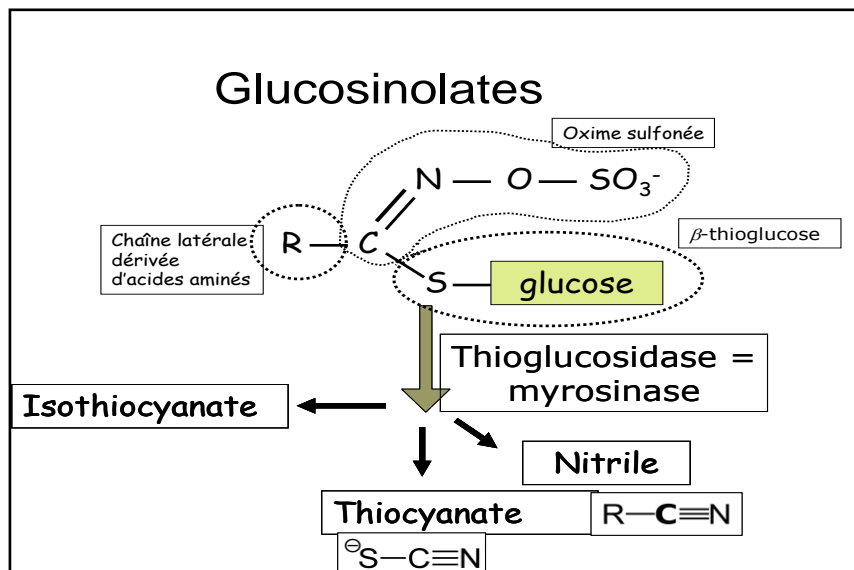


Figure 25. Les différents composés des glucosinolates

c- Saponosides

On parle également de saponines. Hétérosides formés d'une génine de type triterpène appelée sapogénine, et de groupements osidiques. Il s'agit de composés souvent amers, amphiphiles aux propriétés tensioactives qui ont pu être mises à profit pour la confection de détergents. Ces molécules ont également la propriété d'affecter la stabilité membranaire par interaction avec le cholestérol membranaire. Ce mécanisme impacte les membranes du système intestinal et la présence de saponine par exemple dans la luzerne est susceptible de diminuer les performances zootechniques. Le principal mécanisme de toxicité est cependant lié à un phénomène un peu complexe qui affecte le foie, provoque l'accumulation sanguine de catabolites de la chlorophylle, qui sous l'effet des UV vont causer des phénomènes de photosensibilisation. Par ailleurs, les saponosides sont également impliqués dans la résistance à des pathogènes (exemple de l'avécanine de l'avoine). On distingue

- les saponosides à génine triterpénique pentacyclique (**Figure 26**)
- les saponosides à génine stéroïde
- les saponosides à alcaloïde stéroïdiens qui correspondent aux glucoalcaloïdes qu'on retrouve par exemple chez les Solanacées (**Gravot, 2009**).

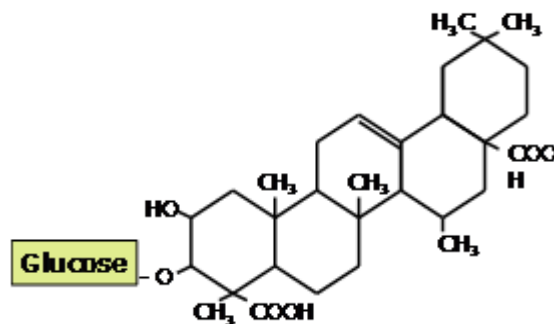


Figure 26. Saponoside triterpénique : glucoside de l'acide médigénique

d- Hétérosides cardiotoniques

Il s'agit de composés semblables aux saponosides, formés d'une génine stéroïdique ayant la particularité de contenir un cycle lactone à 4 ou 5 carbones (cardénolides et bufanolides). De plus la fraction osidique des hétérosides cardiotonique est constituée d'oses particulièrement rares, dont certains ne sont présents naturellement que dans ce type de molécules (exemple du digitoxose de la digitoxine (**Figure 27**), un hétéroside cardiotonique de la digitale). Les

hétérosides cardiotoniques sont largement utilisés pour leur **action sur le cœur**, liée à leur activité d'inhibition des ATPases Na^+/K^+ .

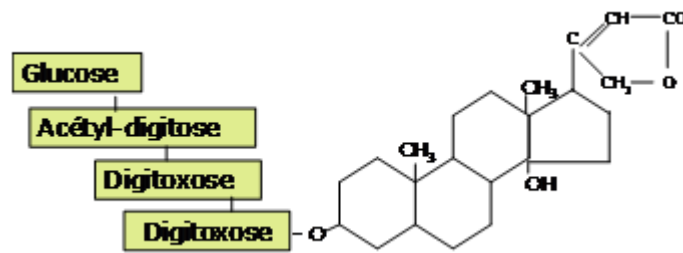


Figure 27. La digitoxine

Les hétérosides cardiotoniques sont connus également comme des molécules accumulées par les papillons Monarques, emblématiques des USA. Ces insectes sont des spécialistes d'une plante, l'Asclépias, qui contient des grandes quantités de cardénolides que les chenilles de monarques sont capables de stocker dans leurs tissus et de mettre à profit ces composés toxiques et phagodétendants pour leur défense vis-à-vis de certains oiseaux comme par exemple le geai bleu. Ce modèle de coévolution biochimique a été mis en évidence par l'équipe de Miriam Rothschild et est devenu un des éléments fondateurs d'une discipline : l'écologie chimique (Gravot, 2009).

e- Autres glucosides

- **Glycosides de coumarines** : L'exemple classique est le mélilotoside du mélilot, condensation de glucose et de coumarine, qui inhibe le métabolisme de la vitamine K qui est impliqué dans la coagulation. Les symptômes d'intoxication avec du mélilot sont donc des syndromes hémorragiques chez le bétail.
- **Vicine et convicine** : Glucosides à aglycone pyrimidique, dont le pouvoir oxydant altère les membranes de globules rouges, provoquant des anémies hémolytiques. La détoxification de ces aglycones s'effectue par réduction à partir du glutathion, lui-même régénéré sous forme réduite par la voie des pentose-phosphates qui dépend notamment du fonctionnement de la G6PDH. Les êtres humains porteurs d'allèles défectueux du gène codant la G6PDH sont susceptibles d'intoxication par la vicine et la convicine, cette pathologie est appelée le favisme (100 millions de personnes concernées). D'un point de vue de l'alimentation animale, les poules pondeuses sont particulièrement sensibles (Gravot, 2009).

3. Compartimentation tissulaire et sub-cellulaire de la synthèse et de l'accumulation des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont pour la plupart, toxiques pour les cellules végétales elles mêmes. Leur accumulation à des teneurs pouvant atteindre des pourcentages élevés relativement à la biomasse suppose des mécanismes particuliers pour limiter leur toxicité.

On peut citer:

La **sécrétion extracellulaire** des métabolites secondaires peu solubles dans l'eau (essentiellement des terpènes mais pas uniquement) :

- accumulation sous-cuticulaire des huiles essentielles au niveau de poils (trichomes) glanduleux (exemples chez les Lamiacées)
- accumulation dans des poches à essence (exemple de la famille des Rutacées)

La **glycosylation et/ou la séquestration vacuolaire**

- nombreux composés phénoliques

L'accumulation intracellulaire des métabolites dans des **tissus ou cellules très spécialisés**

- laticifères : exemple du latex riche en alcaloïdes chez le pavot
- idioblastes : exemple de la synthèse des alcaloïdes chez la pervenche de Madagascar
- trichomes

La **compartimentation** des enzymes responsable de la conversion d'un précurseur en un produit toxique (exemples de la juglone, des glucosinolates et des composés cyanogénétiques) est également une stratégie largement répandue.

Enfin, bon nombre de composés phénoliques s'accumulent dans l'apoplaste au niveau des parois végétales où ils jouent à la fois des rôles structuraux (lignine et pontages d'hémicelluloses) mais également dans la limitation de la progression des pathogènes.

4. Relations entre métabolisme secondaire et métabolisme primaire

Les jonctions entre métabolisme primaire et secondaire sont nombreuses et parfois complexes. Les principales sont synthétisées dans le schéma suivant qui indique également l'origine biosynthétique des principales phytohormones. Les étapes enzymatiques les plus représentatives sont (**Figure 28**):

- la phénylalanine ammonia lyase (PAL) qui initie la synthèse de la plupart des composés phénoliques à partir d'un acide aminé
- la chalcone synthase qui initie la synthèse des flavonoïdes à partir du malonyl CoA et d'un élément phénylpropane
- la voie mévalonate indépendante de biosynthèse de l'isopentényl diphosphate (IPP), à l'origine de la synthèse de plus grande partie des terpenoïdes

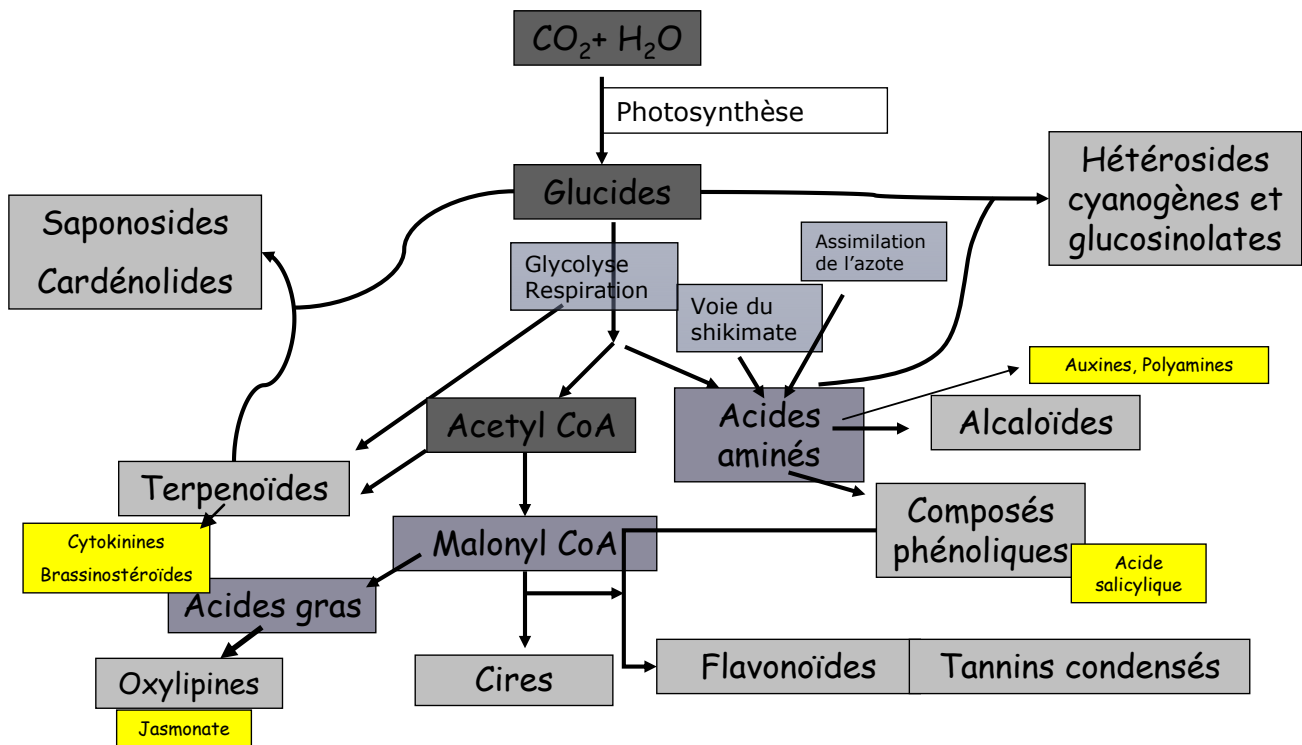


Figure 28. Relations entre métabolisme secondaire et métabolisme primaire (Gravot, 2009)

III. Activités biologiques des métabolites secondaires

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans de nombreux produits de consommation. En effet, Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application (alimentaire, cosmétiques, pharmaceutiques...etc.) (**Penchev, 2010**).

Les composés chimiques retrouvés dans les huiles essentielles responsables de l'odeur de celles-ci sont des substances actives dotées de propriétés antibactériennes, fongicides, insecticides (**Poitou, 1996; Jirovetz et al., 2000; Ngamo et al., 2001**).

1. Activité antioxydante

Les antioxydants présents dans les produits cosmétiques et les préparations de dermatopharmacie sont soit d'origine synthétique, soit d'origine naturelle. Ce sont tous des réducteurs capables d'interrompre la réaction de peroxydation et d'empêcher la formation des hydro-péroxydes et des peroxydes à partir des huiles insaturées en particulier. Ils sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi neutraliser l'oxydation de ces substrats.

Les huiles essentielles limitent l'extension des réactions radicalaires comme des antioxydants susceptibles de piéger les radicaux libres sous une forme peu réactive (**Kalustian et hadji-Minaglou, 2012**).

2. Activité antimicrobienne

2.1. Les métabolites secondaires face aux antibiotiques : la notion de la non-accoutumance

Une des propriétés capitales des substances naturelles est que leur pouvoir antimicrobien ne s'estompe absolument pas avec le temps. Ces produits naturels, en plus de leur capacité de maîtriser les mécanismes de l'infection, ont comme propriété fondamentale de renforcer les

défenses de l'organisme pour lui permettre de vaincre. Les métabolites secondaires avec leur grande diversité biochimique, sont de puissants modificateurs du terrain où peut s'installer la maladie, l'organisme ne peut s'y habituer, alors qu'il s'habitue de plus en plus facilement, ainsi d'ailleurs que les microorganismes, aux nombreux traitements par les antibiotiques.

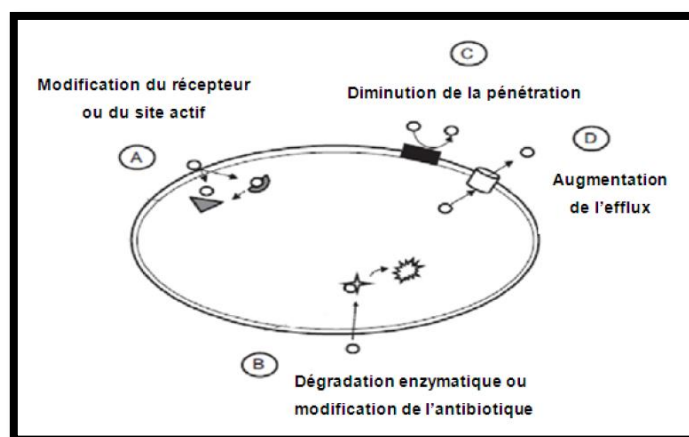
Les antibiotiques modifient la constitution chimique des microorganismes. A ce moment-là, l'organisme lutte contre les produits sécrétés par les microorganismes, les toxines, avec les substances que lui-même sécrète, les anticorps. Or les toxines provenant des microorganismes modifiés, seront elles-mêmes modifiées, et l'organisme produira des anticorps qui lutteront contre des toxines modifiées.

Ainsi donc, l'organisme est en lutte contre des microorganismes modifiés par les antibiotiques, et non contre les microorganismes en leur virulence originelle, et ainsi, petit à petit, les antibiotiques perdent leur pouvoir, l'organisme reste à tout moment victime d'une nouvelle infection.

Les essences naturelles agissent différemment et par plusieurs stratégies, cela est due essentiellement à leur grande diversité biochimique, biosynthétique et leurs propriétés thérapeutiques. Les résultats demeurent constants et ne s'amenuisent pas avec le temps.

En revanche, l'organisme s'habitue très facilement aux médicaments synthétiques : c'est ce qui est appelé l'accoutumance.

D'autre part, les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques via différents mécanismes selon **Hemaiswarya et al., (2008) (Figure 29)**. Elles peuvent acquérir des gènes codant des enzymes, telles que les β -lactamases, qui détruisent l'agent antibactérien avant qu'il produit un effet. En plus, elles peuvent acquérir des pompes d'efflux qui extrudent l'agent antibactérien de la cellule avant qu'il n'atteigne le site de sa cible. Par ailleurs, les bactéries peuvent acquérir plusieurs gènes pour une voie métabolique qui aboutit à la production de parois cellulaires altérées ne contenant plus de sites de fixation des agents antimicrobiens, ou encore acquérir des mutations qui limitent l'accès des agents antimicrobiens aux sites intracellulaires des cibles via la régulation négative des gènes codant les porines. Finalement, la résistance peut être acquise via l'échange génétique entre les bactéries, voire, la transformation (incorporation de segments d'ADN libérés dans le milieu extérieur par une autre bactérie après la lyse cellulaire), la conjugaison (échange des gènes de résistance entre deux bactéries via le contact physique) ou la transduction (transfert des gènes de résistance entre les bactéries via les bactériophages) (**Tenover, 2006**).



La substance antibiotique : ○ Récepteur : ● Dégradation de l'antibiotique : ✨
 Pompe d'efflux : □ Enzyme : ✨ Récepteur modifié : ▼

Figure 29. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques
 (Hemaiswarya *et al.*, 2008)

2.2. L'activité antimicrobienne des métabolites secondaires

Les extraits et essences naturelles ont un pouvoir bactéricide lié à la présence de composés phénoliques. On peut citer les essences de girofle (désinfectant en chirurgie dentaire), de thym (antiseptique intestinal et respiratoire, etc.). Ces essences peuvent être remplacées par leur composé actif : thymol, eucalyptol, etc.

Les activités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XXe siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés sont dues, notamment, aux métabolites secondaires contenus dans les plantes (Caillet et Lacroix, 2007; Bouaoun *et al.*, 2007).

En phytothérapie ces métabolites sont utilisées contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires ou la microflore vaginale, ou d'origine fongique comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes. Les huiles essentielles peuvent présenter des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants entant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Cette activité antimicrobienne des plantes est principalement en fonction de leurs métabolites secondaires et des composés volatils majeurs.

2.3. Activité antibactérienne

La première mise en évidence de l'action des extraits des végétaux contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix. Depuis, de nombreuses huiles et extraits ont été définies comme antibactériennes (Tableau06). Cette activité est par ailleurs variable d'une plante à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Les extraits et les huiles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positives que sur les bactéries à Gram négatives (**Guinoiseau, 2010**).

2.4. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des plantes médicinales a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (**De Billerbeck et al., 2002; Koba et al., 2004; (Oussou et al., 2004); (Ouraini et al., 2005)**) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (**Teixeira-Duarte, 2005**).

3. Activité antivirale

De nombreuses familles de molécules chimiques rencontrées dans les extraits végétaux ont montré "In vivo" une activité antivirale et, parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénals qui interviennent à la famille des huiles essentielles (**Freeman et Carel, 2006**). Selon les travaux d'**Inouye et Abe (2007)**, il existe des HEs de plantes exotiques très puissantes qui ont un fort pouvoir antiviral et qui sont connues pour leur efficacité. Les HEs sont sélectivement absorbées et perturbent les fonctions des membranes biologiques. Elles ne sont actives que sur les virus à enveloppe comme celui de la grippe et du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (**Inouye et Abe, 2007**).

4. Activité insecticide et antiparasitaire

L'effet insecticide et antiparasitaire des huiles essentielles par contact, ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les prédateurs des denrées entreposées, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer et de rentabiliser leur activités contre les insectes et les parasites (**Isman, 2005**).

Les huiles essentielles des plantes appartenant aux genres *Chenopodium* et *Eucalyptus* ont témoigné de leur efficacité insecticide, la poudre de *Chenopodium ambrosioides* était testée sur six ravageurs de denrées stockées : *Callosobruchus maculatus*, *C.chinensis*,

Acanthoscelides obtectus, *Sitophilus granarius*, *S.zeamais* et *Prostephanus truncatus*; une concentration de 0,4% provoqua la mortalité de plus de 60% des bruches après deux jours de traitements (**Tapondjou et al., 2002**).

5. Activité anti-inflammatoire

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (**Inouye et Abe, 2007**). De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anti-inflammatoires et anticancéreux (**Edris, 2007**).

IV. Le Nickel

Le nickel est un métal lourd blanc, dur, argenté qui possède un éclat poli, ferromagnétique brillant, il est le quatrième métal le plus utilisé au monde. L'un des micronutriments essentiels pour la croissance et le développement des plantes et il est également un oligo-élément essentiel pour l'organisme, dont les carences sont graves. La dose quotidienne de nickel ingéré se situe idéalement entre 100 et 300 µg/jour, mais peut varier de 100 à 800 µg selon les habitudes alimentaires.

1. Les propriétés physico-chimiques du nickel

Tableau 02. Propriétés physico-chimiques du nickel (OEHHA, 2001).

Propriétés	Nickel
Numéro atomique	28
Masse atomique (g.mol ⁻¹)	58.69
Masse volumique (g.cm ⁻³)	8.90
Formule chimique	Ni
Etat physique	Solide
Couleur	Argenté
Point de fusion	1455°C
Point d'ébullition	2730°C
Densité	8.9g /cm ³
Solubilité dans l'eau	101mg/L a 37°C
Pression de vapeur	1mm Hg a 1.810°C
Electronégativité (alled et Rochow)	1.75
Electronégativité (Pauling)	1.91
Rayon atomique (Å)	1.25
Degré d'oxydation (gras = le plus stable)	2 ; 3
Rayon ionique pour M2+ (Å)	0.72
Rayon ionique pour M3+(Å)	0.62
Potentiel d'ionisation pour M2+(volts)	18.15
Potentiel d'ionisation pour M3+(volts)	36.16

2. Les dérivés du nickel et leurs utilisations

Un grand nombre de composés du Ni a été identifié et caractérisé ; beaucoup d'eux comme le sulfate de nickel, le nitrate de nickel, le chlorure de nickel et l'acétate de nickel sont relativement solubles dans l'eau. Cependant, les autres composés de ce métal comme l'hydroxyde de nickel, l'oxyde de nickel, le sulfure de nickel et le subsulfure de nickel sont pratiquement insolubles dans l'eau. Les formules chimiques et les formes physiques des composés du Ni sont mentionnées dans le tableau 2 (OEHHA, 2001).

- le sulfate de nickel est utilisé dans les bains de nickelage, comme intermédiaire dans la fabrication de carbonate de nickel et de sulfate d'ammonium et de nickel. C'est la principale intermédiaire pour la fabrication de sels de nickel. Il sert à produire des catalyseurs et est employé comme mordant pour les textiles. Il est également employé pour le noircissement du zinc et du bronze.
- Le nickel tétracarbonyle est employé dans la fabrication de poudre de nickel de haute pureté. Il est également utilisé comme mordant catalyseur en synthèse organique.
- L'acétate de nickel est utilisé comme mordant pour les textiles, comme intermédiaire dans la fabrication d'autres composés du nickel et comme catalyseur.
- Le chlorure de nickel est employé pour le nickelage, pour fabriquer des encres sympathiques et comme réactif de laboratoire. Il sert également à piéger l'ammoniac dans les masques à gaz.
- Le nitrate de nickel entre dans la composition de bains de nickelage et est utilisé comme colorant pour les porcelaines. Il est également employé dans les batteries cadmium-nickel.
- L'oxyde de nickel est utilisé dans la fabrication de sels de nickel, dans la fabrication de ferrites utilisées dans l'industrie électronique, dans la production de catalyseurs et pour le nickelage. Il est également employé comme colorant pour le verre et utilisé dans les peintures sur porcelaine.
- Le sulfure de nickel est utilisé dans la production de catalyseurs et dans l'hydrogénation des composés de soufre en pétrochimie (Pichard *et al*, 2006).

Tableau 03. les différentes formes physiques du nickel (INRS, 1992; INERIS, 2006; Brignon *et al.*, 2006)

Substance chimiques	Forme physique
Nickel tetracarbonyle	Liquide Très peu soluble
Acétate de nickel	Solide cristallisé Soluble
Oxyde de nickel	Poudre Insoluble
Hydroxyde de nickel	Poudre Très peu soluble
Carbonate de nickel	Cristaux Très peu soluble
Chlorure de nickel	Solide cristallisé Très soluble
Nitrate de nickel	Solide cristallisé Très soluble
Sulfure de nickel	Solide cristallisé Insoluble
Sulfate de nickel	Solide cristallisé Facilement soluble

3. Principales sources d'exposition

La croûte terrestre contient environ 0,009 % de nickel dans les minerais sulfurés, arséniures, antimoniures, oxydés et silicatés. De plus, le nickel est présent dans l'air, dans les particules en suspension, après avoir été rejeté par des activités humaines ou des phénomènes naturels, comme les éruptions volcaniques, les incendies de forêts et les météorites provenant de la haute atmosphère (Hoet, 2007).

4. Apport alimentaire

La présence de nickel dans la nourriture est due à deux facteurs principaux. La plante elle-même absorbe une partie du nickel présent naturellement ou artificiellement dans le sol. Mais il est connu que certains végétaux arrivent à concentrer 1000 fois ce taux normal. A cette source primaire peut s'ajouter le nickel qui passe secondairement dans les aliments du fait de leur contact avec des ustensiles en acier inoxydable (**Brun, 1979**).

La viande et le poisson sont également relativement riches en nickel et ceci d'autant plus que l'âge des animaux augmente. Les produits laitiers et les boissons sont plutôt pauvres en nickel. Les margarines contiennent des quantités de nickel élevées, puisque celui-ci est utilisé comme catalyseur dans l'hydrogénation commerciale (**Stoltz et al., 2003**).

Les aliments les plus riches sont : cacao, chocolat, soja, les légumes sec, les noix, les céréales.

5. La toxico-cinétique du Nickel

5.1. L'absorption

L'absorption du nickel existe également par voie cutanée. Cette voie est peu significative quantitativement mais importante cliniquement dans la pathogénie de la dermatite de contact. Il n'existe pas de différence d'absorption du nickel par voie cutanée entre les sujets hypersensibles et les autres (**Lloyd, 1980**).

Le contact avec la peau peut causer une dermatite et un type d'eczéma chronique, connu sous le nom de "Démangeaison au nickel", causée par des réactions d'hypersensibilité du nickel sur la peau (**Halioua et Richard, 2010**).

5.2. Distribution

La distribution du nickel varie selon la voie d'exposition. Des travailleurs exposés par inhalation au nickel présentent des taux pulmonaires plus élevés que la population en générale, Une étude autopsique d'individus non exposés professionnellement au nickel a montré que les plus fortes concentrations étaient mesurées dans les poumons, puis dans la thyroïde, les glandes surrénales, les reins, le coeur, le cerveau, la rate et le pancréas (**Rezuke et al., 1987**). Le nickel traverse la barrière foeto-placentaire et s'accumule dans les tissus du foetus (**Jasim et Tjalve, 1986**).

Les études de **Dieter et al., (1988)** ; **Sidhu et al., 2004** ; **Pari et Prasath (2008)** suggèrent que l'intoxication par le nickel témoigne d'une dégénérescence des hépatocytes. Ainsi, le sulfate de nickel administré par voie cutanée ou orale provoque chez le rat des effets

hépatiques qui se traduisent par un gonflement des hépatocytes, une nécrose focale et une vacuolisation accompagnés d'une augmentation de l'activité enzymatique du foie notamment de la catalase, les transaminases, une augmentation de lipides et de la bilirubine.

5.3. Elimination

Après inhalation, le nickel particulaire insoluble est très lentement éliminé, ce qui entraîne une accumulation avec le temps. L'excrétion du nickel dépend de l'origine de l'exposition ; son élimination se réalise majoritairement par les urines (3-6%). En cas d'ingestion, la plus grande partie du nickel (non absorbé) est excrété par voie fécale (94-97%) et à des taux très faibles dans la sueur. **(Onkelinx et al., 1973).**

6. La toxicité du Nickel

6.1. La toxicité aiguë

C'est le nickel carbonylé qui présente la toxicité aiguë la plus forte pour l'homme. Elle se traduit par des céphalées frontales, des vertiges, des nausées et vomissements, de l'insomnie et de l'irritabilité, puis par des symptômes pulmonaires évoquant une pneumonie d'origine virale. Un décès par syndrome respiratoire a été observé chez une personne qui pulvérisait du nickel lors d'un procédé de soudure sans porter d'équipement de protection. Des effets toxiques ont également été observés chez des travailleurs d'installation de galvanisation ayant bu accidentellement de l'eau contaminée par du sulfate et du chlorure de nickel. Des tests épicutanés au sulfate de nickel réalisés chez des individus sensibilisés au nickel ont montré une relation entre la quantité de nickel et la sévérité de la réponse. **(INRS, 2009).**

6.2. La toxicité chronique

Les études chez l'homme et l'animal indiquent que le système respiratoire est la cible principale de la toxicité du nickel par inhalation. Une augmentation de l'incidence des décès par pathologie respiratoire a été trouvée chez des travailleurs exposés chroniquement à des concentrations supérieures à 0,04 mg de nickel /m³ sous forme de monoxyde ou de métal. **(Cornell et Landis, 1984).**

Les effets respiratoires étaient de type bronchite chronique, emphysème, diminution de la capacité vitale. Cependant, la toxicité observée ne peut être uniquement au nickel puisque les

travailleurs étaient exposés à d'autres métaux comme : l'arsenic, l'uranium, le fer, le plomb et le chrome. D'autres études ne mettent pas en évidence d'augmentation de l'incidence des décès par pathologie respiratoire (Cox *et al.*, 1981 ; Enterline et Marsh, 1982; Shannon *et al.*, 1984).

Chez des travailleurs exposés au nickel (composé non précisé), une augmentation significative des IgG, des IgA et des IgM et une diminution significative des IgE a été observée (Shannon *et al.*, 1991).

6.3. Toxicité subchronique

Un certain nombre d'études chez l'homme et chez l'animal suggèrent que l'exposition aux sels solubles de nickel entraîne l'apparition d'effets systémiques sur les reins, la mortalité néonatale et des effets sur le système immunitaire. Le rein constitue le principal organe cible tant chez l'animal que chez l'homme. (Dieter *et al.*,1988; Smith *et al.*, 1993).

7. Effet du nickel sur les différents organes

Un certain nombre d'étude chez l'homme et l'animal suggèrent que l'exposition aux sels de nickel entraîne l'apparition d'effets systémique sur les reins, le foie, les poumons. Ce sont les principaux organes cibles tant chez l'animal que chez l'homme (Ambrose *et al.*, 1976 ; Dieter *et al.*,1988; Smith *et al.*, 1993; Vyskocil *et al.*, 1994a, 1994b).

7.1. Effet du nickel sur les reins

L'exposition au nickel se traduit par le dysfonctionnement de la fonction rénale. Ainsi, l'exposition à de fortes doses de nickel métallique a provoqué une nécrose des tubules rénaux chez un homme décédé suite à une détresse respiratoire (Rendall *et al.*, 1994). De plus la concentration en nickel dans l'urine augmente notablement après plusieurs jours d'exposition au Nickel (Sunderman, 1993).

Les rates exposées au sulfate de nickel dans l'eau de boisson montrent un changement du taux urinaire en albumine à la fois chez la femelle que chez le male, alors que la teneur en glucose diminue (Obone *et al.*, 1999).

7.2. Effet du nickel sur le système hépatique

Chez le rat, l'intoxication par le nickel témoigne d'une dégénérescence des hépatocytes. Ainsi, le sulfate de nickel administré par voie cutanée ou orale provoque chez le rat des effets hépatique qui se traduisent par un gonflement des hépatocytes, une nécrose focale et une vacuolisation (Dieter *et al.*, 1988; Novelli *et al.*, 1998; Sidhu *et al.*, 2004) accompagnés d'une augmentation de l'activité enzymatique du foie notamment de la catalase, l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (AST), une augmentation du taux des lipides peroxydase et de la bilirubine (Sunderman *et al.*, 1988; Pari et Prasath, 2008). De plus, chez les rats males et les souris, le sulfate de nickel administré dans l'eau de boisson provoque une chute du poids du foie (Obone *et al.*, 1999).

7.3. Effet du nickel sur le système respiratoire

Les études chez l'homme et l'animal indiquent que le système respiratoire est la cible principale de la toxicité du nickel le nickel qui parvient au niveau pulmonaire a tendance à persister au niveau des poumons la rétention dépend notamment de la solubilité des composés et captage cellulaire. La muqueuse nasale peut retenir du Ni pendant de nombreuses années (Torjussen *et al.*, 1978, 1979a, 1979b).

Les formes insolubles, après phagocytose par les macrophages, peuvent générer des quantités très importantes d'espèces réactives de l'oxygène, surtout avec le sous-sulfure Ni₃S₂ (Zhong *et al.*, 1990 ; Huang *et al.*, 1994).

Des changements histopathologiques par des dommages aux poumons (congestion, inflammation, fibrose et oedème) ont été noté chez des rats et des souris exposés au sulfate de nickel hexahydraté pendant 12 jours (Benson *et al.*, 1987 ; Dunnick *et al.*, 1988).

Parmi les effets observés dans les voies respiratoires, on compte une inflammation des poumons accompagnée d'une pneumonie nécrosante et d'une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires chez les souris, une dégénération de l'épithélium respiratoire chez les rats et une atrophie de l'épithélium olfactif chez les deux espèces (Dunnick *et al.*, 1988 ; Haley *et al.*, 1990).

8. Effet cancérigènes

Le nickel est responsable de certains cancers du poumon en milieu professionnel chez l'homme et l'animal. C'est principalement l'inhalation de composés solubles qui est associée avec le risque le plus élevé de cancer des voies aériennes. En 1990 ; le nickel et les composés du nickel ont été classés par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) dans le groupe 1 « cancérigène chez l'animal de laboratoire » (**Denkhaus et Salnikow, 2002**).

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

Les échantillons de *Salvia argentea* utilisées dans les différentes parties de cette étude ont été récoltés dans la wilaya de Saida dans la période s'étalant entre (2015 et 2018), précisément dans la région de Hammam Rabi . La récolte des plantes a été réalisée en stade de pleine floraison (**Figure 30**). L'identification de la plante a été faite par le botaniste du département de Biologie de l'Université de Saida (Pr. Hasnaoui O). Un spécimen de *Salvia argentea* a été déposé dans l'herbier du département de biologie de l'université.

La partie aérienne de la plante a été lavée puis séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant un mois, avant d'être broyé pour obtenir une poudre fine.

Tableau 4. La situation géographique du lieu de récolte.

Région	Latitude	Longitude	Elévation	Altitude	Etage bioclimatique
Nord Est de hamam rabi (Saida,Algérie)	34°56'22.83"N	0°12'29.67"E	732 m	6.22 Km	Hiver : froid Été : Chaud et sec



Figure 30. *Salvia argentea* au stade de la floraison

II. Enquête ethno-pharmacologique

1. Présentation de la zone d'étude

La wilaya de Saïda, surnommée la ville des eaux à cause de ses sources, est située dans le nord-ouest de l'Algérie (34° 40' 0" N, 0° 19' 60" E). Avec 350 766 habitants, Saida s'étend sur une superficie de 6765,40 km² (DRCS, 2016). Elle est limitée au nord par la wilaya de Mascara, au sud par la wilaya d'El-Bayadh, à l'ouest par la wilaya de Sidi-Bel-Abbès et à l'est par la wilaya de Tiaret (**Figure 31**). Cette position lui donne un rôle de relais entre les wilayates steppiques au sud et les wilayates telliennes au nord, et permet l'extension de la biodiversité des espèces végétales dans cette wilaya. Elle contient 16 communes distribuées sur 06 daïras.



Figure 31. Carte de la situation géographique de la wilaya de Saida

2. Méthodes d'études

L'enquête ethno-pharmacologique auprès des herboristes en contact avec les plantes médicinales vise à permettre d'identifier le rôle potentiel de *Salvia argentea* dans la pharmacopée traditionnelle et l'impact induit dans la prophylaxie.

L'étude a été réalisée à l'aide d'un questionnaire auprès de 42 herboristes, à travers 8 communes de la Wilaya de Saida, dont 14 dans le chef-lieu, 06 à Youb, 02 à Sidi Boubekeur, 05 à Ain El Hdjar, 02 à Hessian, 03 à Moulay El Arbi, 04 à Sidi Ahmed et 06 à Ouled

Brahim (Figure9). Cette disparité dans le choix des sites et du nombre des points d'enquête, est en fonction du nombre des habitants par commune (Figure 32).

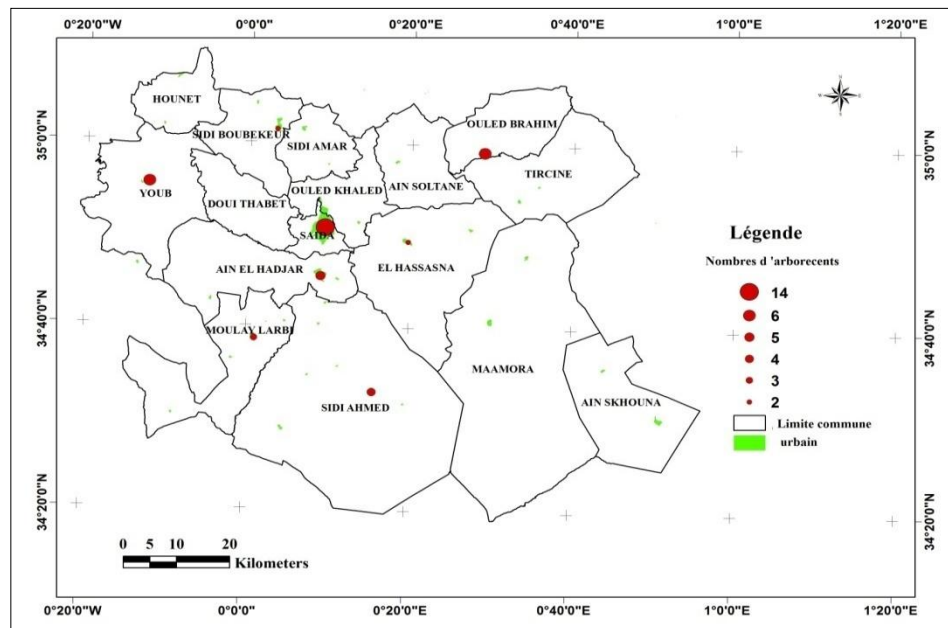


Figure 32. Répartition des points d'enquête à l'échelle de la wilaya de Saida

Le formulaire du questionnaire de l'enquête se divise en 8 parties permettant d'évaluer la connaissance de l'espèce *Salvia argentea* dans la zone d'étude, son utilisation, sa prescription et ses modes de préparation préconisés par chacun des herboristes. Tous les herboristes interrogés ont été informés sur l'objectif de cette étude.

Les données brutes inscrites sur les formulaires du questionnaire ont été transférées dans une base de données et traitées par le logiciel de traitement statistique SPSS (System Package for Social Sciences, version 10).

III. Caractérisations de la poudre de feuilles de *Salvia argentea*

A l'issue de l'étude ethno-pharmacologique, une caractérisation préliminaire des paramètres physicochimiques (Humidité, cendre, pH et l'acidité titrable) , microbiologiques et un screening phytochimiques ont été effectués sur des échantillons de poudre des feuilles de *Salvia argentea* recoltés durant la période s'étalant entre (2015 et 2018).

Les analyses physicochimiques, microbiologiques et phytochimique on été réalisées deux fois sur le même échantillon de poudre de feuilles.

Les premières analyses ont été effectuées durant la première année de cueillette des échantillons, après une année de conservation, les échantillons ont subi une deuxième caractérisation pour vérifier leur qualité et intégrité.

1. Analyses physico-chimiques de la poudre de feuilles de *Salvia argentea*

1.1. Détermination du taux d'humidité dans la poudre des feuilles :

Le taux d'humidité de la poudre de feuilles préalablement séchée et pesée a été déterminée par différence de masse avant et après dessiccation à l'étuve à + 103°C jusqu'à obtention d'une masse constante (Multon *et al.*, 1981).

1.2. Détermination du taux des cendres dans la poudre des feuilles :

Le taux de cendre a été évalué selon la norme AFNOR NF V 05-104 (AFNOR, 1986), qui consiste à incinérer des prises d'essai à 500°C jusqu'à l'obtention d'une poudre blanchâtre.

On entend par : cendres tout résidu obtenu après incinération à 550 °C ± 25 °C dans les conditions bien déterminées et exprimé en pourcentage de masse. L'eau destinée à l'utilisation analytique peut être préparée par simple distillation de l'eau du robinet, par déminéralisation ou bien par osmose inverse. (JOURNAL OFFICIEL).

Le principe de cette analyse est la destruction des matières organiques par chauffage de l'échantillon à une température de 550 °C ± 25 °C jusqu'à obtention d'une masse constante.

L'équation suivante nous permet de calculer la teneur en cendres (WTA), exprimée en pourcentage de masse :

$$\text{WTA} = \frac{\mathbf{m3 - m1}}{\mathbf{m2 - m1}} \times 100 \%$$

m1 : est la masse en grammes de la capsule vide.

m2 : est la masse en grammes de la capsule et de la prise d'essai.

m3 : est la masse en grammes de la capsule et du résidu obtenu lors de la détermination.

1.3 Détermination du pH et de l'acidité de la poudre des feuilles :

Le pH et l'acidité titrable exprimée en pourcentage de l'acide lactique ont été mesurés sur une suspension faite de 10 g de poudre de feuille dans 90 ml d'eau distillée selon la méthode décrite par **Nout et al. (1989)**.

Le principe est de faire un titrage de l'acidité avec une solution d'hydroxyde de sodium en présence de Phénolphtaléine comme indicateur, et cela en versant quelques gouttes de Phénolphtaléine avec agitation, on ajoute en suite à l'aide de la burette la solution NaOH jusqu'à obtention d'un virage de couleur rose persistant pendant 30 secondes.

2. Analyses de contrôle de qualité microbiologique de la poudre de feuilles de *Salvia argentea*

Les analyses de contrôle de qualité microbiologique ont été réalisées selon l'arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.

Ces analyses des échantillons nécessitent quatre étapes qui sont la pesée, la dilution et l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

2.1. Recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale

La recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution et l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

➤ Pesée, Dilution et Homogénéisation

- Prélever aseptiquement 10 g de l'échantillon à analyser.
- Ajouter, aseptiquement, dans un bœcher, 90 ml du TSE. Dans une zone stérile
- Mélanger au Stomacher, pendant 10 minutes à 15 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

➤ Isolement et Dénombrement

- Déposer, 1 ml de la suspension mère et/ou des dilutions décimales, dans deux boîtes de Pétri stérile.
- Ajouter, par incorporation, 15 ml du milieu gélosé nutritif (PCA) fondu et ramené à $+47,0^{\circ}\text{C}\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

- Mélanger l'inoculum au milieu et laisser se solidifier.
- Incuber, une boîte de chaque échantillon ainsi préparé, à $+30,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, durant 24 Heures à 72 Heures.
- Dénombrer les colonies petites et blanches caractéristiques de la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) sur le milieu gélosé (PCA).

2.2. Recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux

La recherche des Coliformes Totaux (CT) et des Coliformes Fécaux (CF) se fait selon quatre étapes qui sont : la pesée, la dilution et l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

➤ Pesée, Dilution et Homogénéisation

- Prélever aseptiquement 10 g de l'échantillon à analyser.
- Ajouter, aseptiquement, dans un becher, 90 ml du TSE.
- Mélanger au Stomacher, pendant 10 minutes à 15 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

➤ Isolement et Dénombrement

- Déposer, 1 ml de la suspension mère et/ou des dilutions décimales, dans quatre boîtes de Pétri stériles pour chaque échantillon à analyser (2 boîtes CF et 2 boîtes CT).
- Ajouter, par incorporation, 15 mL du milieu VRBG fondu et ramené à $+47,0^{\circ}\text{C}\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.
- Mélanger l'inoculum au milieu et le laisse se solidifier.
- Incuber, deux boîtes, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pour les Coliformes Totaux et deux boîtes , à $+44,00^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pour les Coliformes Fécaux, durant 24 Heures à 48 Heures.
- Dénombrer les colonies rouge brique caractéristiques des Coliformes Totaux et des Coliformes Fécaux sur le milieu VRBG.
- Exprimer les résultats avec l'appareil de comptage des colonies.
 - Le control de qualité microbiologique et physico-chimique des échantillons de poudre de feuilles de *Salvia argentea* :(Récoltés entre 2015 et 2018) a été réalisé au niveau du laboratoire de (QACQE) de la wilaya de Saida, conformément aux normes de la réglementation en vigueur (Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires).

3. Analyses du criblage phytochimique de la poudre de feuilles de *Salvia argentea*

Il s'agit d'analyses qualitatives basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation qui permettent d'établir la présence ou l'absence de certains composés chimique bioactif dans la plante à partir de sa poudre. Le screening aide à rechercher: les alcaloïdes, les tanins (galliques et catéchiques), les flavonoïdes (libres et les anthocyanes), les sucres réducteurs, les coumarines, les saponines, Stéroïls et triterpènes et les dérivés cyanogénétiques. Ces tests sont réalisés en présence de certains réactifs de caractérisation, selon les méthodes décrites par (Harbonne, 1998; Bruneton, 2009).

3. 1. Caractérisation des alcaloïdes :

La présence d'alcaloïdes est établie par la précipitation de sels et la révélation à l'aide de réactif de Mayer (solution de tétra-iodomercure de potassium).

A 10g de poudre on ajoute 50 ml de H₂SO₄ à 10%. Après 24h de macération à température ambiante, le macéré est filtré et lavé à l'eau de manière à obtenir 50 ml de filtrat. Prélever 1ml de filtrat y ajouter 5 gouttes du réactif de Mayer et attendre 15 minutes.

La présence d'alcaloïdes est illustrée par une extraction rapide avec solvant chloré (CHCl₃). Prélever une quantité nécessaire du filtrat ensuite l'alcaliniser par une solution diluée de NH₄OH à 50% et ajouter le solvant chloré de même volume (25ml). Après agitation, soutirer la phase organique, filtrer puis évaporer à sec. Mettre 2ml de solution acide (HCl ou H₂SO₄) à 10 % au résidu obtenu et partager entre 2 tubes à essais. Révéler le premier tube par 5 gouttes du réactif de Mayer et le second servira de témoin. L'apparition d'un précipité blanc-jaune ou jaune-clair confirme la présence des alcaloïdes.

3. 2. Caractérisation des Tanins :

La présence de tanins gallique et catéchiques a été mise en évidence à l'aide de perchlore ferrique

Préparer un infusé à 5% à partir de 5g de poudre de l'échantillon dans 100ml d'eau bouillante. Après 15 minutes, la suspension est filtrée et rincée pour obtenir 100ml d'infusé à 5%. Cet infusé servira également à caractérisé les flavonoïdes.

Les tanins galliques, hydrolysables, sont mis en évidence par ajout de 15ml de réactif de Stiasny à 30ml de l'infusé à 5%. Après 15 minutes de chauffage au bain marie à 90°C, le

mélange est filtré et saturé par 5g d'acétate de sodium, ensuite ajouter 1ml d'une solution de FeCl_3 à 1%. L'apparition d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques.

Les tanins catéchiques, non hydrolysables, sont caractérisés par addition de 1ml de HCl concentré à 5ml d'infusé préalablement préparé. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. En présence de tanins catéchiques un précipité rouge, insoluble dans l'alcool iso-amylque, se forme. Les tanins catéchiques sont aussi mis en évidence après l'addition du réactif de Stiasny par la formation d'un précipité.

3. 3. Caractérisation des flavonoïdes :

La réaction à la cyanidine permet de révéler la présence de flavonoïdes libre. A 5ml d'infusé à 5% déjà préparé précédemment pour la révélation des tanins, ajouter 5ml d'une solution de HCL concentré à 50% dans l'éthanol. Ensuite, ajouter 1ml d'alcool iso-amylque et quelques copeaux de magnésium, l'apparition d'une coloration rose-orange ou rose violacée révèle la présence de flavonoïdes libres.

Les anthocyanes sont révélés par ajout à un volume de 5ml d'infusé à 5 %, un volume de 5ml de H_2SO_4 à 10% et 5 ml de NH_4OH à 50%. Si la coloration de l'infusé s'accroît par acidification puis vire au bleu en milieu basique, on peut conclure la présence d'anthocyane.

3. 4. Caractérisation des saponosides :

Un décocté à 1% est préparé avec 1g de poudre dans 100ml d'eau bouillante et maintenir une ébullition légère pendant 15 minutes puis la suspension est filtrée. On introduit dans 10 tubes à essai successivement de 1 à 10ml de filtrat en complétant le contenu de chaque tube à 10ml avec de l'eau. On agite le contenu de chaque tube pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde. La hauteur de mousse est mesurée 15 minutes après l'agitation. L'indice de mousse est calculé à partir du numéro de tube (N) dans lequel la hauteur de la mousse est de 1cm. $I_m = 1000/N$.

3. 5. Caractérisation des composés réducteurs :

Plusieurs composés réducteurs peuvent être mis en évidence, en préparant un décocté aqueux à 10% à partir de 10g de poudre de matière végétale dans 100ml d'eau pendant 15 minutes.

Après évaporation à sec de 5ml du décocté à 10%, 3 gouttes de H₂SO₄ concentré sont ajoutées puis 4 goutte d'une solution saturée de thymol dans éthanol. L'apparition d'une solution rouge révèle la présence d'oses et holosides.

3. 6. Les hétérosides cyanogénétiques sont généralement des composés réducteurs souvent présents dans les plantes. Ils sont mis en évidence en réalisant une suspension de 1g de poudre végétale dans 5ml d'une solution de même volume d'eau et de toluène. Un papier picrosodé imbibé de réactif de Guignard est alors déposé dans le tube. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'hétérosides cyanogénétiques.

3. 7. Caractérisation des stérols et triterpènes :

La présence des stérols et triterpènes est mis en évidence à l'aide de H₂SO₄ concentré. Un extrait est préparé à partir d'une macération pendant 24 heures de 1g de poudre de l'échantillon dans 20ml d'éther. L'extrait obtenu servira en plus des stérols à la caractérisation des coumarines.

Les stérols et triterpène sont mis en évidence par ajout de 1ml de CHCl₃ au résidu de 10ml du macéré évaporé. La solution obtenue est partagée dans deux tubes à essais, puis 1 à 2 ml de H₂SO₄ concentré sont ajoutés au fond de l'un des tubes, l'autre servira de témoin. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des liquides, révèle leur présence.

3. 8. Caractérisation des coumarines :

La présence de coumarines est réalisée en évaporant à sec 5ml d'extrait à l'éther. L'ajout de 2ml d'eau chaude puis 1ml de NH₄OH à 25%. Le mélange est observé sous UV à 366 nm. L'observation d'une fluorescence bleue intense indique leur présence.

IV . Evaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* des différents extraits des feuilles de *Salvia argentea*

1. Matériel biologique (Souches microbiennes)

Les souches microbiennes (Bactéries et levures) utilisées dans cette étude (**Tableau 05**), sont des souches de référence entretenues par repiquages successifs sur Gélose Nutritive (Bactéries) et sur Gélose

Sabouraud (levures) et conservées à 4°C. Ces souches nous ont été fournies par le Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique; Département De Biologie ; Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers; Université de Tlemcen.

Tableau 05. Les souches microbiennes utilisées.

Nom de la souche	Référence	Gram
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452	positif
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	positif
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	positif
<i>Staphylococcus aureus Methicillin-resistant</i>	ATCC 43300	positif
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	positif
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	positif
<i>Proteus freundii</i>	ATCC 8090	négatif
<i>Pasteurella multocida</i>	ATCC 43137	négatif
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	négatif
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC 27374	négatif
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25933	négatif
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 70603	négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	négatif
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	négatif
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 13312	négatif
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	/
<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790	/
<i>Candida albicans</i>	IP 444	/
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 204508	/

2. Méthodes d'extractions

2. 1. Extractions alcooliques

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération en utilisant deux solvants organiques à savoir ; l'éthanol 60° et le méthanol 60°. 10 g de matière végétale déjà broyée est mise dans un bêcher contenant 100 ml de solvant (éthanol ou méthanol). L'extraction est effectuée sous agitation magnétique à une température de 50°C, pendant une durée de 2h. Une fois cette période écoulée, le macérât obtenu est soumis à une autre extraction en ajoutant le même volume en solvant (100ml) et durant la même période (2h). Après filtration sur un papier Wattman numéro 1, le filtrat est concentré à sec par un évaporateur rotatif de type heidolph G1 (**Figure 33, 34 et 35**) (**Mora et al., 2006**).

Ces deux extractions nous ont permis d'obtenir deux extraits organiques secs : un extrait éthanolique (EES) et un extrait méthanolique (EMS), dont-on leur a calculé le rendement, puis on les a récupérés avec du DMSO dans des tubes en verre et conservés à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

2. 2 Extraction aqueuse

L'extraction par Soxhlet est une méthode qui permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première (**Penchev, 2010**).

- 25g de poudre végétale a été introduite dans un ballon de un litre avec 500ml d'eau distillé et chauffée à (100°C) à reflux pendant 20 minutes, après refroidissement, une filtration sur papier Wattman numéro 1 a été effectuée.

Cette extraction nous a permis d'obtenir un extrait aqueux (EAS) , dont-on a calculé le rendement, puis on l'a récupéré dans des tubes en verre et conservé à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.



Figure 33. La récupération du solvant (eau, éthanol ou méthanol) dans le ballon réceptacle.



Figure 34. L'évaporateur rotatif de type Heidolph G1.



Figure 35. La concentration à sec du filtrat (évaporation progressive et totale du solvant).

- Avant de procéder aux tests microbiologiques les différents extraits ont été stérilisés par filtration à travers des micro-filtres de 0,22 μm .

2. 3. Détermination des rendements

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminé après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la poudre séchée de la plante soumise à l'extraction.

3. Tests microbiologiques

3. 1. Conservation des souches microbiennes

Les souches bactériennes et les levures ont été conservées dans un réfrigérateur de 4 à 5 °C, dans des tubes stériles contenant 10ml de milieu de culture incliné (Gélose nutritive et gélose *Sabouraud* respectivement).

Suivant les tests et les souches utilisés dans notre étude, nous avons utilisé les milieux de culture suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Sabouraud pour l'entretien des levures et l'étude de leur sensibilité vis-à-vis des extraits.
- La gélose Mueller Hinton pour la réalisation des aromatogrammes (l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits).

3. 2. a). Préparation des pré-cultures

Les tests de l'activité antimicrobienne doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase exponentielle de la croissance. La réactivation des souches a partir des prélèvements sur tubes inclinés .On procède à une revivification des bactéries et levures dans du bouillon nutritif et bouillon de Sabouraud respectivement.

Les souches microbiennes testés ont été isolées par la méthode des cadrans dans des boites de pétrie contenant la gélose nutritive et la gélose Sabouraud. Après une durée de 18h à 24h d'incubation à 37°C pour les bactéries et une durée de 48h à 30°C pour les levures.

Nous avons prélevé cinq (05) colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, agitées manuellement pendant quelques secondes. L'ajustement de la charge bactérienne à 10^6 UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm .Selon la standardisation de Mc Farland, nous admettons une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml , la suspension d'inoculum est diluée à $1/100^{\text{ème}}$ dans le milieu de culture pour avoir une concentration de 10^6 UFC/ml.

L'ajustement de la charge fongique a été effectué par une cellule Thomas sous un microscope optique (**Hellal, 2011**).

3. 2. b). Préparation des disques en papier

Pour la préparation des disques qui servent au test de diffusion des extraits en milieux gélosés, nous avons utilisé un papier wattman. Ce dernier a été coupé en petits disques de 6 mm de diamètre par un emporte-pièces , puis stérilisé par autoclavage dans un flacon propre en verre autoclavable. Chaque disque peu absorbé jusqu'à 10 µl.

3. 3. Méthode de diffusion en milieu gélosé

La méthode de diffusion par disques sur gélose (méthode de Kirby-Bauer) a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de nos extraits (CLSI, 2006).

Ensemencement par écouvillonnage de la surface du milieu Mueller Hinton avec l'inoculum des souches à tester. Ensuite, à l'aide d'une pince stérile (par flambage au bec bunsen), les disques de papier sont imprégnés des différentes concentrations d'extraits (éthanolique, méthanolique et aqueux) qui ont subis préalablement une filtration stérilisante : 100mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml et 12.5mg/ml, ainsi qu'un disque de DMSO comme témoin et un disque de contrôle antibiotique ou antifongique, ensuite les disques sont déposés à la surface de la gélose déjà ensemencée. Après une pré-diffusion les boîtes de pétri sont incubées pendant 18 à 24h à 37°C pour les bactéries (Mamadou *et al.*, 2014) et 48h à 30°C pour les levures (Aouadhi *et al.*, 2013).

Expressions des résultats

Après incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour des disques d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de croissance microbienne. Plus les diamètres de ces zones sont grands plus les souches sont sensibles aux extraits testés (Choi *et al.*, 2006). Ces diamètres sont mesurés à l'aide d'une règle millimétrique. La souche ayant un diamètre $D < 8\text{mm}$, $9\text{mm} \geq D \leq 14\text{mm}$, $15\text{mm} \geq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (+ +), extrêmement sensible (+ + +) (Duraffourd *et al.*, 1990 ; Ponce *et al.*, 2003). Les diamètres des zones d'inhibitions ont été présentés en moyen \pm écart type.

3. 4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) / la méthode des microdilutions

La détermination des CMI a été réalisée sur les différents extraits. Pour ce faire, nous avons mis à profit la méthode des microdilutions de (Daoud *et al.*, 2015). La solution mère de chaque extrait a été préparée dans du DMSO avec une concentration de 125mg/ml qui est connu pour n'avoir aucun effet antimicrobien (Gachkar *et al.*, 2007).

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 25µl de bouillon (Mueller Hinton ou Sabouraud) dans les 12 puits, nous avons ensuite ajouté 25µl de l'extrait à tester dans les puits N°1 et 2. Après avoir bien mélangé le contenu du deuxième puits, nous avons prélevé 25µL que nous avons mis dans le troisième puits, puis du troisième au quatrième et ainsi de suite jusqu'au dixième puits de façon à obtenir des dilutions successives de demi en demi. Les 25µl du dixième puits qui restent doivent être éliminé. Tandis que les puits N°11 et 12 serviront de témoin positif et négatif. Enfin, nous avons introduit 50µl de l'inoculum dans chaque puits.

Puits N°11 Témoin (+) : bouillon + inoculum.

Puits N°12 Témoin (-) : bouillon + inoculum + DMSO.

Les plaques sont scellées et placées dans une étuve pendant 24 heures à 37°C pour les bactéries et 48 heures à 30°C pour les levures. Les CMI des trois extraits sur les souches étudiées sont définies comme les plus faibles concentrations inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil (**Figure 36**).

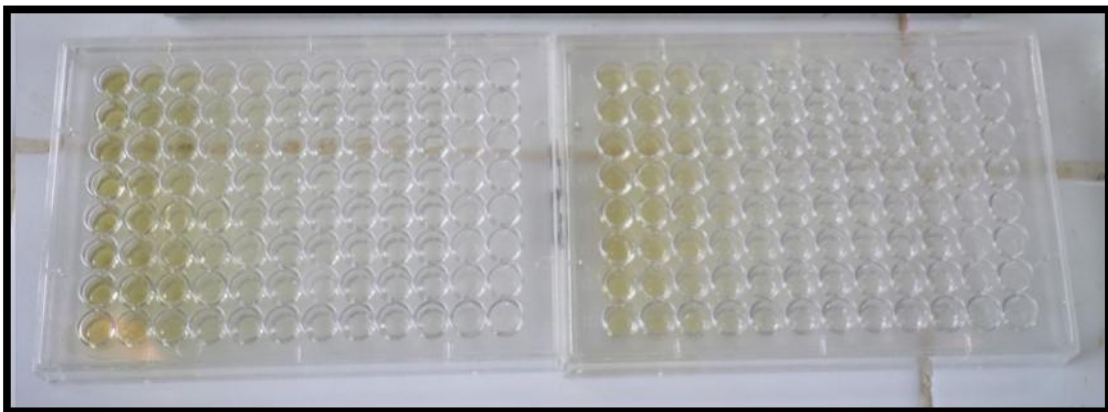


Figure 36. Les microplaques préparées avant l'incubation.

3. 5 .Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF)

➤ Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en extraits strictement supérieures à la CMI et celui de la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être

transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte représentant la valeur de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (**Prescott et al., 1995**).

➤ **Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)**

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par **Canton et al. (2003)**.

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI et le puits de la CMI vont servir pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu sabouraud gélosé. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (**Majoros et al., 2005**).

V. Evaluation des activités thérapeutiques *in vivo* de l'extrait aqueux des feuilles de *Salvia argentea* vis-à-vis d'une intoxication subchronique au Nickel

1. Animaux d'expérimentation

Les expériences ont été réalisées sur des rats Wistar, provenant de l'institut pasteur d'Alger, pesant entre (100-150) g, hébergés au niveau de l'animalerie du département de biologie (Université de Saïda).

Les rats sont partagés en groupes dans des cages de (L x h x p = 40×25×18 cm), répartis en 6 lots à raison de 5 rats par lot et disposés dans une salle ventilée, à une température de 21°C ± 1°C.

2. Répartition des groupes

Lot A (Ni) : constitué de 5 rats qui reçoivent le sulfate de nickel par voie orale à une concentration de 0.2% dissout dans l'eau distillée pendant (21 jour) (**Kahloula et al., 2014**).

Lot B (Traité): constitué de 5 rats qui reçoivent l'extrait aqueux de *Salvia argentea* par gavage pendant (21 jour).

Lot C (Co-administratif) : constitué de 5 rats qui reçoivent le sulfate de nickel à raison de 0.2% dans l'eau distillée par voie orale et l'extrait aqueux de *Salvia argentea* par gavage dans la même période de (21 jour).

Lot F(T) : constitué de 5 rats qui reçoivent de l'eau seulement (témoins négatif)

- L'extrait aqueux de *Salvia argentea* a été administré par voie orale à une dose de (100mg/kg) de poids corporel (**Qnais et al., 2010**).

3. Prélèvement des échantillons

A la fin de l'expérimentation, et après 12 h de jeûne les rats des différents lots sont sacrifiés (sans anesthésie) afin de conserver l'intégrité de l'architecture tissulaire des poumons.

Le sang est récupéré dans des tubes à EDTA pour les analyses (FNS) et des tubes à héparine pour les dosages biochimiques.

Les organes prélevés (foie et poumons) sont rincés avec de l'eau physiologique (NaCl à 0.9%), séchés, pesés, puis fixés dans du formaldéhyde dilué à 9% pour l'étude histologique.

4. Techniques histologiques

Les organes prélevés subissent les étapes suivantes, qui sont le prélude à l'analyse histologique. La qualité apportée à ces étapes techniques est fondamentale pour éviter les artefacts et conserver l'intégrité structurale des tissus étudiés.

4. 1. Fixation

Le fixateur le plus utilisé est le formaldéhyde tamponné .La fixation des pièces dure en général 24 heures.

L'étude macroscopique doit comporter une mesure précise des lésions.

4. 2. Mise en cassettes

Echantillonnage pertinent des lésions, du tissu avoisinant, des limites d'exérèse.

Les cassettes sont numérotées pour éviter toute confusion.

4. 3. Déshydratation

Cette étape prépare les tissus à l'inclusion en paraffine. Elle est réalisée dans un automate

4.4. Inclusion en paraffine

Les tissus sont inclus dans de la paraffine purifiée.

L'inclusion en paraffine permet d'obtenir des blocs, dont la conservation peut se faire en cas de besoin dans les laboratoires d'anatomo-pathologie.

4. 5. Coupe au microtome

Le bloc de paraffine contenant le tissu est coupé en fins rubans de 4 à 5 μm .

4. 6. Etalement sur lames

Plusieurs motifs de coupe tissulaire sont étalés sur lames . Les lames sont alors séchées afin d'assurer une bonne adhésion à la lame des tissus avant coloration.

L'étalement sur les lames se fait avec un léger chauffage de la lame et on doit éviter les plis .

4.7.. La coloration standard HES (Hématoxyline-Eosine-Safran)

L'hématoxyline colore les noyaux en violet foncé, l'éosine, les cytoplasmes en rose et le safran, les fibres collagènes en jaune Cette seule coloration permet le diagnostic de la grande majorité des lésions tumorales et non tumorales.

5. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les données ont été analysées par des analyses de variance bidirectionnelles (ANOVA). Pour toutes les analyses, une différence a été considérée comme significative à $p \leq 0,05$. Le logiciel utilisé est SIGMASTAT version 3.5.

Résultats et Discussion

I. Etude ethno pharmacologique de *Salvia argentea*

1. Enquête ethno pharmacologique

1.1. Fréquence d'utilisation de *Salvia argentea* selon le profil des Herboristes

L'utilisation traditionnelle de *Salvia argentea* reste une pratique très importante dans la zone de Saida comme l'attestent les herboristes enquêtés (42), âgés entre 30 et 70 ans. Ils pratiquent leur métier en ville ou en campagne. La totalité des herboristes sont des hommes, parmi lesquels (78.57%) sont mariés, avec un niveau d'étude secondaire à (52.38%) (Figure 37). La totalité des herboristes exercent leur fonction depuis au moins une décennie, ce qui éclaire sur l'expérience accumulée et l'originalité de leur savoir sur l'usage traditionnel de *Salvia argentea*.

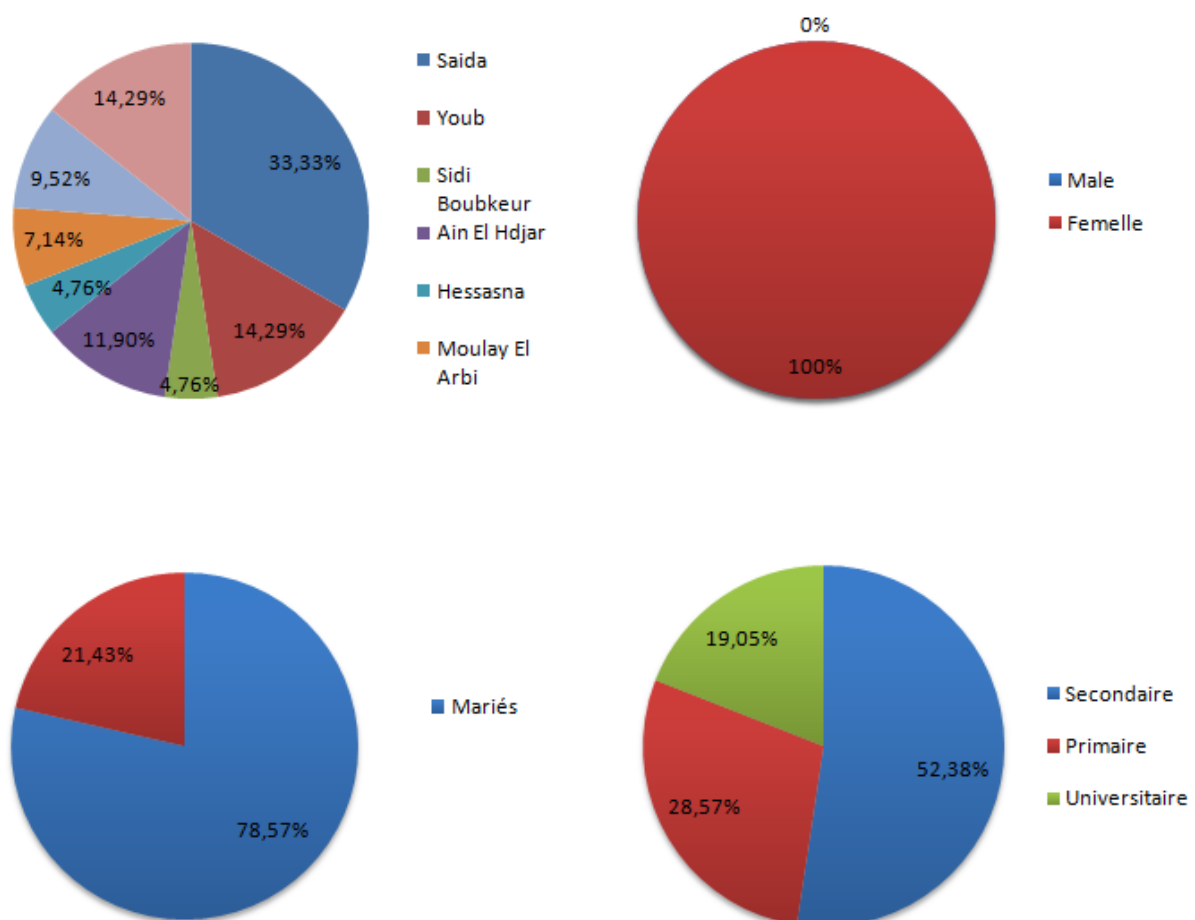


Figure 37. Informations sur les herboristes enquêtés

1.2. Type de collecteurs de *Salvia Argentea*

Les herboristes interrogés ont recours exclusivement à plusieurs types de collecteurs (**Figure 38**): des agriculteurs (40.48%), des sédentaires (33.33%), des nomades (19.05%) et des bergers (7.14%).

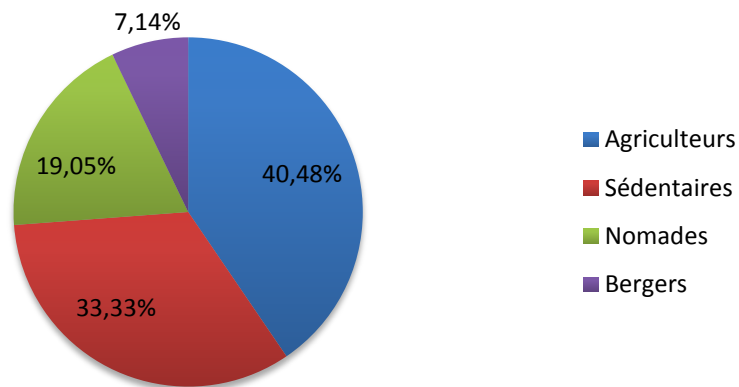


Figure 38. Type de collecteurs de *Salvia Argentea*

1.3. L'usage de *Salvia argentea* et les maladies traitées

Pour l'usage thérapeutique de la plante, 100% des herboristes ont révélé que *Salvia argentea* est utilisée comme remède traditionnel pour traiter les maladies respiratoires.

1.4. Avis sur l'efficacité de *Salvia argentea* dans le traitement des maladies respiratoires

Les résultats des herboristes interrogés, sur l'efficacité de *Salvia argentea* contre les maladies respiratoires, montrent que 92,86% d'entre eux affirment que l'utilisation traditionnelle de cette plante mène à une guérison, alors que 7,14% pensent que son usage a uniquement un effet de soulagement (**Figure 39**).

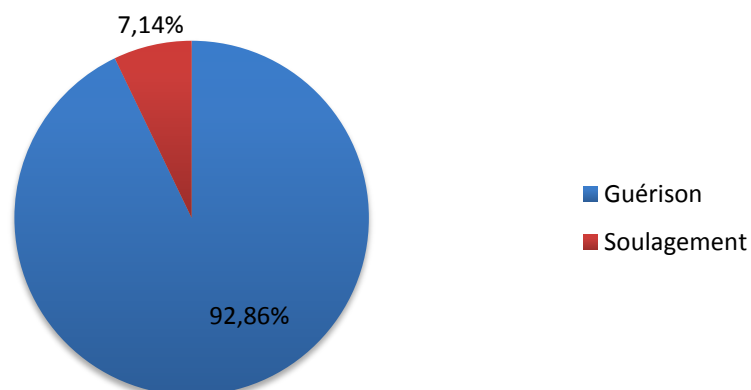


Figure 39. L'avis des herboristes sur l'efficacité de *Salvia argentea*

1.5. La partie de la plante utilisée

L'enquête auprès des herboristes a révélé que les feuilles sont les parties les plus utilisées au traitement des maladies respiratoires avec un pourcentage de 69,05 % (**Figure 40**), suivies par les racines (21,43%), la plante entière (9,52%) et ne mentionnent aucune utilisation des inflorescences. L'utilisation des feuilles peut être expliquée par le fait qu'elles sont rapidement récoltées et faciles à l'usage (**Doukkali et al ., 2015**). Ce mode de cueillette, principalement les feuilles, compromet sérieusement la durabilité des espèces médicinales (**Mehdioui et Kahouadji, 2007**) .

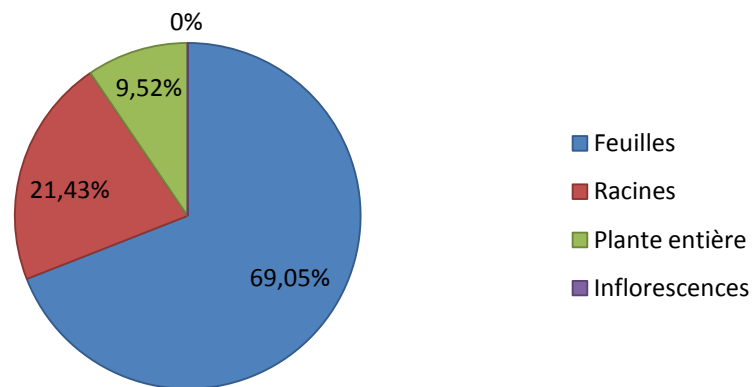


Figure 40. La partie utilisée de *Salvia argentea*

1.6. Mode de préparation et d'administration

Dans la zone d'étude (Saida), les herboristes préconisent plusieurs modes de préparation de *Salvia argentea* pour le traitement des maladies respiratoires. La préparation en poudre constitue le mode le plus fréquent (59.53%), suivie par la préparation en décoction (30.95%) et en infusion (9.52%) (**Figure 41**). Tous les herboristes interviewés et avec un taux de 100%, confirment que l'administration est exclusivement par voie orale.

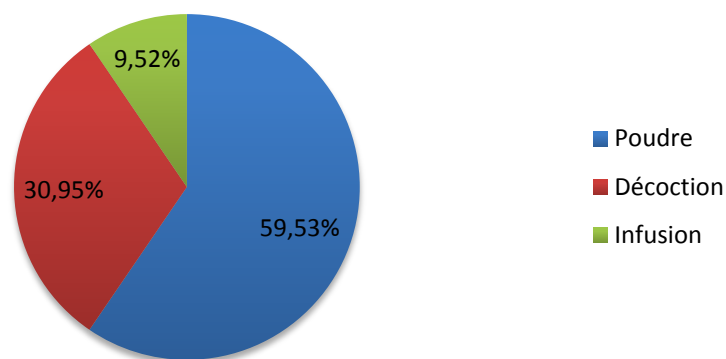


Figure 41. Mode de préparation

Les résultats collectés auprès des herboristes interrogés, confirment l'utilisation avec efficacité de *Salvia argentea* dans le traitement des maladies respiratoires, par la population locale.

2. Caractérisation physicochimique de la poudre de feuilles de *Salvia argentea*

Les échantillons de *Salvia argentea*

- Echantillon (A) : poudre de feuilles de (S.a) dont les analyses ont été réalisées durant l'année de récolte.
- Echantillon (B) : poudre de feuilles de (S.a) dont les analyses ont été réalisées après une année de conservation.

Les analyses des paramètres physicochimiques ont été effectuées durant la période s'étalant entre (2015 et 2018). Les résultats exprimés en moyenne des valeurs obtenues sont rapportées dans le **Tableau 06**.

Tableau 06. Paramètres physico-chimiques des échantillons de la poudre de feuilles de *Salvia argentea*.

Paramètres	Echantillon A de (<i>S.a</i>)	Echantillon B de (<i>S.a</i>)
Humidité (%)	12,89 ±1.09	13,45 ±1.00
Cendres (% , base sèche)	17,61 ± 0,54	17,61 ± 0,54
pH	8,05 ±0.07	8,50 ± 0.01
Acidité titrable (%)	0,74 ±0.01	0,70 ± 0.06

Les valeurs obtenues concernant la teneur en eau sont de (12,89 ±1.09 et 13,45 ±1.00) en moyenne pour les échantillons A et B respectivement. Cette faible teneur conclue que la poudre des feuilles de *Salvia argentea* peut être conservée pendant longtemps sans grand risque d'altérations due aux contaminations microbiennes (**Mafart, 1996**).

Les cendres totales sont le résidu des composés minéraux qui reste après l'incinération d'un échantillon contenant des substances organiques d'origine animale, végétale ou synthétique. Les cendres représentent une moyenne de (17.61 %) de la masse totale des échantillons A et B sur une base sèche. Ces valeurs sont comparables à celles trouvées chez *Nasturtium officinale* (14.9-17.2%) et *Spinacia oleracea* (18.0-19.1%) (**Benabdesslem et al., 2017**).

Quant aux valeurs moyennes obtenues pour le pH, elles sont entre (8,05 et 8,50) pour les échantillons A et B. Ces valeurs pourraient s'expliquer par le caractère chlorophyllien des feuilles de *Salvia argentea* ayant tendance à conférer une basicité.

Les valeurs de l'acidité titrable en acide lactique sont également en corrélation avec les valeurs du pH, avec des moyennes de (0,74 et 0,70) respectivement pour les échantillons A et B. La même tendance a été observée par **Houndji et al. (2013)** pour la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (Lam.).

Les résultats des différentes analyses physicochimiques révèlent que les échantillons sont conformes aux normes de la réglementation en vigueur. Ces valeurs nous laissent conclure que la poudre des feuilles de *Salvia argentea* peut être conservée pendant une année sans aucun risque d'altérations des paramètres physicochimiques.

3. Analyse phytochimique

Les échantillons de *Salvia argentea*

- Echantillon (A) : poudre de feuilles de (S.a) dont les analyses ont été réalisées durant l'année de récolte.
- Echantillon (B) : poudre de feuilles de (S.a) dont les analyses ont été réalisées après une année de conservation.

Les analyses du criblage phytochimique ont été effectuées durant la période s'étalant entre (2015 et 2018). Les résultats des valeurs obtenues sont rapportés dans le **Tableau 07**.

Le signe (+) traduit la présence du groupe de composés chimiques en quantité supérieure au seuil de détection, et le signe (-) indique une réaction négative.

Tableau 07. Résultats du screening phytochimiques de la poudre de feuilles de *Salvia argentea*

Groupes chimiques	Tests /Réactifs	Résultats échantillon A	Résultats échantillon B
Les alcaloïdes	Réactif de Mayer	+	+
Les flavonoïdes libres	Copeaux de magnésium	-	-
Les anthocyanes	H ₂ SO ₄	+	+
Les tannins galliques	FeCl ₃	+	+
Les tannins catéchiques	HCl	+	+
Stérols et triterpènes	Réaction de Liebermann	+	+
Les coumarines	NH ₄ OH	+	+
Les sucres réducteurs	Réactif de Fehling	+	+
Les saponines	Détermination de l'Indice Mousse	+	+
Dérivés cyanogénétiques	Guignard	-	-

Le screening phytochimique réalisé sur les échantillons (A et B) de la poudre des feuilles de *Salvia argentea* montre la présence des groupes chimiques qui possèdent des activités biologiques intéressantes. Il s'agit entre autre des alcaloïdes, des flavonoïdes de type anthocyanes, des saponines, des coumarines, des stérols et triterpènes, des tanins (galliques et catéchiques) et des sucres réducteurs. L'absence totale des dérivés cyanogénétiques diminue fortement le risque toxicologique lié à l'usage de *Salvia argentea*.

La présence de groupes chimiques potentiellement actifs comme les substances poly phénoliques, tels que les tanins sous leurs deux formes et les anthocyanes dans la poudre des feuilles étudiée, pourrait justifier les indications tradithérapeutiques de cette plante par les herboristes enquêtés, en médecine traditionnelle particulièrement pour leurs

propriétés pharmacologiques dans le traitement des maladies respiratoires (**Bouchet et al., 2000 ; Andersen et Markham, 2006**). Cette plante constitue donc un matériel de choix pour enrichir la médecine conventionnelle avec des activités biologiques intéressantes.

4. Analyses microbiologiques

Les échantillons de *Salvia argentea*

- Echantillon (A) : poudre de feuilles de (S.a) dont les analyses ont été réalisées durant l'année de récolte.
- Echantillon (B) : poudre de feuilles de (S.a) dont les analyses ont été réalisées après une année de conservation.

Les analyses de contrôle de qualité microbiologique ont été effectuées durant la période s'étalant entre (2015 et 2018). Les moyennes des valeurs obtenues sont rapportées dans le **Tableau 08**.

Tableau 08. Résultats des analyses de contrôle de qualité microbiologique des échantillons de poudre de feuilles de *Salvia argentea*

Poudre de <i>Salvia argentea</i>					
Echantillons	Analyses	Normes	Résultats		Interprétations
A	Germes aérobies totaux à 30°C /g	10^5	8×10^2	6×10^2	Echantillon de qualité Satisfaisante
	Coliformes	10^3	3×10^2		
	Coliformes fécaux	Absence / présent	Absence		
B	Germes aérobies totaux à 30°C /g	10^5	10^2	10^2	Echantillon de qualité Satisfaisante
	Coliformes	10^3	5×10^2		
	Coliformes fécaux	Absence / présent	Absence		

Les échantillons analysés sont d'une qualité microbiologique satisfaisante, conformément aux normes de la réglementation en vigueur (Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires).

Les valeurs obtenues nous laissent déduire que la poudre des feuilles de *Salvia argentea* peut être conservée pendant une année et utilisée sans aucun risque microbiologique sur la santé.

II. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* des différents extraits des feuilles de *Salvia argentea*

1. Les rendements des extraits obtenus

Les caractéristiques des différents extraits et leurs rendements sont résumés dans le **Tableau 09**

Tableau 09. Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.

	Extrait éthanolique	Extrait méthanolique	Extrait aqueux
Quantité de poudre utilisée (g)	10g	10g	25 g
Rendement (%)	23%	21.2%	32,5%
Aspect et couleur de l'extrait sec	Collant pâteux verte foncée	Collant pâteux marron verdâtre	pâteux marron verdâtre

2. Tests microbiologiques

2.1. Etude de la sensibilité des bactéries et levures aux extraits végétaux.

Les souches de bactéries et de levures sélectionnées, au contact des différents extraits de la plante, ont montré une sensibilité variable d'un germe à l'autre, confirmée par l'existence des zones d'inhibition aux diverses concentrations testées. Les tableaux ci-dessous résument le comportement des différents germes vis-à-vis des extraits testés.

Les extraits de *S. argentea* se sont révélés actifs sur l'ensemble des souches bactériennes testées. Nous avons enregistré l'apparition des zones d'inhibitions pour toutes les bactéries et aux différentes concentrations. Les moyennes de ces zones d'inhibitions fluctuent entre (7 et 23) mm.

Tableau 10. Sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits de *Salvia argentea*.

(Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm)

Nom des souches	Type de l'extrait	Concentration des extraits végétaux (mg/ml)			
		12.5	25	50	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	E.A.S	08 ± 1.0	08 ± 1.1	10 ± 0.6	10 ± 0.6
	E.E.S	07 ± 0.6	07 ± 0.6	07 ± 0.0	12 ± 1.5
	E.M.S	07 ± 0.6	07 ± 1.7	10 ± 0.0	10 ± 2.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	E.A.S	08.5 ± 1.0	09 ± 1.5	09.5 ± 2.1	11 ± 0.6
	E.E.S	08.5 ± 1.0	09 ± 0.6	09.5 ± 0.6	11 ± 2.6
	E.M.S	07.5 ± 0.6	09 ± 0.0	09.5 ± 0.6	10 ± 0.6
<i>Listeria monocytogenes</i>	E.A.S	07 ± 1.0	07 ± 0.0	08 ± 0.6	08 ± 1.5
	E.E.S	07 ± 1.0	07 ± 0.0	07 ± 1.1	07 ± 0.0
	E.M.S	07 ± 0.6	07 ± 0.0	07.5 ± 1.0	07.5 ± 0.6
<i>Staphylococcus aureus</i> (M.R)	E.A.S	09 ± 1.1	09.5 ± 1.1	10 ± 1.1	10 ± 2.6
	E.E.S	10 ± 0.0	10.5 ± 0.6	11.5 ± 1.0	12 ± 0.6
	E.M.S	11 ± 1.0	11 ± 1.1	12.5 ± 1.5	15 ± 2.3
<i>Bacillus subtilis</i>	E.A.S	10 ± 0.6	10 ± 0.6	10 ± 0.0	10 ± 1.1
	E.E.S	12 ± 0.6	12 ± 1.5	15 ± 0.0	15 ± 0.0
	E.M.S	10 ± 0.6	10 ± 2.9	11 ± 1.1	11 ± 1.1
<i>Bacillus cereus</i>	E.A.S	10 ± 1.5	10 ± 0.0	15 ± 1.5	15 ± 0.0
	E.E.S	12 ± 0.6	12 ± 0.0	14 ± 0.0	17 ± 1.1
	E.M.S	10 ± 1.0	10 ± 0.0	10 ± 2.1	10 ± 1.5
<i>Proteus freundii</i>	E.A.S	07 ± 0.0	07 ± 0.0	07 ± 0.0	07 ± 1.1
	E.E.S	08 ± 1.0	07 ± 0.6	07 ± 0.6	07 ± 1.0
	E.M.S	08 ± 1.0	08 ± 1.5	10 ± 0.6	10 ± 1.1
<i>Pasteurella multocida</i>	E.A.S	12 ± 2.1	12.5 ± 0.0	14.5 ± 0.6	23 ± 2.6
	E.E.S	10 ± 1.0	10.5 ± 0.0	11.5 ± 0.6	12 ± 1.7
	E.M.S	12 ± 1.1	12 ± 0.0	14 ± 0.0	19 ± 2.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	E.A.S	07 ± 0.6	08 ± 1.0	08 ± 1.5	12 ± 0.0
	E.E.S	07 ± 0.0	07 ± 0.6	07 ± 0.0	10 ± 0.6
	E.M.S	07 ± 0.6	08 ± 1.5	08 ± 0.6	12 ± 0.6
<i>Campylobacter fetus</i>	E.A.S	08 ± 0.6	08 ± 0.0	10 ± 1.1	10 ± 0.6
	E.E.S	08 ± 0.0	08 ± 0.0	08 ± 1.5	08 ± 0.0
	E.M.S	08 ± 1.1	08 ± 1.1	10 ± 0.6	12 ± 2.3
<i>Escherichia coli</i>	E.A.S	08 ± 0.0	09 ± 1.5	09 ± 0.0	11 ± 1.5
	E.E.S	07 ± 0.6	09 ± 0.6	09 ± 0.6	11 ± 0.6
	E.M.S	08 ± 1.5	08 ± 0.0	08.5 ± 2.1	10 ± 0.6
<i>Klebsiella pneumonia</i>	E.A.S	10 ± 2.3	10 ± 1.1	12 ± 1.5	16 ± 0.6
	E.E.S	09 ± 0.0	09 ± 1.5	09.5 ± 0.0	12 ± 1.7
	E.M.S	10 ± 1.1	10 ± 1.5	14 ± 1.5	20 ± 2.1
<i>Enterobacter cloacae</i>	E.A.S	08 ± 0.0	08 ± 0.6	10 ± 0.0	10 ± 1.1
	E.E.S	07 ± 0.0	08 ± 0.0	08.5 ± 0.0	10 ± 1.1
	E.M.S	08 ± 1.1	08 ± 0.0	10 ± 1.1	10 ± 0.6
<i>Citrobacter freundii</i>	E.A.S	08 ± 0.6	08.5 ± 1.7	10 ± 0.6	10 ± 1.5
	E.E.S	07 ± 0.0	08.5 ± 1.0	09 ± 1.0	10 ± 0.0
	E.M.S	08.5 ± 1.7	09.5 ± 0.6	10 ± 1.0	10.5 ± 0.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	E.A.S	08 ± 0.6	08 ± 0.0	14 ± 1.5	23 ± 1.1
	E.E.S	07 ± 1.0	07 ± 0.6	10 ± 1.5	12 ± 1.5
	E.M.S	07 ± 0.0	07 ± 1.0	15 ± 0.6	20 ± 2.1
<i>Salmonella enterica</i>	E.A.S	08 ± 1.5	10 ± 1.5	10 ± 0.0	11 ± 0.6
	E.E.S	07.5 ± 0.0	08 ± 0.6	09 ± 0.0	10 ± 0.6
	E.M.S	07 ± 0.6	08 ± 0.0	08 ± 1.1	09 ± 1.0

Le **Tableau 10** montre clairement qu'à partir de la plus faible concentration de (12,5 mg / ml), *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* (M.R), *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pasteurella multocida* sont les souches qui se sont montrés les plus sensibles aux extraits de *S. argentea* avec des diamètres des zones d'inhibitions de (10 , 11, 12, 12, 12) mm respectivement.

Concernant la concentration de (50 mg/ ml), *Klebsiella pneumonia*, *Pasteurella multocida*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*, sont des souches qui ont affiché des moyennes des diamètres des zones d'inhibitions très importantes variant entre (14 - 14,5- 15- 15- 15) mm respectivement.

Les extraits de *S. argentea* se sont avéré très actifs aux fortes concentrations de (100 mg/ ml). *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pasteurella multocida* et *Pseudomonas aeruginosa* sont considéré comme les souches les plus sensibles avec des moyennes des diamètres des zones d'inhibitions de (15 , 17, 20, 23, 23) mm respectivement.

Ces souches possèdent une sensibilité plus élevée aux extraits de *S. argentea*, par rapport aux autres souches testées.

- Nous avons réalisé un contrôle antibiotique pour toutes les bactéries testées .Ces antibiotiques ont été utilisés comme produits de référence pour la multi-résistance de nos souches.

Les tableaux récapitulatifs des résultats relatifs au contrôle antibiotique sont présentés en annexe (01).

Tableau 11 : Sensibilité des souches de levures aux différents extraits de *Salvia argentea*.

(Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm)

Nom des souches	Type de l'extrait	Concentration des extraits végétaux (mg/ml)			
		12.5	25	50	100
<i>Candida albicans</i> L1	E.A.S	08 ± 1.0	10 ± 0.0	12 ± 1.1	14 ± 1.1
	E.E.S	07 ± 0.6	08 ± 0.0	08 ± 0.6	09 ± 1.0
	E.M.S	10 ± 0.0	10 ± 0.1	12 ± 0.6	17 ± 1.7
<i>Candida albicans</i> L2	E.A.S	10 ± 1.1	12 ± 0.6	15 ± 1.5	19 ± 0.6
	E.E.S	10 ± 0.0	10 ± 1.5	14 ± 0.6	18 ± 0.0
	E.M.S	10 ± 0.6	10 ± 0.6	15 ± 0.0	18 ± 0.6
<i>Candida albicans</i> L3	E.A.S	10 ± 0.0	12 ± 2.1	14 ± 0.6	15 ± 1.5
	E.E.S	08 ± 0.6	10 ± 0.0	12 ± 0.0	14 ± 2.1
	E.M.S	10 ± 0.0	12 ± 0.6	14 ± 2.1	16 ± 0.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	E.A.S	10 ± 1.5	12 ± 1.5	12 ± 1.5	24 ± 1.5
	E.E.S	08 ± 1.0	10 ± 1.1	13.5 ± 0.0	16 ± 0.0
	E.M.S	10 ± 0.6	12 ± 0.0	14 ± 1.1	16 ± 0.6

Lexique :

- L1 : C26720
- L2 : C444
- L3 : C10231

Toutes les souches de levures étudiées se sont montrées sensibles aux différents extraits de la plantes, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre (8 et 24) mm, en fonction des différentes concentrations.

Les extraits se sont montrés plus efficaces sur les souches de levures que sur les bactéries, notamment dans les fortes concentrations où nous avons enregistré des zones d'inhibition de l'ordre de 17mm chez *Candida albicans* L1 en contact avec l'extrait méthanolique.

Les zones d'inhibitions, pour les fortes concentrations étaient de l'ordre de (18, 18, 19) mm pour les extraits éthanolique, méthanolique et aqueux respectivement, chez la souche *Candida albicans* L2.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition étaient très rapprochés concernant les différents extraits, avec des écarts de l'ordre de 1 mm pour la souche *Candida albicans* L3. Ces diamètres on pu atteindre les 16 mm pour la concentration de (100 mg/ ml).

Une forte sensibilité, traduite par des valeurs des zones d'inhibitions très importantes entre (16 et 24) mm, aux fortes concentrations, a été enregistrée chez *Saccharomyces cerevisiae* et cela pour les différents extraits testés.

- Nous avons réalisé un contrôle aux antifongiques pour les levures testées .Ces antifongiques ont été utilisés comme produits de référence confirmer la multi-résistance de nos souches.

Le tableau récapitulatif des résultats relatifs au contrôle antifongique est présenté en annexe (02)

3. Détermination des paramètres antibactériens (CMI) et (CMB)

Les valeurs de CMI et CMB déterminées pour chacun des germes testés sont résumées dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 12 . Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides de l' E.A.S vis-à-vis des bactéries testées (mg/ml)

Nom de la souche	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>Enterococcus faecalis</i>	31.24	31.24	01
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.62	15.62	01
<i>Listeria monocytogenes</i>	15.62	62.48	04
<i>Staphylococcus aureus</i> (M.R)	15.62	15.62	01
<i>Bacillus subtilis</i>	31.24	62.48	02
<i>Bacillus cereus</i>	15.62	15.62	01
<i>Proteus freundi</i>	15.62	62.48	02
<i>Pasteurella multocida</i>	07.81	07.81	01
<i>Salmonella typhimurium</i>	15.62	31.24	02
<i>Campylobacter fetus</i>	31.24	31.24	01
<i>Escherichia coli</i>	15.62	31.24	02
<i>Klebsiella pneumonia</i>	07.81	07.81	01
<i>Enterobacter cloacae</i>	15.62	31.24	02
<i>Citrobacter freundii</i>	15.62	15.62	01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.62	31.24	02
<i>Salmonella enterica</i>	15.62	15.62	01

Les valeurs de CMI les plus basses pour l'extrait aqueux ont été obtenues avec *Pasteurella multocida* et *Klebsiella pneumonia*, elles sont de l'ordre de 07.81 (mg/ml).

Trois souches ont affichées des valeurs de CMI de 31.24 (mg/ml) .Il s'agit de *Enterococcus faecalis* , *Bacillus subtilis*, *Campylobacter fetus*, ces valeurs sont considérées comme les concentrations les plus élevées qui ont été enregistrées pour l'extrait aqueux.

Une valeur de CMI intermédiaire de 15.62 (mg/ml) a été obtenue pour le reste des souches étudiées.

Nous avons enregistré des valeurs de CMB proches ou similaires à celles des CMI pour 15 souches bactériennes. Ces résultats nous laissent déduire que l'extrait aqueux de *S. argentea* exerce une action Bactéricide pour toutes les souches à l'exception d'une souche *Listeria monocytogenes*, pour laquelle l'extrait s'est révélé Bactériostatique

Tableau 13. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales fongicides de l' E.A.S vis-à-vis des levures testées (mg/ml)

Nom de la souche	CMI	CMF	CMF/CMI
<i>Candida albicans</i> L1	15.62	15.62	01
<i>Candida albicans</i> L2	07.81	15.62	02
<i>Candida albicans</i> L3	15.62	15.62	01
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	03.90	15.62	04

Lexique :

- L1 : C26720
- L2 : C444
- L3 : C10231

Les résultats montrent clairement que la valeur de CMI la plus basse pour l'extrait aqueux a été obtenue avec *Saccharomyces cerevisiae* elle est de l'ordre de 03.90 (mg/ml).

Deux souches ont affichées des valeurs de CMI de 15.62 (mg/ml) .Il s'agit de *Candida albicans* L1 et *Candida albicans* L3. Ces valeurs sont considérées comme les concentrations les plus élevées qui ont été enregistrées pour l'extrait aqueux vis-à-vis des levures.

Une valeur de CMI intermédiaire de 07.81 (mg/ml) a été obtenue pour *Candida albicans* L2. Nous avons enregistré des valeurs de CMF proches ou similaires à celles des CMI pour les trois souches de *Candida albicans* . Ces résultats nous laissent déduire que l'extrait aqueux de *S. argentea* exerce une action fongicide pour toutes les souches à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae*, pour laquelle l'extrait s'est révélé fongistatique.

Tableau 14. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides de l' E.E.S vis-à-vis des *bactéries testées* (mg/ml)

Nom de la souche	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>Enterococcus faecalis</i>	15.62	31.24	02
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.62	15.62	01
<i>Listeria monocytogenes</i>	31.24	31.24	01
<i>Staphylococcus aureus</i> (M.R)	15.62	15.62	01
<i>Bacillus subtilis</i>	31.24	62.48	02
<i>Bacillus cereus</i>	15.62	31.24	02
<i>Proteus freundi</i>	15.62	62.48	04
<i>Pasteurella multocida</i>	07.81	15.62	02
<i>Salmonella typhimurium</i>	15.62	31.24	02
<i>Campylobacter fetus</i>	31.24	31.24	01
<i>Escherichia coli</i>	15.62	31.24	02
<i>Klebsiella pneumonia</i>	07.81	07.81	01
<i>Enterobacter cloacae</i>	15.62	15.62	01
<i>Citrobacter freundii</i>	15.62	15.62	01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.62	31.24	02
<i>Salmonella enterica</i>	15.62	15.62	01

Les valeurs de CMI les plus basses pour l'extrait éthanolique ont été obtenues avec *Pasteurella multocida* et *Klebsiella pneumonia*, elles sont de l'ordre de 07.81 (mg/ml).

Trois souches ont affichées des valeurs de CMI de 31.24 (mg/ml). Il s'agit de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter fetus*, ces valeurs sont considérées comme les concentrations les plus élevées qui ont été enregistrées pour l'extrait éthanolique.

Une valeur de CMI intermédiaire de 15.62 (mg/ml) a été obtenue pour le reste des souches étudiées.

Nous avons enregistré des valeurs de CMB proches ou similaires à celles des CMI pour 15 souches bactériennes. Ces résultats nous laissent déduire que l'extrait éthanolique de *S. argentea* exerce une action Bactéricide pour toutes les souches à l'exception d'une souche *Proteus freundi*, pour laquelle l'extrait s'est révélé Bactériostatique.

Tableau 15. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales fongicides de l' E.E.S vis-à-vis des levures testées (mg/ml)

Nom de la souche	CMI	CMF	CMF/CMI
<i>Candida albicans</i> L1	15.62	15.62	01
<i>Candida albicans</i> L2	15.62	15.62	01
<i>Candida albicans</i> L3	15.62	31.24	02
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	03.90	15.62	04

Lexique :

- L1 : C26720
- L2 : C444
- L3 : C10231

Selon les résultats relatifs aux paramètres antimicrobiens, la valeur de CMI la plus basse pour l'extrait éthanolique a été obtenue avec *Saccharomyces cerevisiae* elle est de l'ordre de 03.90 (mg/ml).

Les trois souches de *Candida albicans* ont eu une sensibilité similaire en affichant les mêmes valeurs de CMI de 15.62 (mg/ml). Ces valeurs sont considérées comme les concentrations les plus élevées qui ont été enregistrées pour l'extrait éthanolique vis-à-vis des levures.

Nous avons enregistré des valeurs de CMF proches ou similaires à celles des CMI pour les trois souches de *Candida albicans*. Ces résultats nous laissent déduire que l'extrait éthanolique de *S. argentea* exerce une action fongicide pour toutes les souches à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae*, pour laquelle l'extrait s'est révélé fongistatique.

Tableau 16 .Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales bactéricides de l' E.M.S vis-à-vis des bactéries testées (mg/ml)

Nom de la souche	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>Enterococcus faecalis</i>	15.62	31.24	02
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.62	31.24	02
<i>Listeria monocytogenes</i>	31.24	31.24	01
<i>Staphylococcus aureus (M.R)</i>	03.90	07.81	02
<i>Bacillus subtilis</i>	15.62	62.48	04
<i>Bacillus cereus</i>	15.62	31.24	02
<i>Proteus freundi</i>	62.48	62.48	01
<i>Pasteurella multocida</i>	07.81	15.62	02
<i>Salmonella typhimurium</i>	15.62	15.62	01
<i>Campylobacter fetus</i>	15.62	31.24	02
<i>Escherichia coli</i>	15.62	31.24	02
<i>Klebsiella pneumonia</i>	07.81	07.81	01
<i>Enterobacter cloacae</i>	15.62	15.62	01
<i>Citrobacter freundii</i>	07.81	15.62	02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.62	15.62	01
<i>Salmonella enterica</i>	15.62	31.24	02

La valeur de CMI la plus basse pour l'extrait méthanolique a été obtenue exclusivement avec *Staphylococcus aureus* (M.R), elle est de l'ordre de 03.90 (mg/ml). Cette valeur s'avère très intéressante vis-à-vis d'une souche connue pour sa grande résistance. Le tableau ci-dessous résume le comportement de la souche vis-à-vis des antibiotiques.

Tableau 17. Réponses de (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) aux contrôles antibiotiques

	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	Antibiotiques (µg)			
	Tobramycine (10)	Clindamycine (2)	Erythromycine (15)	Cefuroxime (125mg/5ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	17	6	6	6

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Les résultats du tableau 17 montre que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline est résistante à : l'Erythromycine (15 µg), Clindamycine (2 µg) et Cefuroxime (125mg/5ml). La

souche a été sensible à un seul antibiotique (la Tobramycine (10 µg)). Cette même souche a montré une sensibilité vis-à-vis des trois extraits avec des zones d'inhibition entre (10 et 15) mm

Onze souches ont affichées des valeurs de CMI intermédiaires entre (15.62 et 31.24) mg/ml.

Une valeur élevée de CMI de l'ordre de 62.48 (mg/ml) a été obtenue pour la souche *Proteus freundii*.

Nous avons enregistré des valeurs de CMB proches ou similaires à celles des CMI pour 15 souches bactériennes. Ces résultats nous laissent déduire que l'extrait méthanolique de *S. argentea* exerce une action bactéricide pour toutes les souches à l'exception d'une souche *Bacillus subtilis*, pour laquelle l'extrait s'est révélé bactériostatique.

Tableau 18. Concentrations minimales inhibitrices et concentrations minimales fongicides de l' E.M.S vis-à-vis des levures testées (mg/ml)

Nom de la souche	CMI	CMF	CMF/CMI
<i>Candida albicans</i> L1	15.62	15.62	01
<i>Candida albicans</i> L2	07.81	15.62	02
<i>Candida albicans</i> L3	15.62	15.62	01
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	03.90	15.62	04

Lexique :

- L1 : C25720
- L2 : C444
- L3 : C10251

Selon les résultats relatifs aux paramètres antimicrobiens, la valeur de CMI la plus basse pour l'extrait méthanolique a été enregistrée avec *Saccharomyces cerevisiae* elle est de l'ordre de 03.90 (mg/ml).

Les trois souches de *Candida albicans* ont affichées des valeurs de CMI entre (07.81 et 15.62 (mg/ml)) pour l'extrait méthanolique.

Nous avons enregistré des valeurs de CMF proches ou similaires à celles des CMI pour les trois souches de *Candida albicans*. Ces résultats nous laissent déduire que l'extrait méthanolique de *S. argentea* exerce une action fongicide, pour toutes les souches à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae*, pour laquelle l'extrait s'est révélé fongistatique.

Discussion

L'usage des extraits naturels de plantes commence à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules bio-actives pour la médecine alternative, notamment dans le traitement des maladies infectieuses. La thérapeutique des infections d'origines bactériennes et fongiques se base principalement sur l'usage des antibiotiques et antifongiques dont la prescription parfois inappropriée peut entraîner la sélection de souches microbiennes multi-résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers les plantes médicinales qui constituent une source de nouvelles molécules dotées de différentes activités biologiques afin de limiter le développement alarmant du phénomène de la multi-résistance.

En partant de cette thématique, nous nous sommes proposé de tester l'efficacité de trois extraits (éthanolique, méthanolique et aqueux) de *Salvia argentea*, vis-à-vis de vingt souches de micro-organismes reconnus pour leur résistance intrinsèque à plusieurs agents antibactériens et antifongiques ainsi que leur grande capacité d'acquérir de la résistance au cours de l'antibiothérapie.

Par ailleurs, les rendements obtenus de nos extraits éthanolique et méthanolique étaient de l'ordre de 21,2%, 23% respectivement. L'extrait aqueux a donné un rendement plus important de l'ordre de 32,5%.

Ainsi, **Mora et al. (2006)**, en extrayant les parties aériennes de *Salvia elegans*, obtiennent un rendement de 16,75% après une macération à l'éthanol (60 %) pendant 2 h. Tandis que, les travaux d'**Alimpić et al. (2015)** montrent des rendements très faibles après la macération de 10g des parties aériennes de *Salvia ringens* dans 100 ml d'éthanol et méthanol, ils obtiennent des résultats de l'ordre de 7,70% et 6,94 %, respectivement. Ces différences enregistrées dans les rendements peuvent être liées à la perte de certaines substances relativement volatiles durant les procédés d'extraction ou en fonction du temps de séchage de la biomasse (**Kossi et al., 2009**).

L'évaluation de l'activité antimicrobiennes des extraits de *Salvia argentea*, par la méthode de diffusion en milieu gélosé vis-à-vis de différentes souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *Pasteurella multocida*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* et *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Proteus freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter fetus*, *Pseudomonas aeruginosa*), et fongiques (*Candida albican* L1, *Candida albican* L2, *Candida albican* L3 et *Saccharomyces cerevisiae*), a montré une sensibilité relativement variable d'un germe à

l'autre vis-à-vis des différents extraits et en fonction de leurs concentrations croissantes (12.5, 25, 50, 100 mg/ml).

La méthode de diffusion sur milieu gélosé vise à tester l'efficacité des extraits vis-à-vis de nos souches bactériennes. Dans la présente étude, l'existence des zones d'inhibition montre clairement que toutes les souches testées sont sensible aux extraits éthanolique, méthanolique et aqueux de *Salvia argentea* à différentes concentrations.

Selon les données collectées durant l'évaluation de la sensibilité des bactéries aux différents extraits, *Klebsiella pneumonia* et *Pasteurella multocida* se sont révélées sensibles à toute les concentrations avec des zones d'inhibitions supérieurs à celle des autres souches (19 et 20 mm) pour *Klebsiella pneumonia* et (20 et 23 mm) pour *Pasteurella multocida*.

A ces valeurs s'ajoutent celle d'une CMI intéressante de l'ordre de (7 ,81 mg / ml).

Ces résultats sont en désaccord avec ceux entrepris par **Petrović et al. (2009)** qui en testant l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de *Salvia amplexicaulis*, contre des bactéries à Gram positif; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* et Gram négatif ; *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et une souche de *Candida albicans*, montrent que le meilleurs effet d'inhibition est détecté contre *Micrococcus luteus* suivi de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Candida albicans*, en concluant que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes que les bactéries à Gram positif.

Etant donné que que *Klebsiella pneumonia* et *Pasteurella multocida* sont des souches causant des infections pulmonaires. Ces infections pouvant être des pneumonies nosocomiales, des pneumopathies et des pneumopathies abcédées (**Motheau-Dirani ,2014**). Nous nous sommes intéressés particulièrement à la forte sensibilité de ces deux souches aux différents extraits, ces résultats viennent en appuis aux données de l'enquête ethnopharmacologique sur l'usage exclusif de *Salvia argentea* comme remède traditionnel contre les maladies respiratoires.

La sensibilité de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline aux extraits éthanolique et méthanolique de *Salvia argentea* peut être expliquée par les travaux d'**Abouzeed et al. (2013)**, qui en testant l'effet inhibiteurs de quelques plantes médicinales libyennes, entre autres, des plantes du genre *Salvia*, révèlent que les plantes antimicrobiennes les plus actives étaient *Salvia officinalis*, *Pistacia atlantica*, *Arbutus pavarii* et *myrtus communis*, et concluent que les extraits méthanoliques de ces plantes peuvent être utilisés comme source de molécules antimicrobiennes contre les souches les plus résistantes, à savoir ; *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline .

Par ailleurs, les tests de sensibilité des levures aux extraits de *Salvia argentea*, montrent une sensibilité importante des levures pour les différentes concentrations testées. Cependant *Saccharomyces cerevisiae* s'est avérée très sensible à la concentration de 100 mg/ml avec des zones d'inhibitions de l'ordre de (24 mm). De ce fait *Saccharomyces cerevisiae* est plus sensible aux extraits que les souches de *Candida albicans*. Ce qui coïncide avec les études de **Farcasanu et Oprea (2006)**, qui indiquent que les cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) sont sensibles aux extraits d'éthanoliques des feuilles de *Salvia officinalis*. Tandis que, **Lee et Kim (2016)** confirment l'activité antifongique des extraits de *Salvia miltiorrhiza* contre *Candida albicans* et indiquent qu'elle est associée à la modification de la perméabilité membranaire.

Ünver et al. (2008) ont testé in vitro, les effets inhibiteurs des extraits méthanoliques de sauges (*Salvia officinalis* L.), de laurier (*Laurus nobilis* L.) et du thym (*Thymbra spicata* L.) sur des isolats cliniques de onze souches de levures, indiquent qu'ils peuvent être des outils efficace pour contrôler la croissance fongique.

En contrepartie, pour confirmer l'efficacité de l'utilisation des plantes médicinales et pallier aux problèmes de résistances des germes, nous nous sommes proposé de comparé leur effets avec celui de la sensibilité des bactéries et levures aux antibiotiques et antifongiques. Néanmoins, les molécules bioactives contenus dans les extraits de plantes médicinales, ont un pouvoir inhibiteur plus large, capable d'inhiber plusieurs souches bactériennes et/ou fongiques, contrairement aux antibiotiques avec tout leurs apports incontestés à la pharmacologie et à la médecine, depuis leur découverte en 1928, leur action reste ciblée et spécifique à un seul type microbien.

Bien que la méthode de diffusion sur milieu gélosé soit simple, rapide et applicable à tout les types des substances antimicrobiennes, elle porte toujours des difficultés notamment dans l'interprétation des résultats des extraits, en tenant compte que les zones d'inhibition peuvent être affectées par plusieurs facteurs tels que : la mauvaise diffusion des extraits dans la gélose à cause de leur nature biochimique, leur volatilisation et la capacité limité des disques à absorber un volume suffisant de l'extrait à examiner, de ce fait cette méthode a été limité au criblage des activités antimicrobiennes qui doit être complété ensuite par une mesure de la sensibilité des micro-organismes à l'augmentation de la dose de l'extrait naturel et la détermination de la CMI et CMB et/ ou CMF (**Kelen et Tepe, 2008**).

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices exprimées pour les différents extraits de *salvia argentea* sur les bactéries testées sont très intéressantes. *Pasteurella multocida* et *Klebsiella pneumonia* ont affiché une valeur de CMI de l'ordre de 7,81 mg / ml.

Les autres souches ont enregistré des valeurs de CMI entre 15,62 et 62,48 mg / ml.

L'extrait méthanolique possède exclusivement la valeur de CMI la plus basse pour la souche *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, cette valeur est de l'ordre de 3,90 mg / ml.

Ceci, est confirmé par les études de **Kivrak et al. (2009)**, qui ont testé l'effet antioxydant, anticholinestérasique et antimicrobien sur plusieurs micro-organismes de l'extrait éthanolique de *Salvia potentillifolia*, et ont démontré que cet extrait a une forte activité contre *Bacillus subtilis* et *Bacillus. Cereus*. Ils ont remarqué qu'il présente une activité anticandidal remarquable contre *Candida albicans* et *Candida. tropicalis* avec des valeurs de CMI de 18,5 et 15,5 mg / ml.

Delamare et al. (2007), quant à eux, après l'analyse des huiles essentielles de *Salvia officinalis* et *Salvia triloba* cultivées dans le sud du Brésil, indiquent que leurs principaux constituant sont ; α - thujon , le 1,8 -cinéole , le camphre , le bornéol et le β -pinène , alors que celles de *Salvia triloba* étaient α - thujon , le 1,8 -cinéole , le camphre, β -caryophyllene et confirment que ces constituant possèdent des activités bactériostatiques et bactéricides remarquables contre *Bacillus cereus* , *Bacillus mégathérium* , *Bacillus subtilis* , *Aeromonas hydrophila* , *sobria Aeromonas* , et *Klebsiella oxytoca* . En outre, l'huile essentielle de *Salvia triloba* a efficacement inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Aeromonas hydrophila*, leur croissance a été considérablement réduite, même en présence de 0,05 mg / ml.

Néanmoins les concentrations minimales fongicides exprimées pour les différents extraits vis-à-vis des levures montrent clairement une action fongicides sur les trois souches de *Candida albicans* . Tandis que pour *Saccharomyces cerevisiae* les extraits exercent une action fongistatique. **Kivrak et al. (2009)**, ont remarqués aussi que l'extrait éthanolique de *Salvia potentillifolia* présente une activité remarquable contre *Candida albicans* et *Candida tropicalis* avec des valeurs de CMI de 18,5 et 15,5 mg / ml.

Selon ces résultats obtenus, il nous paraît évident que les méthodes basées sur l'usage des extraits de plantes, peuvent avoir un intérêt important dans le traitement des maladies infectieuses, dans l'objectif à long terme, d'une éventuelle substitution partielle des antibiotiques. Ces antibiotiques dont l'emploi inapproprié peut dériver vers un phénomène de multi-résistance plus complexe.

III- Résultats de l'évaluation de l'activité thérapeutique *in vivo* de l'extrait aqueux des feuilles de *Salvia argentea*

1- Effet du Nickel sur le poids corporel et le poids des organes

L'étude a porté sur la détermination du poids corporel et du poids des organes, chez les rats intoxiqués au Ni comparés aux rats traités et aux témoins (**Figures 42 et 43**).

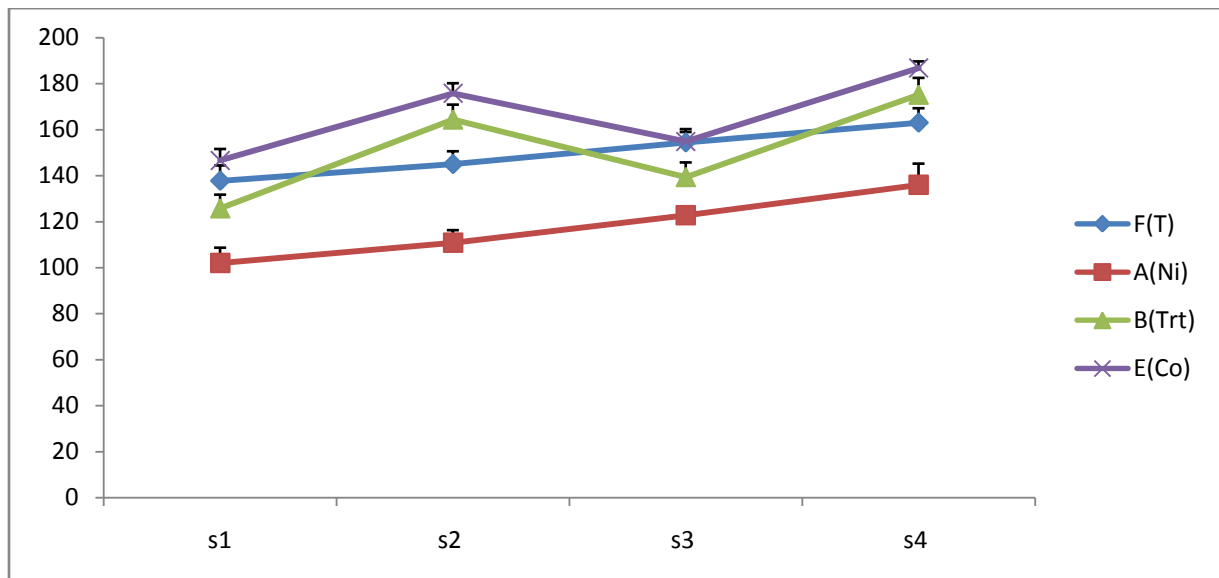


Figure 42. L'évolution du poids corporel en (g) chez les différents lots de rats
Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***: $p < 0.001$).

Les résultats enregistrés montrent une diminution significative ($p < 0.001$) du poids corporel chez les rats intoxiquée au Nickel pendant la période de l'expérimentation par rapport aux rats témoins. Cependant les rats qui ont été traités par EAS présentent une augmentation significative ($p < 0,001$) du poids corporel par rapports à celui des rats intoxiqués.

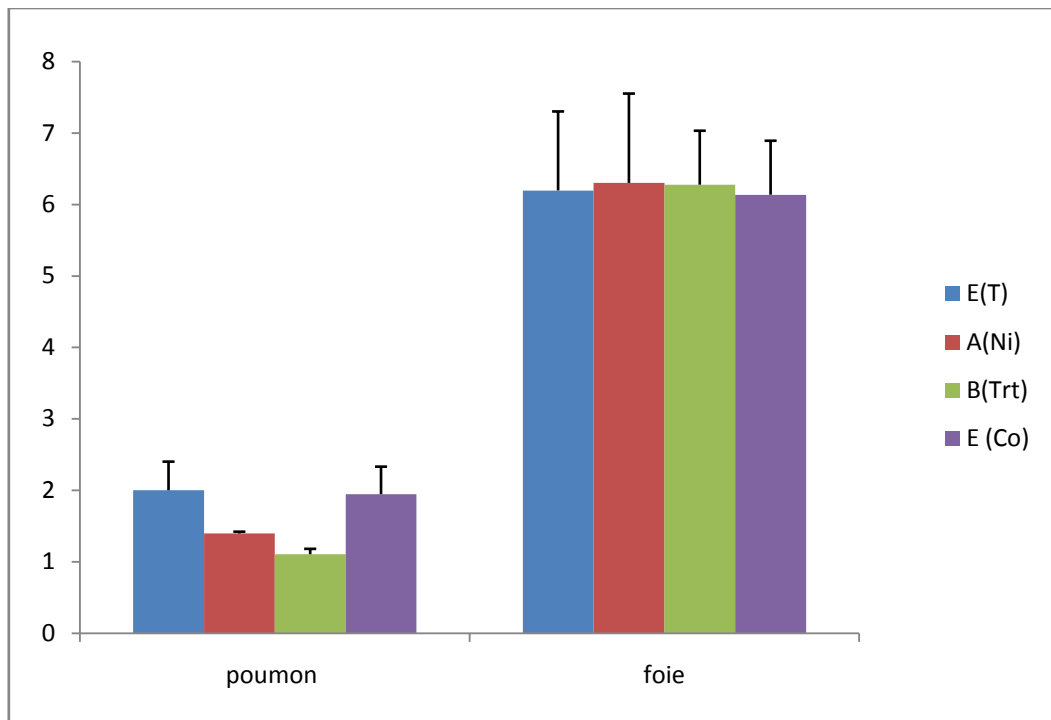


Figure 43. L'évolution des poids des organes (poumons et foie) en (g)
Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM.

Les résultats collectés chez les animaux intoxiqués révèlent une baisse non significative des poids des poumons. Ceci indique que le Ni induit un retard de croissance de cet organe vital chez les rats traités par cet élément métallique. Les animaux qui ont été traités par EAS présentent une augmentation non significative du poids des poumons par rapport aux rats exposés uniquement au métal.

Les données relatives à l'évolution du poids de foie chez les rats des différents lots, indiquent des différences non significatives pour cet organe.

2- Effet du Nickel sur quelques paramètres biochimiques et hématologiques sélectionnés comme des marqueurs de la toxicité :

Pour étudier la toxicité du Ni, nous nous sommes intéressés à suivre l'évolution de quelques paramètres biochimiques et hématologiques jugés les plus intéressants pour marquer la toxicité.

Le foie et les reins, les organes impliqués dans les métabolismes et l'excrétion, sont particulièrement sensibles aux agents toxiques potentiels, notamment les métaux lourds. Les fonctions de ces organes ont été surveillées par les dosages ci-dessous :

2-1- Effet du nickel sur le taux des ASAT Aspartame Amino transférase

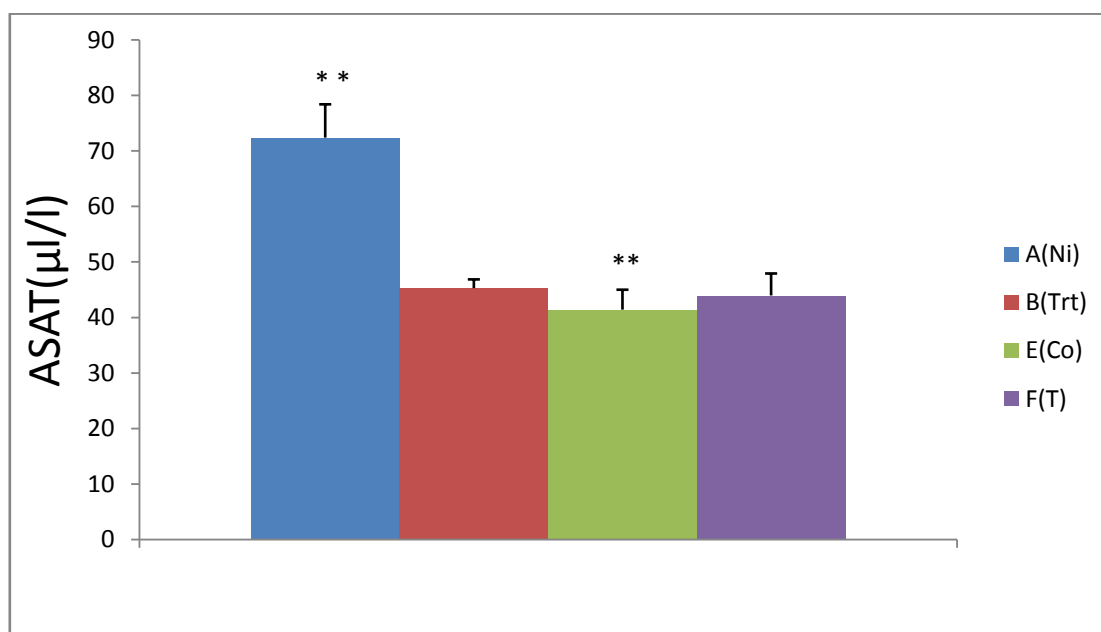


Figure 44. Variation des taux des l'Aspartame Aminotransférase pour les différents lots expérimentaux de rats. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (*: $p < 0.01$).

Les résultats constatés indiquent une augmentation significative ($p < 0,01$) du taux des ASAT chez les rats intoxiqués. Une telle augmentation signale une toxicité probable dans le foie des animaux intoxiqués. Paradoxalement les valeurs des ASAT chez les rats intoxiqués et traités par l'extrait EAS ont nettement diminuées. Ce rétablissement du taux de l'enzyme hépatique semble être le résultat de l'effet réparateur de l'extrait EAS (**Figure 44**).

2-2- Effet du nickel sur le taux des Alanine aminotransférase (ALAT)

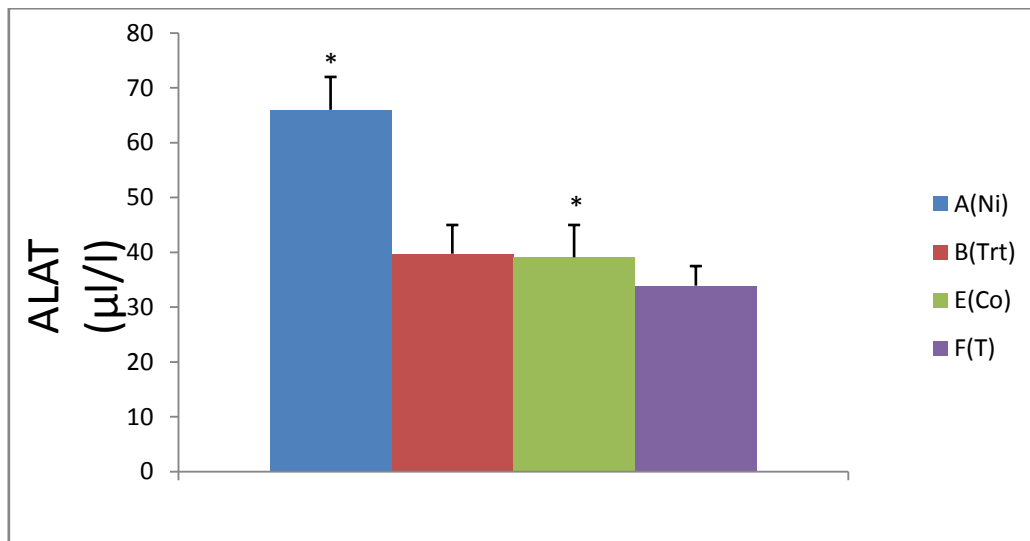


Figure 45. Variation des taux de des ALAT pour les différents lots expérimentaux de rats.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (*: $p < 0.05$).

Les valeurs relatives au taux des ALAT indiquent une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux des ALAT chez les rats intoxiqués. Une telle augmentation peut s'expliquer par une toxicité suspecte dans le foie des animaux intoxiqués. Néanmoins les valeurs de des ALAT chez les rats intoxiqués et traités par l'extrait EAS se sont améliorées. Cette diminution du taux de l'enzyme hépatique semble être le résultat de l'effet réparateur de l'extrait EAS (Figure 45).

2-3- Effet du nickel sur le taux de l'urée

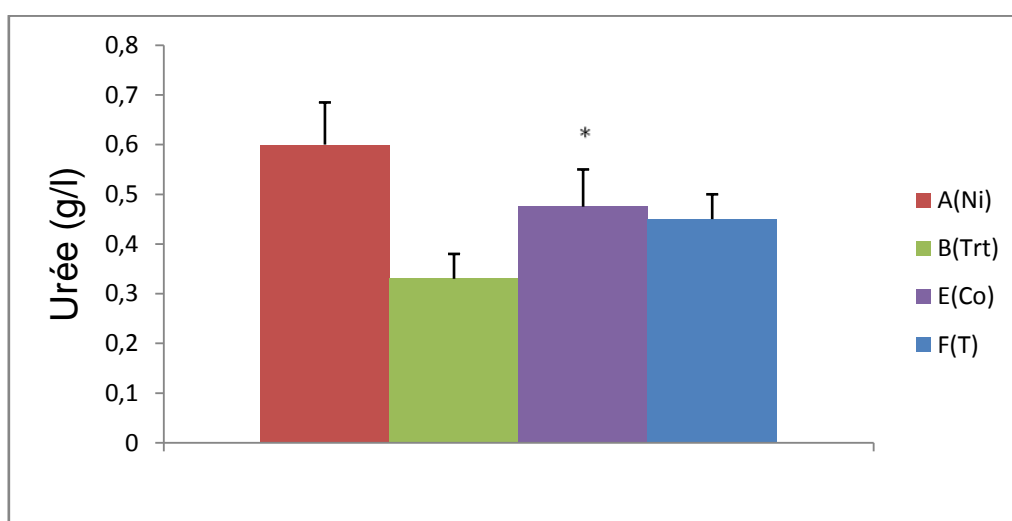


Figure 46. Variation des taux de l'urée pour les différents lots expérimentaux de rats.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (*: $p < 0.05$).

Les résultats constatés indiquent une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux de l'urée chez les rats intoxiqués. Les valeurs de l'urée chez les rats intoxiqués et traités par l'extrait EAS ont subi une amélioration notable. Ces résultats nous montrent bien l'effet toxique du Ni sur la fonction rénale tandis que le rétablissement du taux de ce paramètre peut être dû à l'effet réparateur de l'extrait EAS (**Figure 46**).

2-4- Effet du nickel sur le taux de créatinine

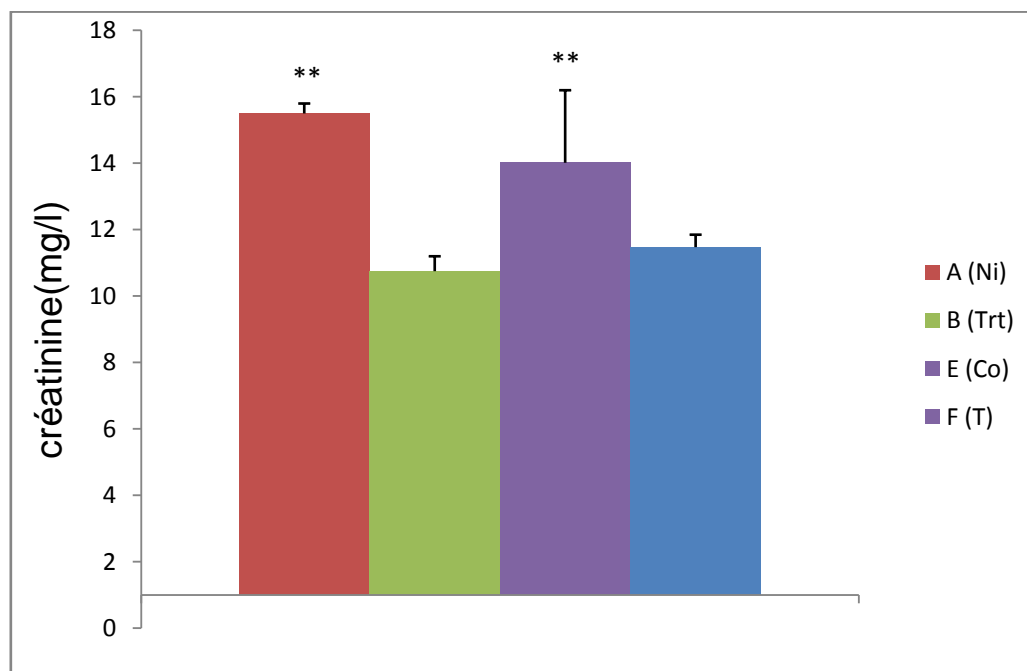


Figure 47. Variation des taux de créatinine pour les différents lots expérimentaux des rats.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (*: $p < 0.01$).

Une augmentation significative (*: $p < 0.01$) du taux de créatinine chez les rats intoxiqués a été enregistrée. Une telle augmentation soupçonne une toxicité probable dans les reins des animaux intoxiqués. Chez les rats intoxiqués et traités par l'extrait EAS les valeurs de créatinine ont diminuées. Ce rétablissement du taux de ce paramètre est probablement le résultat de l'effet réparateur de l'extrait EAS (**Figure 47**).

2-5- Effet du nickel sur la formule sanguine (les plaquettes)

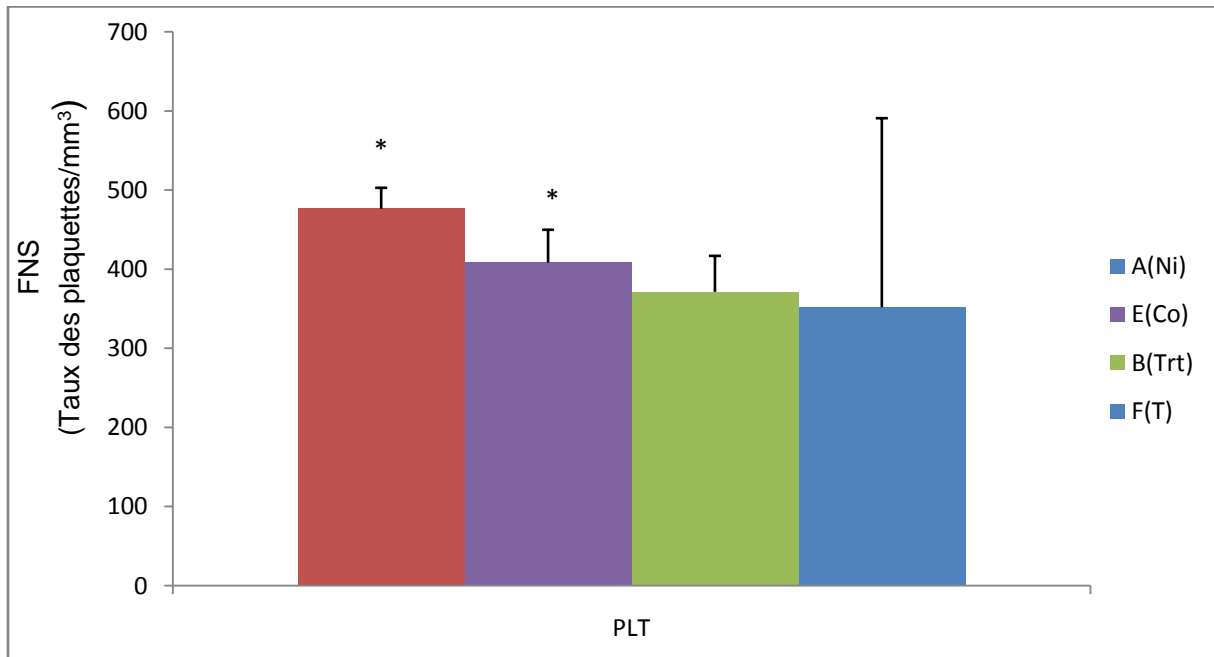


Figure 48. Evolution du taux des thrombocytes pour les différents lots expérimentaux de rats.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (*: $p < 0.05$).

Les résultats de la formule sanguine (FNS) se rapportant au taux des plaquettes révèlent une augmentation significative ($p < 0.05$) de ce paramètre chez les rats intoxiqués.

Les valeurs obtenues chez le lot des rats intoxiqués et traités par l'extrait EAS ont subi une amélioration qui tend vers les valeurs des rats témoins.

Ces résultats peuvent être expliqués par une inflammation pulmonaire résultant de l'effet toxique du Ni sur la fonction respiratoire. Une corrélation étroite existe entre l'activation plaquettaire et la suractivation de l'inflammation pulmonaire. Il a été mis en évidence, pour la première fois, le recrutement des plaquettes dans les processus associés à la sévérité des infections pulmonaires par **Lê et al. (2015)**

Le rétablissement du taux de ce paramètre peut être dû à l'effet réparateur de l'extrait EAS.

3- Effet du Nickel et de l'extrait EAS sur l'architecture tissulaire des poumons

Les résultats de l'étude histologique des poumons des rats intoxiqués par le Nickel montrent un épuisement des tissus et la présence d'un voile (opacité pulmonaire), contrairement aux observations des tissus des rats intoxiqués et traités (lot de la co-administration du Ni et de l'EAS), qui révèlent un aspect histologique normal (cellules parfaites), ainsi les poumons des rats traités ne montre aucun signe d'hémorragie, qu'elle soit légère ou sévère, au sein des tissus (**Figure 49**).

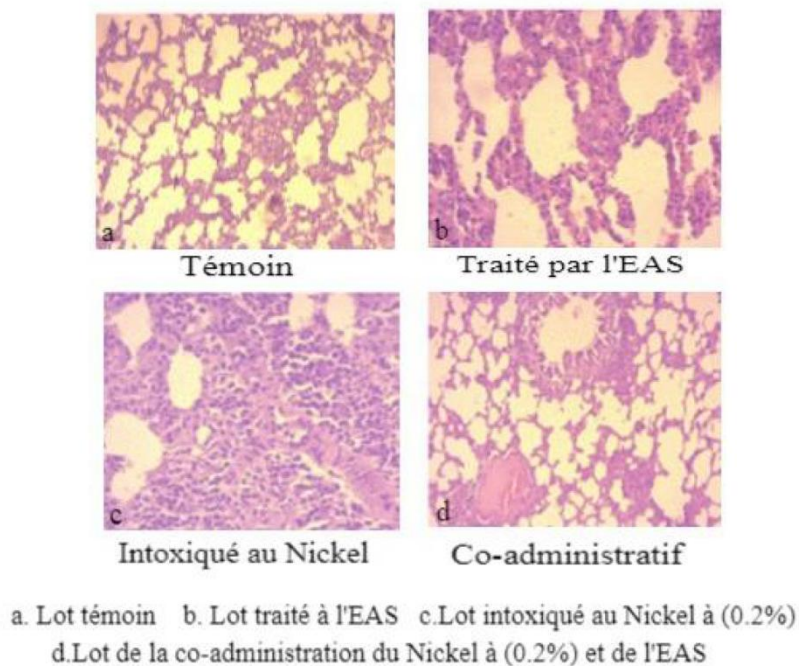


Figure 49. Observations microscopiques des coupes histologiques des parenchymes pulmonaires des différents lots de rats (X40).

4- Effet du Nickel et de l'extrait EAS sur l'architecture tissulaire hépatique

Les observations histologiques des tissus hépatiques des rats intoxiqués par le Nickel montre une congestion modérée à sévère des capillaires sinusoides. Tandis que l'étude histologique du foie des rats intoxiqués et traités (co-administration) révèle un aspect histologique normal. Ce même aspect et sans aucun changement cellulaire a été enregistré chez les rats des lots témoins et témoins traités.

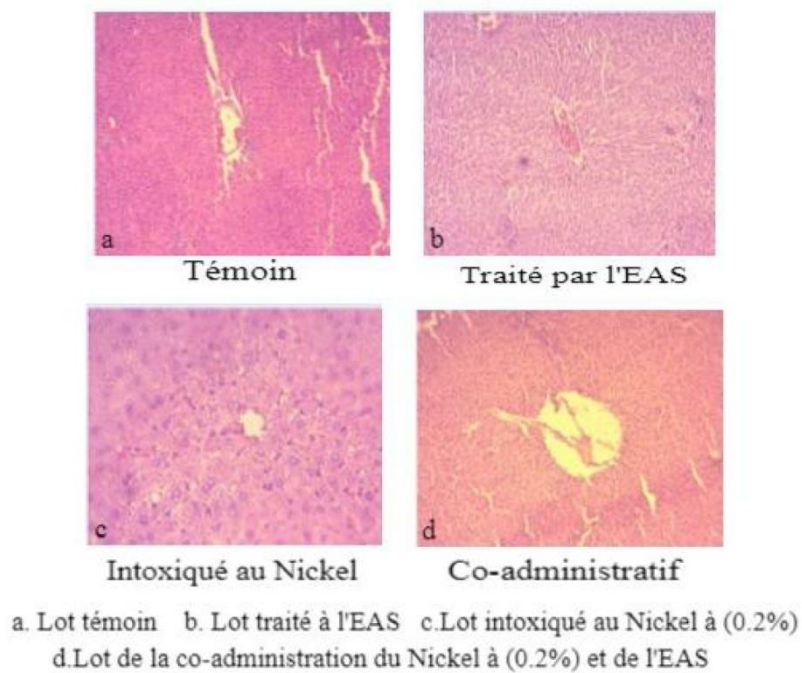


Figure 50. Observations microscopiques des coupes histologiques des tissus hépatiques des différents lots de rats (X40).

Discussion

Les métaux lourds sont un groupe de produits chimiques environnementaux, qui sont universels et non biodégradables. Bien que les effets indésirables émanant de leur exposition sont largement connus, leur utilisation et leurs concentrations dans l'environnement sont croissante (Zhao *et al.*, 2014).

De nombreuses études ont mis en évidence la toxicité des métaux individuels pour les systèmes vivants (Taylor *et al.*, 2014), cependant, ces métaux n'existent pas à l'état individuel seulement, mais aussi sous forme de mélanges dans l'environnement (Ge *et al.*, 2014).

Le nickel comme étant un des métaux lourds est un polluant environnemental. C'est un élément cancérigène responsable de cancers du poumon en milieu professionnel. Chez l'animal, il s'accumule au niveau des reins et il induit des lésions au niveau des glomérules et une protéinurie. Il produit aussi des perturbations sexuelles. Des études ont montré qu'il entraîne une peroxydation lipidique, qui serait en relation avec la production de radicaux hydroxyles. Il peut ainsi altérer le statut antioxydant de la cellule (Hfaiedh *et al.*, 2004 ; Das *et al.*, 2008)

Cependant, pour de nombreux métaux toxiques, il existe des plantes et des extraits de plantes efficaces pour atténuer l'accumulation de ces éléments toxiques et diminuer de leurs effets néfastes. Il convient alors de faire recours à la médecine alternative et traditionnelle.

C'est dans cette optique que l'extrait de *salvia argentea* a été administré aux rats pour tester son pouvoir curatif vis-à-vis d'une intoxication sub-chronique au nickel.

Le poids total des rats intoxiqués a diminué d'une manière significative. De même pour le poids relatif aux organes (précisément le poumon) qui a significativement diminué suite à l'intoxication. Ces résultats sont en accord avec ceux d' **Obone et al. (1999)**, qui ont enregistré chez des rats males et des souris, que le sulfate de nickel administré dans l'eau de boisson provoque une chute du poids des organes notamment le foie.

Les observations histologiques des tissus hépatiques des rats intoxiqués par le Nickel montrent une congestion modérée à sévère des capillaires sinusoides, avec une augmentation significative des enzymes hépatiques. Tandis que l'étude histologique du foie des rats intoxiqués et traités (lot co-administratif) révèle un aspect histologique et des taux d'enzymes normaux. Ce même aspect et sans aucun changement cellulaire a été enregistré chez les rats des lots témoins et témoins traités, avec des taux d'enzymes hépatique (ASAT) et (ALAT) dans les normes.

Il a été signalé par **Dieter et al. (1988)** ; **Novelli (1998)**; **Sidhu et al. (2004)** que chez les rats, l'intoxication par le sulfate de nickel administré par voie cutanée ou orale, témoigne d'une dégénérescence et gonflement des hépatocytes, une nécrose focale et une vacuolisation. Selon **Sunderman et al. (1988)**; **Pari et Prasath (2008)** ses altérations s'accompagnent d'une augmentation de l'activité enzymatique du foie notamment de la catalase, de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT), avec une augmentation du taux des lipides peroxydase et de la bilirubine.

Des études expérimentales, sur l'effet hépato-protecteur des extraits de *Siegesbeckia orientalis* L, *Berberis tinctoria* Lesch et *Justicia betonica* L, à différentes concentrations et en utilisant le paracétamol comme agent hépatotoxique, ont révélé des effets préventifs de ces extraits d'une manière dose dépendante (**Murugesh et al., 2005** ; **Balamurugan et al., 2008** ; **Sundari et al., 2013**). D'autre part, **Balamurugan et al. (2008)** ont rapporté un effet hépato-protecteur de l'extrait de *Lampito mauritii* , à des doses 100 et 200 mg/kg avec une dose de paracétamol 2000mg/kg ,qui est presque similaire à celui obtenu avec l'extrait de *Clematis flammula* .Ce même effet hépato-protecteur avec une diminution notable des enzymes hépatiques a été soulevé par les travaux de deux auteurs, **Zarei (2015)** et **Parasai et al. (2014)** sur deux espèces du genre *Salvia* : *Salvia hydrangea* et *Salvia officinalis* respectivement.

Cependant les résultats de l'étude histologique des poumons des rats intoxiqués par le Nickel montre un épuisement des tissus et la présence d'un voile (opacité pulmonaire), contrairement aux rats intoxiqués et traités (lot de la co-administration du Ni et de l'E.A.S) révèle un aspect histologique normal (cellules parfaites).

Les études chez l'homme et l'animal indiquent que le système respiratoire est la cible principale de la toxicité du nickel. Le nickel qui parvient au niveau pulmonaire à tendance à persister au niveau de cet organe, la rétention dépend notamment de la solubilité des composés et du captage cellulaire. La muqueuse nasale peut retenir du Ni pendant de nombreuses années (**Torjussen et al., 1978, 1979a, 1979b**). Les formes insolubles, après phagocytose par les macrophages, peuvent générer des quantités très importantes d'espèces réactives de l'oxygène, surtout avec le sous-sulfure Ni_3S_2 (**Zhong et al., 1990 ; Huang et al., 1994**).

Les altérations et changements histopathologiques par des dommages aux poumons (congestion, inflammation, fibrose et oedème) ont été signalés chez des rats et des souris exposés au sulfate de nickel hexahydraté pendant 12 jours dans des travaux de **Benson et al. (1987)** et **Dunnick et al. (1988)**. D'autres travaux entrepris par **Dunnick et al. (1988)** et **Haley et al. (1990)**, on rapporté une inflammation des poumons accompagnée d'une pneumonie nécrosante et une dégénération de l'épithélium respiratoire chez les rats et une atrophie de l'épithélium olfactif.

Une étude autopsique d'individus exposés professionnellement au nickel a montré que les plus fortes concentrations étaient mesurées dans les poumons, puis dans la thyroïde, les glandes surrénales, les reins, le cœur, le cerveau, la rate et le pancréas (**Rezuke et al., 1987**).

Le nickel traverse la barrière fœto-placentaire et s'accumule dans les tissus du fœtus (**Jasim et Tjalve, 1986**).

Le taux élevé des thrombocytes peut s'expliquer par les travaux de **Lê et al. (2015)** sur le recrutement des plaquettes dans les processus associés à la sévérité des infections pulmonaires.

Dans notre étude l'aspect histologique normal (cellules parfaites) du parenchyme pulmonaire remarqué chez le lot de rat intoxiqués et traités (lot de la co-administration du Ni et de l'EAS) est probablement dû à l'effet protecteur de l'extrait aqueux de *Salvia argentea*. Ces résultats rejoignent ceux de **Benzidane et al. (2013)**, où l'incubation de la trachée de rat pour 30mn avec des extraits (aqueux et méthanolique) de *Capparis spinosa* (0,1 - 1 et 10 mg /ml), prouve que ces extraits sont bien efficaces comme broncho-relaxants.

Conclusion

De nos jours, La **phytothérapie** jouit d'un intérêt croissant auprès d'une communauté scientifique soucieuse de rechercher de nouvelles substances bioactives. La pharmacopée traditionnelle, munie de ces méthodes douces, naturelles et sans effets secondaires, commence à prendre de l'ampleur au dépend des méthodes conventionnelles de la chimiothérapie.

C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressés à étudier une plante (*Salvia argentea*) très utilisée en médecine traditionnelle, particulièrement dans la région de Saida. L'intérêt porté à cette espèce réside d'une part dans le fait qu'elle demeure encore relativement peu étudiée et d'autre part, elle ne figure pas dans les recueils des plantes médicinales en Algérie et par conséquent, ne connaît aucune application en médecine conventionnelle.

L'enquête ethno pharmacologiques réalisés auprès des herboristes de la région d'étude, nous a permis de confirmer l'usage fréquent de la plante *Salvia argentea* par la population afin de remédier durablement aux maladies respiratoires qui reste une cause majeure de mortalité dans les pays en voie développement.

Les analyses physico-chimiques, phytochimiques et microbiologiques ont montrés que *Salvia argentea* peut être conservée et utilisée pendant longtemps sans aucun risque d'altérations ou de contaminations microbiennes et que l'effet thérapeutique de cette plante serait probablement dû à la diversité des groupes chimiques révélés.

Pour mieux cerner les activités biologiques de l'espèce nous avons opté pour une évaluation *in vitro* des potentialités antimicrobiennes des différents extraits de *Salvia argentea*. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que :

Les extraits aqueux et hydro-alcoolique ont permis d'obtenir des rendements assez satisfaisants.

Les deux méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits ont montré l'efficacité de ces derniers sur l'ensemble des souches testés en exerçant une action majoritairement bactéricide et fongicide. Cependant, certaines souches se sont montrés très sensibles parmi lesquelles : *Klebsiella pneumonia*, *Pasteurella multocida* pour les bactéries et *Saccharomyces cerevisiae* pour les levures avec des diamètres des zones d'inhibition et des valeurs de CMI, CMB et CMF très intéressantes.

Toutes ces valeurs témoignent de l'efficacité de cette plante envers des souches bactériennes jugées les plus résistantes et touchant le système respiratoire.

La comparaison des résultats précédents avec ceux obtenus dans les contrôles antibiotiques et antifongiques, nous a permis de confirmer l'intérêt capitale de découvrir des nouvelles

molécules naturelles visant à contrer les phénomènes de résistances engendrés par l'exposition inappropriés et inadapté à l'antibiothérapie.

Une évaluation *in vivo* des activités thérapeutiques de la plante a été entreprise sur des rats intoxiqués au Nickel et cela par deux approches : biochimique et histologique.

Cependant, les résultats trouvés ont montré que la richesse de *Salvia argentea* en métabolites secondaires nous laisse déduire que le traitement par son extrait aqueux à probablement conduit à des corrections des perturbations enregistrées et des améliorations notoire dans les différentes analyses biochimiques, hématologiques et histologiques.

Les résultats obtenus, des valorisations *in vitro* et *in vivo* des extraits de la plante, viennent confirmer ceux révélés par l'enquête ethno-pharmacologique dans le traitement des maladies respiratoires et constituent une source d'informations très précieuse pour l'introduction de l'espèce dans la flore médicinale nationale.

En termes de perspectives, il serait envisageable d'entreprendre un ensemble de protocoles expérimentaux plus approfondis portant sur différents volets :

- ❖ Il serait nécessaire de réaliser de nouvelles expérimentations, portant sur la confrontation des souches microbiennes sélectionnées dans la partie *in vitro* avec des rats wistar, pour tester l'éventuel effet antimicrobien *in vivo* des extraits de *Salvia argentea*.
- ❖ Il serait envisageable d'entreprendre des protocoles expérimentaux plus approfondis portant sur la caractérisation fine des extraits pour désigner les composés responsables des activités biologiques révélées.
- ❖ Face à l'intérêt croissant porté à l'étude des radicaux libres (RLO) dans les domaines de biologie moléculaires et cellulaires, il est nécessaire d'orienter nos recherches vers la mise au point de techniques fines permettant de détecter les potentialités antioxydants des différents extraits.
- ❖ Une étude approfondie de l'huile essentielle de la plante, réalisée avec des protocoles de caractérisations qualitatives et quantitatives adaptés à l'espèce s'avère d'une grande importance dans le but de chercher de nouvelles molécules naturelles à intérêts thérapeutiques.

Références Bibliographiques

A

Abouzeed YM, Elfahem A, Zgheel F, Ahmed MO (2013). Antibacterial *In-Vitro* Activities of Selected Medicinal Plants against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Libyan Environment. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* 3:194.

Alimpić A, Pljevljakušić D, Šavikin K, Knežević A, Ćurčić M, Veličković D, Stević T, Petrović G, Matevski V, Vukojević J, Marković S, Marin PD, Duletić-Laušević S (2015). Composition and biological effects of *Salvia ringens* (Lamiaceae) essential oil and extracts. *Industrial Crops and Products* 76:702-709.

Ambrose AM, Larson PS, Borzelleca JF, Hennigar GRJ (1976). Longterm toxicologic assessment of nickel in rats and dogs. *Journal of food science and technology* 13:181–187.

Andersen QM, Markham KR (2006). Flavonoids. Chemistry, Biochemistry, and Applications; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.

Aouadhi C, Hasnaoui B, Ghazghazi H, Maaroufi A (2013). Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord-ouest de la Tunisie. *Microbiologie Hygiène Alimentaire* 25:9-14.

Ascensao L, Marques N, Pais MS (1995). Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 75:619-626.

B

Balamurugan M, Parthasarathi K, Ranganathan L, Cooper E (2008). Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant proprieties. *Journal of Zhejiang University science b* 9:141-147.

Baran P, Özdemir C, Aktaş K (2008). The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: istochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany* 81:263-271.

Baran P, Özdemir C, Aktas K (2010). Structural investigation of the glandular trichomes of *Salvia argentea*. *Biologia* 65:33–38.

Battandier JA, Trabut M (1888). Flore de l'Algérie; ADOLPHE JORDAN: Paris, France.

Baytop T (1999). Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present) Nobel Medicine Publication Istanbul.

Benabdesslem Y, Hachem K, Kahloula K, Slimani M (2017). Ethnobotanical Survey, Preliminary Physico-Chemical and Phytochemical Screening of *Salvia argentea* (L.) Used by Herbalists of the Saïda Province in Algeria. *Plants* 6:59.

Benson JM, Carpenter RL, Hahn FF, Haley PJ, Hanson RL, Hobbs CH, Pickrell JA, Dunnick JK (1987). Comparative inhalation toxicity of nickel subsulfide to F344/N rats and B6C3F1 mice exposed for 12 days. *Fundamental and applied toxicology* 9:251-265.

Benzidane N, Charef N, Krache I, Baghiani A, Arrar L (2013). In Vitro Bronchorelaxant Effects of *Capparis Spinosa* Aqueous Extracts on Rat Trachea. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3:085-088.

Bouaoun D, Hilan C, Garabeth F, Sfeir R (2007). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. *Phytothérapie* 5: 129-134.

Bouchet N, Lévesque J, Pousset J-L (2000). HPLC isolation, identification and quantification of tannins from *Guiera senegalensis*. *Phytochemical Analysis* 11:52–56.

Brignon J-M, Gouzy A, Soleille S. (2006). Nickel et principaux composés I N E R I S, 4, 21-22.

Brun R (1979). Nickel dans les aliments et eczéma de contact. *Dermatologica* 159:365-70.

Bruneton J (2009). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4^e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc -Éditions médicales internationales, 1288 p.

D

Das K, Das S, Dhundasi S (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *The Indian journal of medical research* 128:412–425.

De Billerbeck VG, Roques C, Vaniere P, Marquier P (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. *Hygiène* 10 :248-251.

Doukkali Z, Boudida H, Srifi A, Taghzouti K, Cherrah Y, Alaoui K (2015). Les plantes anxiolytiques au Maroc. Études ethnobotanique et ethno-pharmacologique. *Phytothérapie* 13:306–313.

C

Caillet S, Lacroix M (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en Sciences appliquées à l'alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, université de Laval (Québec).

Canton E, Pema N, Viudes G, Gobernado M, Espinel-Ingroff A (2003). Minimum fungicidal concentration of amphotericin B for bloodstream *Candida* Species. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 45:203-206.

Choi H, Jedrychowski W, Spengler J, Camann DE, Whyatt RM, Rauh V, Tsai WY, Perera FP (2006). International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth. *Environmental health perspectives* 114:1744–1750.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2006). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, 9^{ème} éd., M2-A9, 26 (1). Wayne, Pennsylvanie, États-Unis: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cornell RG, Landis JR (1984). Mortality patterns among nickel/chromium alloy foundry workers. *IARC scientific publications* 53:87-93.

Cox JE, Doll R, Scott WA, Smith S (1981). Mortality of nickel workers: experience of men working with metallic nickel. *British journal of industrial medicine* 38:235-239.

D

Daoud A, Malika D, Bakari S, Hfaiedh N, Mnafgui K, Kadr A, Gharsallah N (2015). Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arabian Journal of Chemistry*. In Press, Corrected Proof.

Delamare APL, Moschen-Pistorello IT, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food chemistry* 100: 603-608.

Demirci B, Demirci F, Dönmez AA, Franz G, Paper DH, Baser KHC (2005). Effects of *Salvia* essential oils on the chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Pharmaceutical Biology* 43:666-671.

Denkhaus E, Salnikow K (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical reviews in oncology/hematology* 42: 35-56.

Desmares C, Laurent A, Delerme C (2008). Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Edition afssaps.

Dieter MP, Jameson CW, Tucker AN, Luster MI, French JE, Hong HL, Boorman GA (1988). Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic responses in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. *Journal of toxicology and environmental health* 24: 357-72.

DRCS (2016). Direction régionale du commerce –Saida-, Monographie de la région Saida. <http://www.drc-saida.dz/fr/images/PDF/monographie%202016.pdf>.

Dunnick JK, Benson JM, Hobbs CH, Hahn FF, Cheng YS, Eidson AF (1988). Comparative toxicity of nickel oxide, nickel sulfate hexahydrate, and nickel subsulfide after 12 days of inhalation exposure to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicology* 12: 145-156.

Duraffourd CD, Hervicourt L, Lapraz JC(1990). Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème Edition. Masson (Paris). 87.

E

Edris AE (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy research* 21:308-323.

Enterline PE, Marsh GM (1982). Mortality among workers in a nickel refinery and alloy manufacturing plant in West Virginia. *Journal of the National Cancer Institute* 68:925-933.

Estilai A, Hashemi A, Truman K (1990). Chromosome number and meiotic behavior of cultivated chia, *Salvia hispanica* (Lamiaceae). *Hortscience* 25:1646-1647.

F

Farcasanu IC, Oprea E (2006). Ethanol extracts of *Salvia officinalis* exhibit antifungal properties against *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Analele Universitatii Bucuresti-chimie* 1:51–56.

Fellah S, Romdhane M, Abderraba M (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* L. cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie* 16:193-202.

Freeman L, Carel Y. (2006). Aromathérapie. *NUTRA NEWS* Science, Nutrition, Prévention et Santé. <http://www.nutranews.org>.

G

Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M, Taghizadeh M, Astaneh S, Rasooli I (2007). Chemical and biological characteristics of Cuminumcyminum and Rosmarinusofficinalis essential oils. *Food Chemistry* 102:898–904.

Gazengel JM., Orecchioni AM (2013). Le préparateur en pharmacie – Guide théorique et pratique. 2ème ed. Ed. Tec et Doc, Paris. France. 1443 p.

Ge HL, Liu SS, Su BX, Qin LT (2014). Predicting synergistic toxicity of heavy metals and ionic liquids on photobacterium Q67. *Journal of hazardous materials* 268: 77–83.

Gonzalez AG, Barrera JB, Garcia TZ, Rosas FE (1984). Sesquiterpene lactones from Centaurea species. *Phytochemistry* 3:2071–2072.

Gorham J (1977). Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and *hydrangea*. *Phytochemistry* 16:249-253.

Gravot A (2009). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Support de cours sur le métabolisme secondaire d'Antoine Gravot, Equipe pédagogique Physiologie Végétale. Université de Rennes.

Guignard JL (1974). Abrégé de biochimie végétale à l'usage des étudiants en pharmacie. Ed. Masson et C^{ie}, Paris. France. 214 p.

Guignard JL (1996). Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris. France. 274 p.

Guinoiseau E (2010). Molécules antimicrobiennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat à l'université de Corse, France.

H

Haley PJ, Shopp GM, Benson JM et al. (1990). The Immunotoxicity of Three Nickel Compounds Following 13-week Inhalation Exposure in the Mouse. *Fundamental and applied toxicology* 15: 476-487.

Halioua B, Richard MA (2010). Mise au point sur l'eczéma chronique des mains. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 137:315-327.

Harborne AJ (1998). Phytochemical Methods a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, 3rd ed.; Springer: London,UK.

Haslam E (1994). Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Natural product reports* 11:41-66.

Hedge IC (1972). *Salvia L.* In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (Eds) *Flora Europaea*, Cambridge University Press, Cambridge. pp 188-192.

Hellal Z (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.

Heller W, Forkmann G (1993).The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman et Hall, London. UK. pp 399-425.

Hfaiedh N, Allagui MS, Croute F, Soleilhavoup JP, Guermazi F, Kammoun A, El feki A (2004). Interactions d'une restriction calorique avec les effets du Nickel sur la reproduction chez le rat. *Andrologie* 14, 443-451.

Hemaiswarya S, Kruthiventi A K and Doble M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15 :639-652.

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

Hoet P (2007). Nickel et composés. *Pathologie professionnelle et de l'environnement* 1925(07) :44477-9.

Houndji BVS, Ouetchehou R, Londji SBM, Eamouzou KSS, Yehouenou B, Ahohuendo CB (2013). Caractérisations microbiologiques et physico-chimiques de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (Lam.), un légume feuille traditionnel au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 7:75–85.

Huang X, Zhuang Zx, Frenkel K, Klein CB, Costa M (1994). Role of nickel and nickelmediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis. *Environmental health perspectives* 02:281-284.

L

Lê VB, Schneider JG, Boergeling Y, Berri F, Ducatez M, Guerin JL, Adrian I, Errazuriz-Cerda E, Frasquilho S, Antunes L, Lina B, Bordet JC, Jandrot-Perrus M, Ludwig S, Riteau B (2015). Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 191:804-19.

Lee HS, Kim Y (2016). Antifungal Activity of *Salvia miltiorrhiza* Against *Candida albicans* Is Associated with the Alteration of Membrane Permeability and (1,3)- β -D-Glucan Synthase Activity. *Journal of microbiology and biotechnology* 26:610-7.

I

INERIS (2006). Nickel et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. <http://www.ineris.fr/substances/fr/>.

Inouye S, Abe S (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie* 1 :2-4.

INRS (1992). Fiche toxicologique n° 68 - Nickel et composés minéraux. Institut National de Recherche et de Sécurité. http://www.inrs.fr/index_fla.html.

INRS (2009). Fiche toxicologique n° 68 - Nickel et ses oxydes. Institut National de Recherche et de Sécurité. www.inrs.fr/fichetox.

Iserin P, Masson M, Restellini JP (2007). Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed. Larousse, Paris. France. 335 p.

Isman MB (2005). Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual review of entomology* 51:45-66.

J

Jasim S, Tjälve H (1986). Mobilization of nickel by potassium ethylxanthate in mice: comparison with sodium diethyldithiocarbamate and effect of intravenous versus oral administration. *Toxicology letters* 31: 249-55.

Jirovertz L, Buchbauer G, Puschmann C, Ngassoum MB (2000). Investigations of aromatic plants from Cameroon: analysis of the essential oils of flowers of *Hyptis spicigera* (Linn) Poit. By GC,GC/MS and olfactometry. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 3: 71-77.

K

Kabouche A (2005). Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse de doctorat en chimie, sous la direction de ZAHIYA KABOUCHE, Algérie, Université Mentouriconstantine, faculté des sciences exactes.104 p.

Kahloula K, Adli DEH, Slimani M, Terras H, Achour S (2014). Effect of nickel chronic exposure on the neurobehavioral functions in Wistar rats during the development period. *Toxicologie Analytique & Clinique* 26:186—192.

Kalustian J, hadji-Minaglou F (2012). La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Springer-Verlag Paris, 210p.

Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC (2006). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series* 1293:156-163.

Karousou R, Hanlidou E, Kokkini S (2000). The sage plants of greece: distribution and infraspecific variation: Sage. The genus *Salvia*. In book: Sage. The genus *Salvia* by (eds) Kintzios S., Hardman R [Harwood Academic Publishers], pp.27-46.

Kelen M, Tepe B (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource technology* 99:4096-104.

Kivrak I, Duru ME, Ozturk M, Mercan N, Harmandar M, Topçu, G (2009). Antioxydant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food chemistry (Article in press)*.

Koba K, Sanda K, Raynaud C, Nenonene YA, Millet J, Chaumont JP (2004). Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp.* Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire* 148:202-206.

Kossi A, Bellefontaine R, Kouami K (2009). Les forêts claires du Parc national Oti-Kéran au Nord-Togo : structure, dynamique et impacts des modifications climatiques récentes. *Secheresse* 20:e1-10.

Kuzma Ł, Rozalski M, Walencka E, Rozalska B, Wysokinska H (2007). Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine* 14:31-35.

L

Lloyd GK (1980). Dermal absorption and conjugation of nickel in relation to the induction of allergic contact dermatitis Preliminary results. Brown SS Sunderman FW Jr , Nickel toxicology. London UK Academic Press. 145-148.

Lu Y, Foo LY (1997). Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry* 59:187-194.

M

Mamadou RS, Moussa I, Sessou P, Yehouenou B, Agbangnan PDC, Illagouma AT, Abdoulaye A, Sohounhloué DCK, Ikhiri K (2014). Etude phytochimique, activités antiradicalaire, antibactérienne et antifongique d'extraits de *Sebastiania chamaelea* (L.) Müll.Arg. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie* 37:10- 17.

Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-Manchado P (2006). Les Polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec et Doc, Paris. France, pp. 1-28.

Mafart P (1996). Génie Industriel et Alimentaire, Procédés Physiques de Conservation, 2nd ed.; Lavoisier: Paris, France.

Maleci Bini L, Giuliani C (2006). The glandular trichomes of the Labiatae. A review. *Acta Horticulturae* 723:85-90.

Martin S, Tsitohaina R (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* 51: 304-315.

Majoros L, Kardos G, Szabó B, Sipiczki M (2005). Caspofungin Susceptibility Testing of *Candida inconspicua*: Correlation of Different Methods with the Minimal Fungicidal Concentration. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49: 3486–8.

Mehdioui R, Kahouadji A (2007). Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène : cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie 29, pp 11-20.

Metcalf JR, Chalk L (1972). Anatomy of the Dicotyledons, Vol. 2, Clarendon Press, Oxford.

Mora S, Millan R, Lungenstrass H, Diaz-Veliz G, Moran JA, Herrera-Ruiz M, Tortoriello J (2006). The hydroalcoholic extract of *Salvia elegans* induces anxiolytic- and antidepressant-like effects in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 106 76–81.

Mossi AJ, Cansian RL, Paroul N, Toniazzo G, Oliveira JV, Pierozan MK, Pauletti G, Rota L, Santos ACA, Serafini LA (2011). Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp. (Lamiaceae). *Brazilian Journal of Biology* 71:121-129.

Motheau-Dirani S (2014). Analyse des pratiques professionnelles en soins primaires : l'antibiothérapie dans la pneumopathie aigüe communautaire en France et en Espagne. Thèse de doctorat en médecine. Université de Toulouse III, 56p.

Multon JL, Bizot H, Martin G (1981). Eau (teneur, activité, absorption, propriétés fonctionnelles). Humidités relatives. In Techniques d'analyse et de Contrôle Dans les Industries Agro-Alimentaires; Deymie, B., Multon, J.L., Simon, D., Eds.; Lavoisier-Tec et Doc: Paris, Volume IV, France.

Murugesh KS, Yeligar VC, Maiti BC, Maity TK (2005). Hepato-protective and antioxidant role of *Berberis tinctoria* leaves on paracetamol induced hepatic damage in rats. *Iranian Journal of pharmacology and therapeutics* 4: 64-69.

N

Nakipoglu M (1993). Bazi adaçayı (*Salvia* L.) türleri ve bu türlerin ekonomik önemi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim Bilimleri Dergisi* 6:45-58.

Newman DJ, Cragg GM (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of natural products* 75:311-335.

Nishizawa A, Honda G, Kobayashi Y, Tabata M (1992). Genetic control of peltate glandular trichome formation in *Perilla frutescens*. *Planta Medica* 58:188-191.

Ngamo TLS, Ngassoum MB, Jirovertz L, Ousman A, Nukenine E, Moukala OE (2001). Protection of stored Maize against *Sitophilus zeamais* (Motsch.) by use of essential oils of spices from Cameroon. *Medical faculty Landbouww University of Gent* 66:473-478.

Nout MJR, Rombouts FM, Havelear A (1989). Effect accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *International journal of food microbiology* 8:351–361.

Novelli ELB, Hernandez RT, Filho LVB, Barbosa LL (1998). Differential/combined effect of water contamination with cadmium and nickel on tissues of rats. *Environmental pollution* 103:295 -300.

O

Obone E1, Chakrabarti SK, Bai C, Malick MA, Lamontagne L, Subramanian KS (1999). Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague-Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 57:379-401.

OEHHA (2001). Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency.- Public Health Goal for Nickel in Drinking Water, August 2001. <http://www.oehha.ca.gov/water/phg/allphgs.htm>.

Onkelinx C, Becker J, Sunderman JFW (1973). Comportamental analysis of the metabolism of ⁶³Ni(II) in rats and rabbits. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 6: 663-676.

Ouraini D, AgoumiL A, Ismaili-Alaoui M, Alaoui K, Cherrah Y, Amrani M, Bellabas MA (2005). Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie* 4:147-157.

Oussou KR, Coffi K, Nathalie G, Seriyolou, Gerard K, Mireille D, Yao T.N, Gilles F, Jean-Claude CH (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus de Chimie* 7:1081-1086.

Özdemir C, Şenel G (2001). The morphological, anatomical and karyological properties of *Salvia forskahlei* L. (Lamiaceae) in Turkey. *Journal of Economic and Taxonomic Botany* 19:297-313.

P

Parasai A, Eidi M, Saderghipour A (2014). Hepatoprotective effect of sage (*salvia officinalis*) leaves hydro-methanolic extract against *Aspergiles paraciticus* aflatoxin-induced liver damage in male rats. *Bulletin of Pharmaceutical Research* 4:129-32.

Pari L, Prasath A (2008). Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Chemico-Biological Interactions* 173:77-83.

Pichard L, Raulet E, Fabre G, Ferrini JB, Ourlin JC, Maurel P. (2006). Human hepatocyte culture. *Methods in molecular biology* 320:283-293.

Pieroni A, Quave CL, Santoro RF (2004). Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* 95:373-384.

Peeking A, Picand B, Hacene K, Lokiec F, Guerin P (1987). Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. *Artères et Veines* 6:512-3.

Penchev PI (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat, université de Toulouse- France.

Petrovic S, Pavlovic M, Tzakou O, Couladis M, Milenkovic M, Vucicevic D, Niketic M (2009). Composition and Antimicrobial Activity of *Salvia amplexicaulis* Lam. *Essential Oil. The Journal of essential oil research* 21: 563-566.

Poitou F (1996). Composition of the essential oil of *Xylophia aethiopica* dried fruits from Benin. *Journal of Essential Oil Research* 8:329-330.

Ponce AG, Fritz R, De Lvalle C, Roura SI (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology* 36:679-684.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA (1995). Microbiologie. De Boeck ed. p 1014.

Privas E (2013). Matériaux ligno-cellulosiques «Élaboration et Caractérisation Supérieure des Mines, Paris. France. 166 p.

Q

Qnais EY, Abu-Dieyh M, Abdulla FA, Abdalla SS (2010). The antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Salvia officinalis* leaf aqueous and butanol extracts. *Pharmaceutical Biology* 48:1149-56.

Quezel P, Santa S (1963). Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales; CNRS: Paris, France.

S

Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK (2004). Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions* 150:199–209.

Siebert DJ (1994). *Salvia divinorum* and Salvinorin A: new pharmacologic findings. *Journal of Ethnopharmacology* 43:53-6.

R

Rendall RE, Phillips JI, Renton KA (1994). Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process. *The Annals of occupational hygiene* 38:921-930.

Rezuke WN, Knight JA, Sunderman FW (1987). Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile. *American journal of industrial medicine* 11:419-426.

Riccobono L, Maggio A, Rosselli S, Ilardi V, Senatore F, Bruno M. (2016). Chemical composition of volatile and fixed oils from of *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) growing wild in Sicily. *Natural product research* 30:25-34.

Rira M (2006). Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Magister en biochimie et microbiologie appliquées, Université Mentouri Constantine, Algérie. 94 p.

S

Schauenberg P, Paris F (2010). Guide Des Plantes Médicinale : Analyse, Description Et Utilisation De 400 Plantes, Ed. Delachaux Et Niestlé, 396 p.

Serrato-Valenti G, Bisio A, Cornara L, Ciarallo G (1997). Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves and chemical analysis of the essential oil. *Annales Botany* 79:329-336.

Shannon HS, Julian JA, Roberts RS (1984). A mortality study of 11,500 nickel workers. *Journal of the National Cancer Institute* 73:1251-1258.

Shannon HS, Walsh C, Jadon N, Julian JA, Weglo JK, Thornhill PG, Cecutti AG (1991). Mortality of 11,500 nickel workers--extended follow up and relationship to environmental conditions. *Toxicology and industrial health* 7:277-294.

Smadja J (2009). Les Huiles Essentielles, Colloque GP3A - Tananarive 2-3 juillet 2009.

Smith MK, Georges EL, Stober JA, Feng HA, Kimmel GL (1993). Perinatal toxicity associated with nickel chloride exposure. *Environmental research* 61:200-201.

Sofowora A (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala (Ed.), Collection: Economie et Développement, Paris, 384p.

Stace CA (1991). Morphological and anatomical characters. E. Arnold (Ed.), Plant Taxonomy and Biosystematics, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 73-81.

Stephan KE, Harrison LM, Penny WD, Friston KJ (2004). Biophysical models of fMRI responses. *Current opinion in neurobiology* 14:629-635.

Stoltz A, Sauvage C, Lamblin C, Bolard F, Wallaert B (2003). Urticaire chronique par allergie alimentaire au nickel. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 43:492-496.

Sunderman FWJ, Dingle B, Hopfer SM, Swift T. (1988). Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulphate and nickel chloride. *American journal of industrial medicine* 14:257-66.

Sunderman FWJ (1993). Search for molecular mechanisms in the genotoxicity of nickel. *Scandinavian journal of work, environment & health* 1:75-80.

Sundari K, Karthik D, Ilavenil S, Kaleeswaran B, Srigopalram S, Ravikumar S (2013). Hepatoprotective and proteomic mechanism of *Sphaeranthus indicus* in paracetamol induced hepatotoxicity in wistar rats . *Food Bioscience* 1:57-65.

Sunderman FWJ, Dingle B, Hopfer SM, Swift T (1988). Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulphate and nickel chloride. *American journal of industrial medicine* 14:257-66.

T

Tapondjou LA, Adler C, Bouda H, Fontemd DA (2002). Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as postharvest grain protectants against six-stored product beetles. *Journal of stored products research* 38:395-402.

Taylor FV, Bugge D, Jackson PB, Chen CY (2014). Pathways of CH₃Hg and Hg ingestion in benthic organisms: an enriched isotope approach. *Environmental science & technology* 48:5058–5065.

Teixeira-Duarte MC, Mara Figueira G, Sartoratto A (2005). Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97:305-311.

Tenover FC (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of infection control* 34:S3-10.

Torjussen W, Haug F, Andersen I (1978). Concentration and distribution of heavy metals in nasal mucosa of nickel exposed workers and of controls, studied with atomic absorption spectrometry and with Timm's sulphide silver method. *Acta oto-laryngologica* 86: 449-463.

Torjussen, W, Solberg LA, Hogetveit AC (1979a). Histopathologic Changes of Nasal Mucosa Nickel Workers: A Pilot Study. *Cancer* 44: 963-974.

Torjussen W, Solberg LA, Hogetveit AC (1979b). Histopathological Changes of the Nasal Mucosa in Active and Retired Nickel Workers. *British journal of cancer* 40:568- 579.

Turner GW, Gershenzon J, Croteau B (2000). Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiology* 124:655-663.

Tyihák E, Móricz ÁM, Ott PG (2007). Biodetection and Determination of Biological Activity of Natural Compounds in Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press.

U

Ünver A , Arslan D, Çetýnkaya Z, Özcan MM (2008). Antimycotic Activity of Methanol Extracts of Sage (*Salvia officinalis* L.), Laurel (*Laurus nobilis* L.) and Thyme (*Thymbra spicata* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 11:90-95.

V

Venkatachalam, KV, Kjonas R, Croteau R (1984). Development and essential oil content of secretory glands of sage *Salvia officinalis*. *Plant physiology* 76:148-150.

Vyskocil A, Senft V, Viau C, Cizkova M & Kohout J (1994a). Biochemical renal changes in workers exposed to soluble nickel compounds. *Human & experimental toxicology* 13:257-61.

Vyskocil A, Viau C, Cizkova M (1994b). Chronic nephrotoxicity of soluble nickel in rats. *Human & experimental toxicology* 13:689-93.

W

Walker JB, Sytsma KJ, Treutlein J, Wink M, (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is monophyletic: implications for the systematic, radiation, and ecological specializations of *Salvia*. *American Journal of Botany* 91:1115–1125.

Werker E, Ravid U, Putievsky E (1985). Structure of glandular trichomes and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany* 34:31-45.

Y

Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R., Chen SS (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition* 59:113-122.

Z

Zeybek U, Zeybek N (2002). Farmasötik Botanik. E.Ü. Ecz. Fak. Yayın. No: 3. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, pp.378–382.

Zhang Y, Butelman E, Schlussman S, Ho A, Kreek M (2005). Effects of the plant-derived hallucinogen salvinorin A on basal dopamine levels in the caudate putamen and in a conditioned place aversion assay in mice: agonist actions at kappa opioid receptors. *Psychopharmacology* 179:551–558.

Zhong Z, Troll W, Koenig K, Frenkel K. (1990). Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer research* 50:5764-70.

Zarei A, vaezi G, Malekirad AA, Adbollahi M (2015). hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Salvia hydrogea* in streptozocin- induced diabetes in rats. *Iranian journal of basic medical sciences* 18:417-22.

Zhao Q, Wang W, Cao Y ,Chen Y , Ren A, Ge Y, Yu Z , Wan S, Hu A, Bo Q (2014). Potential health risks of heavy metals in cultivated topsoil and grain including correlations with human primary liver, lung and gastric cancer, in Anhui province, Eastern China. *The Science of the total environment* 470-471:340-7.

Annexes

Annexe 01 : Sensibilité aux antibiotiques de quelques souches bactériennes étudiées

Sensibilité d'*Escherichia coli* aux antibiotiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
Antibiotiques (µg)			
	Kanamycine (30)	Ampicilline (10)	Céfuroxime (125mg/5ml)
<i>Escherichia coli</i>	16	6	25

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
Antibiotiques (µg)		
	Ciprofloxacine (30)	Céfuroxime (125mg/5ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	25

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Sensibilité de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline aux antibiotiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
Antibiotiques (µg)				
	Tobramycine (10)	Clindamycine (2)	Erythromycine (15)	Céfuroxime (125mg/5ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline	17	6	6	6

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Sensibilité de *Pasteurella multocida* aux antibiotiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
Antibiotiques (µg)				
	Streptomycine (10)	Céfotaxime (30)	Amoxicilline	Oxytétracycline
<i>Pasteurella multocida</i>	10	20	6	10

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Sensibilité de *Klebsiella pneumonia* aux antibiotiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
Antibiotiques (µg)				
	Kanamycine (30)	Céfuroxime (125mg/5ml)	Gentamicine (10)	Colistine (10)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	30	6	6	8

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Sensibilité d'*Enterobacter cloacae* aux antibiotiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
Antibiotiques (µg)		
	Amikacine (30)	Céfuroxime (125mg/5ml)
<i>Enterobacter cloacae</i>	20	20

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Sensibilité de *Citrobacter freundii* aux antibiotiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
Antibiotiques (µg)		
	colistine (10)	Céfuroxime (125mg/5ml)
<i>Citrobacter freundii</i>	11	6

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Sensibilité de *Salmonella enterica* aux antibiotiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
Antibiotiques (µg)				
	Ampicilline (10)	Amikacine (30)	Co-trimoxazole (25)	Céfuroxime (125mg/5ml)
<i>Salmonella enterica</i>	6	20	29	20

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Annexe 02 : Sensibilité des souches de levures aux différentes doses d'antifongique

Sensibilité des souches de *Candida albicans* aux antifongiques.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
Doses de l'antifongique		
	Fluconazole (50mg/5ml)	Fluconazole (150mg/50ml)
<i>Candida albicans</i> L1	25	20
<i>Candida albicans</i> L2	10	6
<i>Candida albicans</i> L3	15	6

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

Lexique :

- L1 : C26720
- L2 : C444
- L3 : C10231

Sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* à l'antifongique.

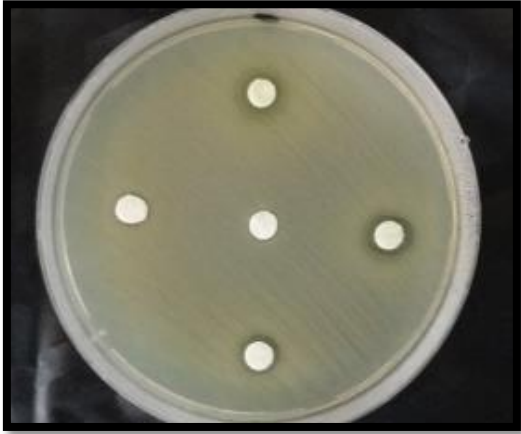
Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
Doses de l'antifongique		
	Fluconazole (50mg/5ml)	Fluconazole (150mg/50ml)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6	6

6 mm correspond à une absence de zone d'inhibition.

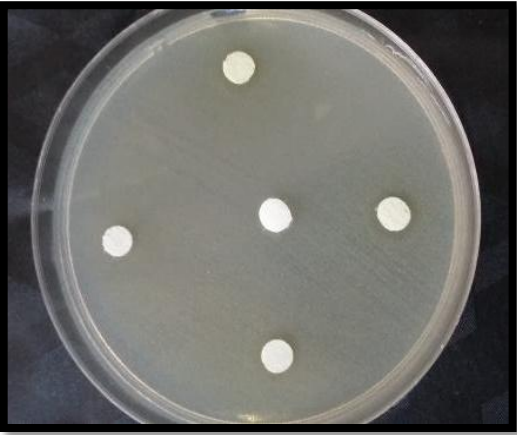
Annexe 03 : Sensibilité de quelques souches bactériennes à l'extrait éthanolique de *Salvia argentea*.



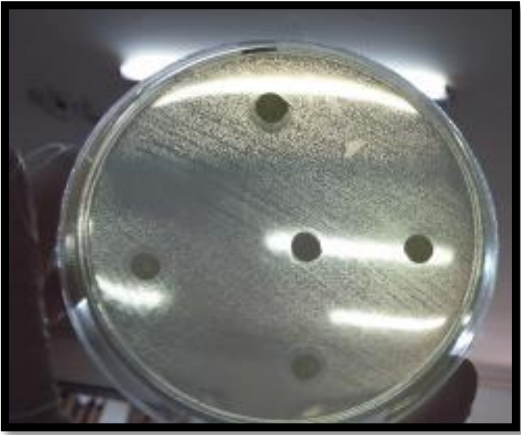
Escherichia coli



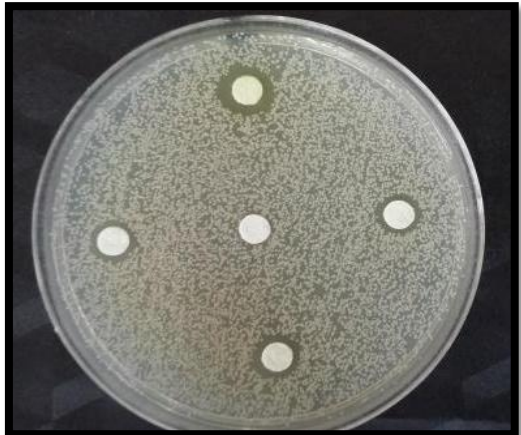
Staphylococcus aureus



Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

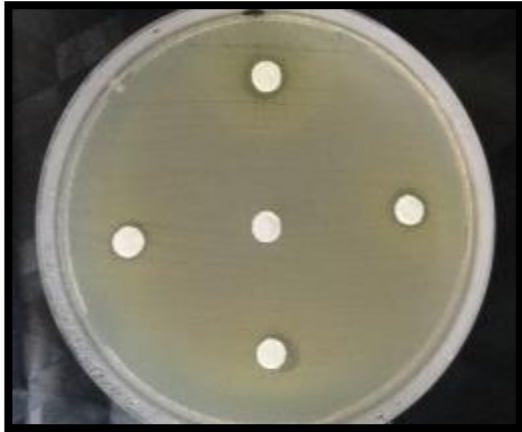


Pasteurella multocida

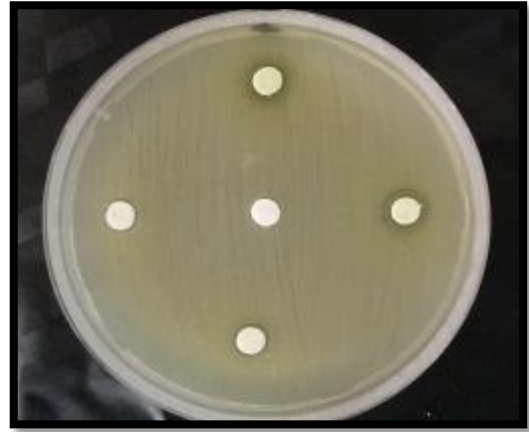


Klebsiella pneumonia

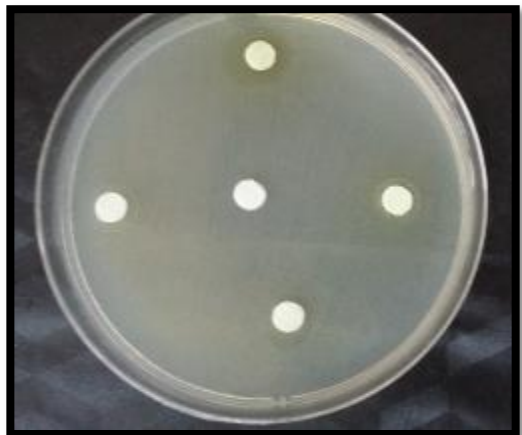
Annexe 04 : Sensibilité de quelques souches bactériennes à l'extrait méthanolique de *Salvia argentea*.



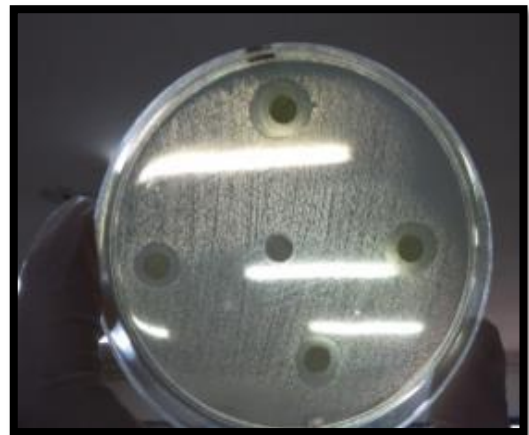
Escherichia coli



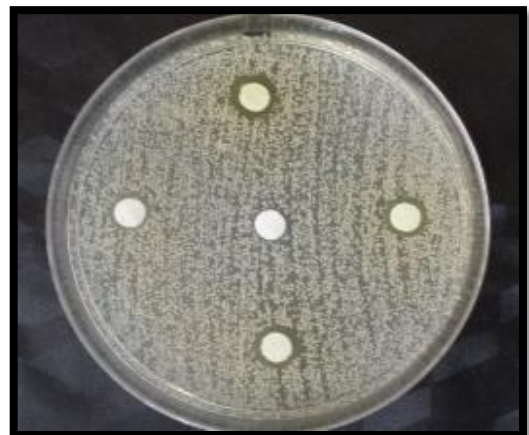
Staphylococcus aureus



Staphylococcus aureus résistant à la méticilline



Pasteurella multocida



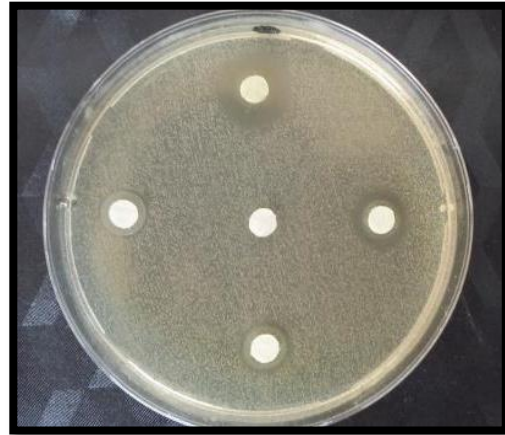
Klebsiella pneumonia

Annexe 05 : Sensibilité des levures aux extraits alcooliques de *Salvia argentea*.

Sensibilité des levures à l'extrait méthanolique de *Salvia argentea*.

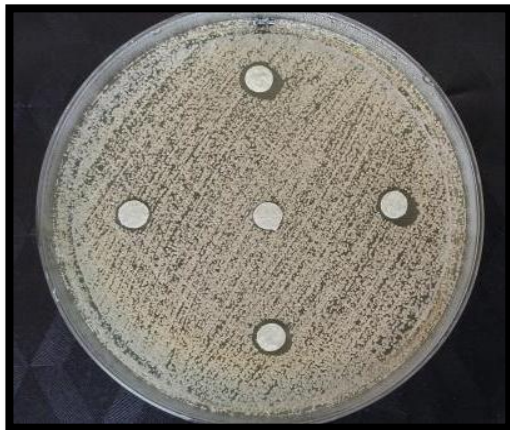


Candida albicans L1

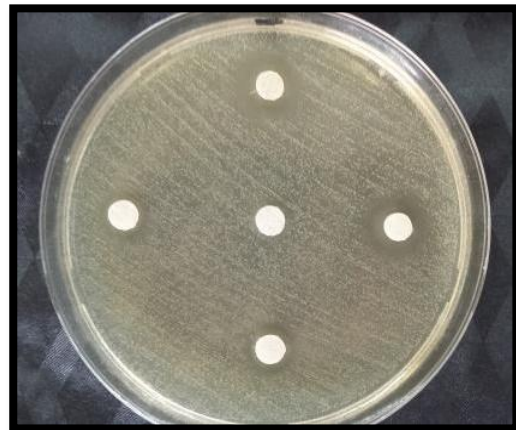


Saccharomyces cerevisiae

Sensibilité des levures à l'extrait éthanolique de *Salvia argentea*.

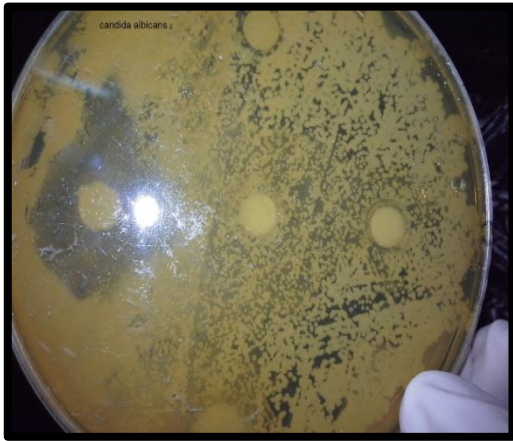


Candida albicans L1



Saccharomyces cerevisiae

Annexe 06 : Sensibilité des souches de levures à l'extrait aqueux de *Salvia argentea*.



Candida albicans L3



Candida albicans L2

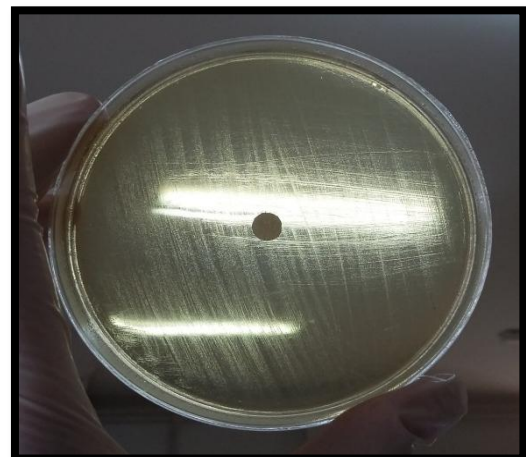


Saccharomyces cerevisiae

Sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* au Fluconazole à (50mg/5ml)



Candida albicans L1




Saccharomyces cerevisiae

Article

Communication

Ethnobotanical Survey, Preliminary Physico-Chemical and Phytochemical Screening of *Salvia argentea* (L.) Used by Herbalists of the Saïda Province in Algeria

Yasmina Benabdesslem ¹, Kadda Hachem ^{1,2,*} , Khaled Kahloula ¹ and Miloud Slimani ¹

¹ Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes (LBPVBP), Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Dr. Tahar Moulay de Saïda, BP 138 cité ENNASR, Saïda 20000, Algeria; benabdesslem.yasmina@univ-saïda.dz (Y.B.); khaled.kahloula@univ-saïda.dz (K.K.); miloud.slimani@univ-saïda.dz (M.S.)

² Laboratoire des Productions, Valorisations Végétales et Microbiennes (LP2VM), Département de Biotechnologies Végétales, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, B.P. 1505, El-Mn'aour, Oran 31000, Algeria

* Correspondence: kadda46@hotmail.com or hachem.kadda@univ-saïda.dz; Tel.: +213-661-780-404

Received: 7 November 2017; Accepted: 1 December 2017; Published: 5 December 2017

Abstract: An ethnobotanical study was carried out in the Saïda region among herbalists to evaluate the use of *Salvia argentea* (L.), a plant species native from North Africa belonging to the Lamiaceae family. Forty-two herbalists were interviewed individually, aged between 30 and 70 years, all males, 52.38% of them having received a secondary education level and having performing their duties for more than a decade. This study showed that *Salvia argentea* is used specifically in the treatment of diseases of the respiratory system. The leaves are the most commonly used part, usually in the form of powder and exclusively administered orally. The preliminary results of the physicochemical characterization and the phytochemical screening of the powdered leaves of *Salvia argentea* attest to their safety and confer them a guarantee of phytotherapeutic quality.

Keywords: *Salvia argentea* (L.); ethnobotanical survey; Saïda province; leaf powder; physico-chemical; phytochemical screening

1. Introduction

The Algerian flora in general and the region of Saïda in particular, benefit from an important reserve of plants with aromatic and medicinal characteristics. Thus, medicinal plants occupy an important place in the Algerian pharmacopoeia. Even today, they play a decisive role in the treatment of certain pathologies. Despite being one of the most impressive reserves of plants throughout the world, only 10% have been studied for their pharmacological properties [1].

The region of Saïda, by its geographical location, offers a rich and diverse vegetation. Many aromatic and medicinal plants grow there spontaneously. Interest in these plants has grown steadily in recent years.

Among these numerous medicinal plants, our study focused on *Salvia argentea* belonging to the Lamiaceae family which is a plant species originating to the Mediterranean region, in northwest Africa (northern Algeria, Morocco, and Tunisia), southern Europe (Spain, Portugal, South Italy, Sicily, Malta, Albania, Bulgaria, Slovenia, Croatia, Bosnia, Kosovo, Montenegro, Serbia, Macedonia, and Greece) and Western Asia (Turkey) [2]. This family is known for its richness in numerous chemical substances capable of demonstrating various remarkable pharmacological activities [3]. Among these substances,

we mention the essential oils which mainly consist of oxygenated sesquiterpenes [2,4] and which are endowed with important biological properties, such as antimicrobial [5,6] and antioxidant activities [7].

The leaves of *Salvia argentea*, also commonly known as “Ferrache en neda”, are heavily covered with a silvery down, hence its name; the leaves are soft. This plant possesses sticky stems and inflorescences. Sterile upper verticillasters consist only of bracts. White-pink flowers possess corollas three times longer than the calyx [8]. This plant differs from *Salvia patula*, by its leaves which are not heart-shaped at the base; by the upper lip of the calyx with less unequal and more distant teeth; and by its connective, more strongly toothed to the point where it widens [9]. The roots of *Salvia argentea* are thick and tuberous, which makes them resistant to heat and drought, but sensitive to humidity during winter [10].

We carried out an ethno botanical survey with herbalists working with medicinal plants. The results of this survey will allow us to identify the potential roles of *Salvia argentea* in the traditional pharmacopoeia and its effects in prophylaxis. The survey was followed by a physico-chemical and phytochemical study to detect the presence of groups of chemical families in a drug preparation based on *Salvia argentea*.

2. Results and Discussion

2.1. Ethno Botanical Survey

The ethno botanical and ethno-pharmacological investigation carried out as part of this work aimed to promote the expertise of herbalists in the Saïda region and to seek out their knowledge and know-how with medicinal plants, particularly *Salvia argentea*.

2.1.1. Frequency of Use of *Salvia argentea* According to Herbalist Profile

This practice remains very important in the Saïda zone as evidenced by the number of herbalists surveyed (42), aged between 30 and 70 years, who practice their trade either in town or in the countryside. Herbalists are male (100%), most of them are married (78.57%) and a majority had received a secondary level education (52.38%) (Figure 1). All herbalists have been working for at least a decade, which sheds light on the accumulated experience and originality of knowledge about the use of *Salvia argentea*. They all have expressed the wish to follow continuous training either nationally or internationally and to develop collaboration with modern medicine through their participation in congresses and seminars.

2.1.2. Type of Collectors of *Salvia argentea*

Interviewed herbalists use several types of collectors (Figure 2): farmers (40.48%), sedentary people (33.33%), nomads (19.05%) and shepherds (7.14%).

2.1.3. Use of *Salvia argentea* and Diseases Treated

All of the herbalists revealed that *Salvia argentea* is used in traditional medicine for therapeutic use, for the treatment of respiratory diseases. In the past, *Salvia argentea* leaves have been used against wounds, probably as a hemostatic [11], but no scientific validation has been reported so far.

2.1.4. Opinion on the Efficacy of *Salvia argentea* in the Treatment of Respiratory Diseases

The opinion of herbalists on the efficacy of *Salvia argentea* against respiratory diseases shows that 92.86% think that the traditional uses of this plant lead to a cure, while 7.14% say that the use of this plant has a relief effect only (Figure 3).

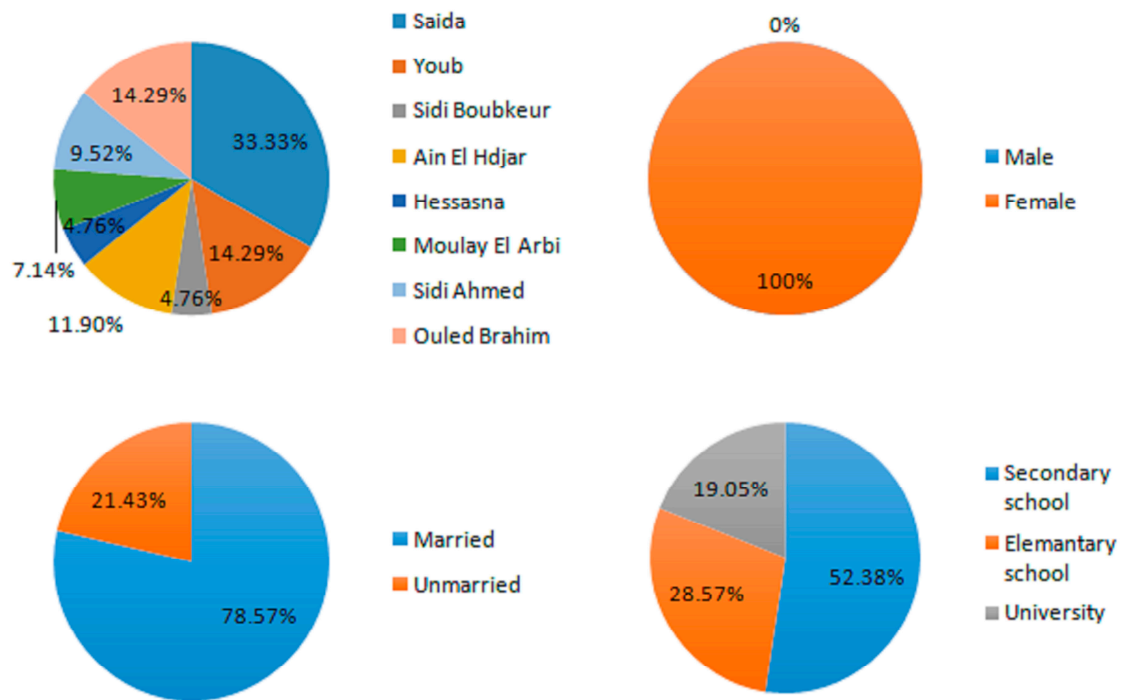


Figure 1. Information on surveyed herbalists.

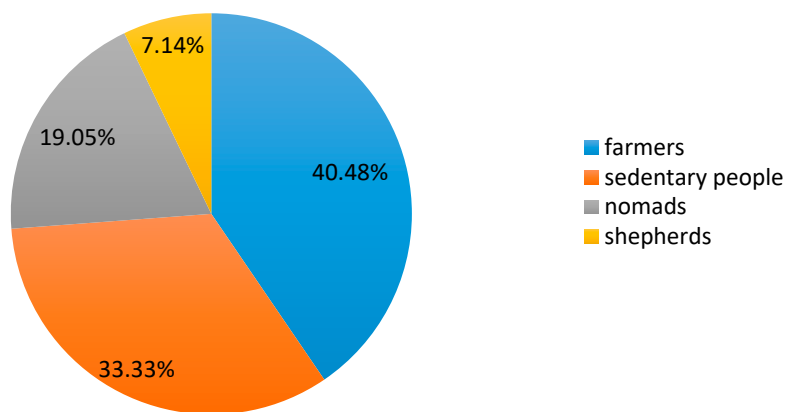


Figure 2. Type of *Salvia argentea* collectors.

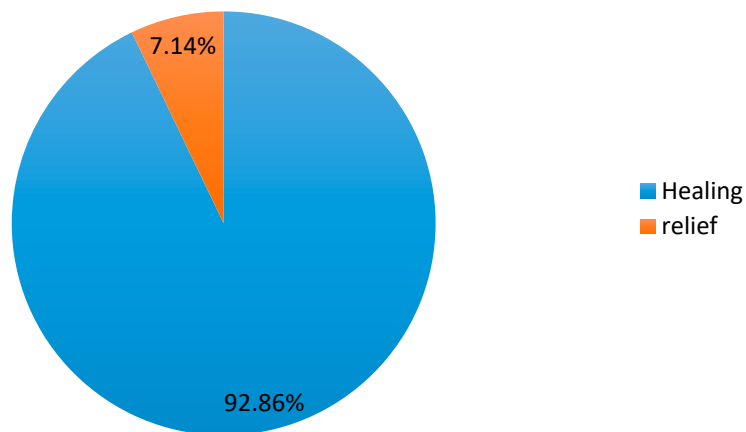


Figure 3. The opinion of herbalists on the efficacy of *Salvia argentea*.

2.1.5. The Part Used

The survey revealed that leaves are most commonly used for respiratory disease treatment with 69.05% (Figure 4), followed by roots (21.43%), and the whole plant (9.52%); however, there was no mention of any use for the inflorescences. This result is close to that established by Rhattas et al. who indicated that mainly the leaves of medicinal plants were used with a percentage of 71.75% [12]. This can be explained by the fact that leaves can be quickly harvested and that they are easy to use [13]; in addition, leaves are the main place of photosynthesis and the site of storage of many bioactive substances responsible for various biological properties [14]. The use of leaves is harmless for the regeneration of the plants and ensures the preservation of floristic richness [15]. Indeed, there is a clear relationship between the part of the plant which is exploited and the consequences of this exploitation on the persistence of this plant species [16].

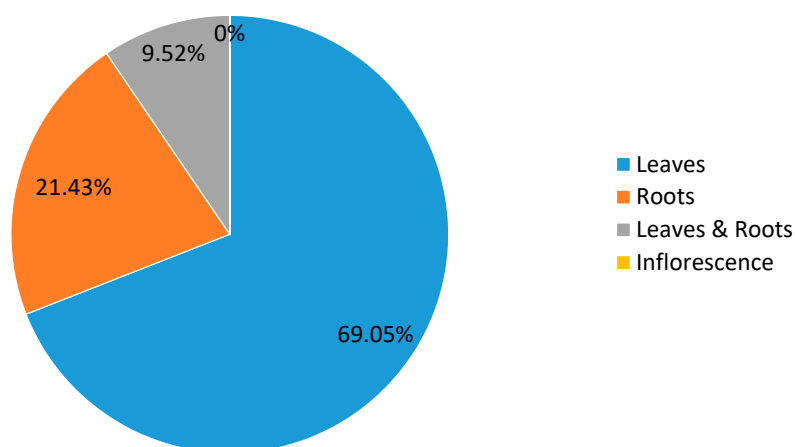


Figure 4. The used part of *Salvia argentea*.

2.1.6. Method of Preparation and Administration

In Saïda, herbalists advocate several ways of preparing *Salvia argentea* for the treatment of respiratory diseases. Powder preparation is the most frequent mode (59.53%), followed by decoction (30.95%) and infusion (9.52%) (Figure 5). All the herbalists (100%) interviewed confirmed that the administration is exclusively oral. The best use of a plant would be that which preserves all its properties while allowing the extraction and assimilation of active compounds [17]. In addition, medicinal plants have side effects when they are incorrectly used by patients [12]. As a result, soft medicine must be practiced with care [18].

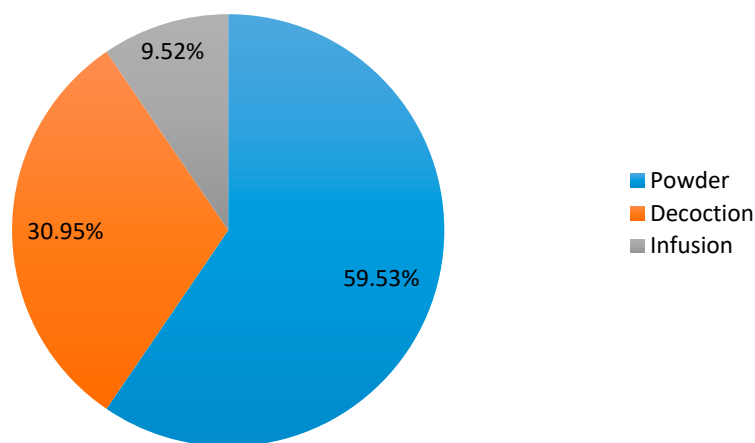


Figure 5. Method of preparation.

2.2. Physicochemical Characterization of the Leaf Powder of *Salvia argentea*

The results related to the physicochemical analyses of the leaf powder of *Salvia argentea* are reported in Table 1.

Table 1. Physicochemical parameters of the leaf powder of *Salvia argentea*.

Parameters	Powder Leaves of <i>Salvia argentea</i>
Humidity (%)	12.89 ± 1.09
Ash (% Dry Basis)	17.61 ± 0.54
pH	8.05 ± 0.07
Titrateable acidity (%)	0.74 ± 0.01

The values obtained for the water content are 12.89% on average. This low content assures that the powder of leaves of *Salvia argentea* can be preserved for a long time without great risk of alterations due to microbial contamination [19].

Total ash is the residue of mineral compounds remaining after incineration of a sample containing organic substances of animal, plant or synthetic origin. Total ash content represents about 17.61% on average of the dry mass. These values are comparable to those found with *Nasturtium officinale* (14.9–17.2%) and *Spinacia oleracea* (18.0–19.1%) [20].

The mean value obtained for the pH is 8.05. This value can be explained by the chlorophyll content of the leaves of *Salvia argentea*, which tends to confer basicity. The values of titrateable acidity in term of lactic acid are also correlated with the pH value determined. Their average value is 0.74%. The same trend was observed by Houndji et al. in the leaf powder of *Moringa oleifera* (Lam.) [21].

2.3. Phytochemical Screening

The results of the phytochemical screening are presented in Table 2. They are classified according to various observation criteria, among others: very positive reaction (++++); positive reaction (+++); moderately positive reaction (++); doubtful reaction (+); and negative reaction (–).

Table 2. Phytochemical screening results of the leaf powder of *Salvia argentea*.

Chemical Groups	Results
Alkaloids	++++
Free flavonoids	–
Anthocyanins	++++
Gallic Tannins	++++
Cathechol tannins	++++
Sterols and Terpenes	+++
Coumarins	++
Saponins	++++
Oses and holosides	+++
Cyanogenetic derivatives	–

The phytochemical screening carried out on the powder of the leaves of *Salvia argentea* shows the presence of chemical groups which possess interesting biological activities. These include alkaloids, anthocyanin flavonoids, saponins, coumarins, sterols and triterpenes, tannins (gallic and catechic acids) and reducing sugars. The complete absence of cyanogenetic derivatives greatly reduces the toxicological risks associated with the use of *Salvia argentea*.

The presence of potentially active chemical groups such as polyphenolic substances such as tannins in their two forms and anthocyanins in the powder of the studied leaves could justify the traditional indications of this plant by herbalists (survey) in traditional medicine, particularly for their pharmacological properties in the treatment of respiratory diseases [22,23]. Similarly, alkaloids

and saponins have been recently reported to be helpful in fighting common pathogenic strains [24]. This plant is therefore a material of choice to enrich the conventional medicine with its interesting biological activities.

3. Materials and Methods

3.1. Biological Material

The *Salvia argentea* samples used in the characterization section were harvested in the Saïda region in 2016, specifically in the Youb region. Plant harvesting was done at the full bloom stage (Figure 6). The identification of the plant was made by Prof. Hasnaoui O., botanist in the Department of Biology of the University of Saïda. A specimen of *Salvia argentea* is deposited in the herbarium of the department of biology of the university.



Figure 6. *Salvia argentea* at the full bloom stage.

3.2. Ethnobotanical Investigation

3.2.1. Study Area

Saïda Province, nicknamed the city of waters because of its numerous springs, is located in the Northwest part of Algeria (34°40'0" N, 0°19'60" E). With a population of 350.765, Saïda covers an area of 5536.73 km² [25]. It is bordered to the north by the Mascara Province, to the south by the El Bayadh Province, to the west by the Sidi-Bel-Abbes Province and to the east by the Tiaret Province (Figure 7). This position gives it a role of relay between the steppe provinces in the south and the Tell provinces in the north; it allows the extension of the biodiversity of the plant species in this province. It contains 16 communes distributed at the level of 6 districts.

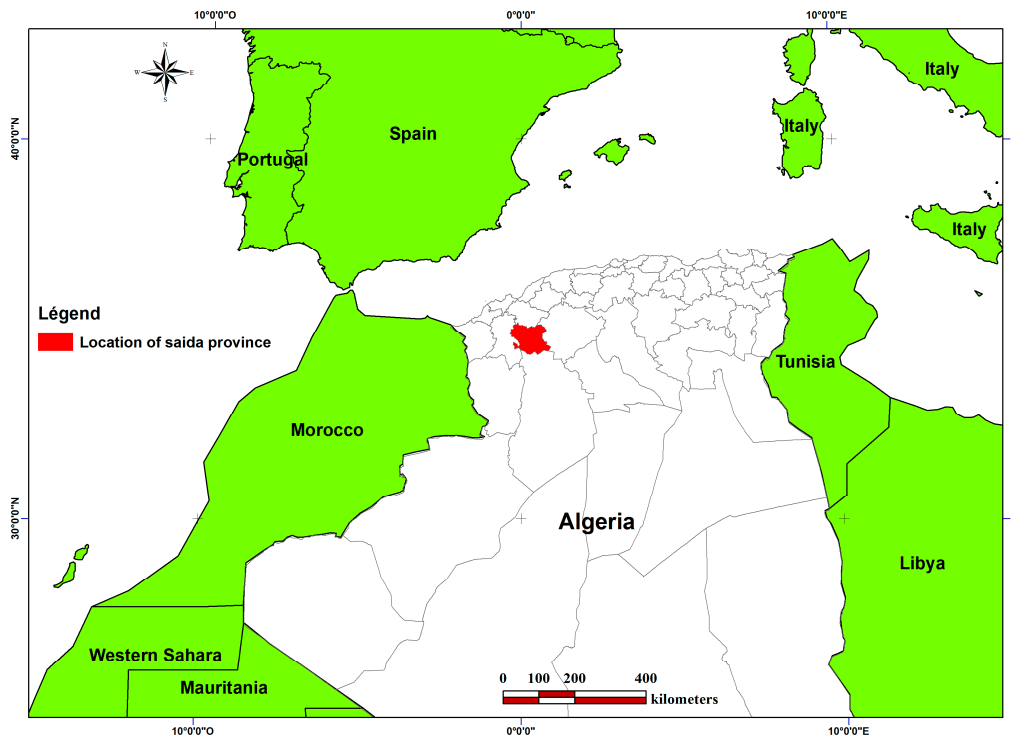


Figure 7. Situation map of Saïda Province.

3.2.2. Methods of Study

The ethnobotanical study was carried out by submitting a questionnaire to 42 herbalists, through 8 communes of the Saïda Province, 14 of them in Saïda, 6 in Youb, 2 in Sidi Boubkeur, 5 in Ain El Hdjar, 2 in Hessasna, 3 in Moulay El Arbi, 4 in Sidi Ahmed and 6 in Ouled Brahim (Figure 8). This disparity reflects the various population densities.

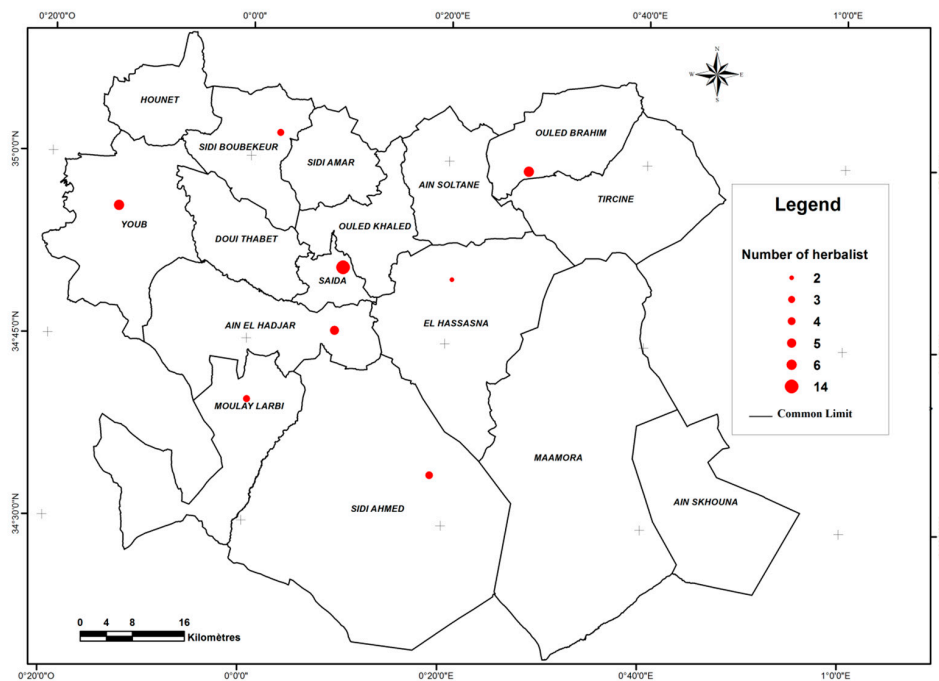


Figure 8. Distribution of survey points in the Saïda Province.

The survey questionnaire form (Appendix A) is divided into 8 parts to evaluate the knowledge of *Salvia argentea* in this area, the use, the prescription and preparation method recommended by each herbalist. All herbalists interviewed were informed about the purpose of this study. The raw data entered on the questionnaire forms were transferred to a database and processed by the Systematic Package for Social Sciences software (SPSS), version 10.

3.3. Characterization of *Salvia argentea* Leaf Powder

At the end of the ethnobotanical study, a preliminary characterization of some physico-chemical parameters (Humidity, ash, pH and titratable acidity) and phytochemical screening considered as basic analyses were carried out on the powder of the leaves of *Salvia argentea*.

3.3.1. Physico-Chemical Analyses

The humidity content of the previously dried and weighed leaf powder was determined by mass difference before and after desiccation in an oven at +103 °C until a constant mass was obtained [26]. The ash rate was evaluated according to the AFNOR standard NF V 05-104 [27], in which test samples are incinerated at 500 °C until a whitish powder was obtained. The pH and the titratable acidity expressed as a percentage of lactic acid were measured on a suspension made of 10 g of leaf powder in 90 mL of distilled water according to the method described by Nout et al. [28].

3.3.2. Phytochemical Screening

It is a qualitative analysis based on color and/or precipitation reactions which makes it possible to establish the presence or absence of certain bioactive chemical compounds in the plant from its powder. Screening helps to look for: alkaloids, tannins (gallic and catechic), flavonoids (free flavonoids and anthocyanins), reducing compound, coumarins, saponins, sterols and tri-terpenes and cyanogenetic derivatives. These tests are carried out in the presence of certain characterization reagents according to the methods described by Harborne and Bruneton [29,30]:

1. Characterization of alkaloids

The presence of alkaloids is established by salt precipitation and revelation with Mayer's reagent (potassium tetra-iodomercury solution). To 10 g of powder are added 50 mL of 10% H₂SO₄. After 24 h maceration at room temperature, the macerated material is filtered and washed with water to obtain 50 mL of filtrate. To 1 mL of filtrate are added 5 drops of Mayer reagent and the mixture is left 15 min at room temperature. The presence of alkaloids is illustrated after a rapid extraction with chlorinated solvent (CHCl₃). A sensible quantity of filtrate is made alkaline by dilution with 50% NH₄OH and the same volume of chlorinated solvent is added. After stirring, the organic phase is removed; the remaining is filtered and then evaporated to dryness. Two milliliters of an acid solution (HCl or H₂SO₄) at 10% are added to the residue obtained and the mixture is poured into two test tubes. Five drops of Mayer's reagent are added to the first tube, the second tube serves as a control. The appearance of a white-yellow or light-yellow precipitate confirms the presence of alkaloids.

2. Characterization of Tannins

The presence of gallic and catechic tannins has been demonstrated using ferric chloride. Five grams of sample powder are added to 100 mL of boiling water. After 15 min, the suspension is filtered and rinsed. This infusion will also serve to characterize the presence of flavonoids. Hydrolysable gallic tannins are evidenced by adding 15 mL of Stiasny reagent to 30 mL of the 5% infusion. After heating in a water bath at 90 °C during 15 min, the mixture is filtered and saturated with 5 g of sodium acetate, and then 1 mL of a solution of 1% FeCl₃ is added. The appearance of a blue-black tint indicates the presence of gallic tannins. The non-hydrolyzable catechin tannins are characterized by the addition of 1 mL of conc. HCl to 5 mL of the previously prepared infusion. The mixture is boiled for 15 min. In the presence of catechin tannins, a red precipitate, insoluble in

isoamyl alcohol, is formed. Catechin tannins are also evidenced after the addition of Stiasny's reagent by the formation of a precipitate.

3. Characterization of flavonoids

The reaction with cyanidine reveals the presence of free flavonoids. To 5 mL of the former 5% infusion, are added 5 mL of a mixture of ethanol and concentrated HCl (50:50, *v/v* %), followed by 1 mL of isoamyl alcohol and a few magnesium chips; the appearance of a pink-orange or purplish pink color reveals the presence of free flavonoids. Anthocyanins are revealed by mixing 5 mL of the infusion with either 5 mL of 10% H₂SO₄ or 5 mL of 50% NH₄OH. If the color of the infusion is accentuated by acidification and then turns blue in alkaline medium, we can conclude to the presence of anthocyanins.

4. Characterization of saponins

A decoction at 1% is prepared by adding 1 g of powder to 100 mL of boiling water; a slight boiling is maintained for 15 min and then the suspension is filtered. Between 1 and 10 mL of filtrate are added successively to 10 test tubes, the volumes are made up to 10 mL with water. The contents of each tube are shaken during 15 s. The height of the resulting foam is measured 15 min after stirring. The growth index is calculated from the tube number (N) in which the foam height is 1 cm. $Im = 1000/N$.

5. Characterization of reducing compounds

Several reducing compounds can be detected, by preparing a 10% aqueous decoction from 10 g of plant material powder in 100 mL of water for 15 min. After evaporation to dryness of 5 mL of this 10% decoction, 3 drops of concentrated H₂SO₄ are added followed by 4 drops of a saturated solution of thymol in ethanol. The appearance of a red solution reveals the presence of oses and holosides. Cyanogenic glycosides are often found in plants. They are evidenced by carrying out a suspension of 1 g of plant powder in 5 mL of a solution of the same volume of water and toluene. A filter paper strip soaked with Guignard's reagent (2 g of picric acid and 20 g of sodium carbonate in 200 mL of distilled water) is then deposited in the tube. The appearance of a red color indicates the presence of cyanogenic glycosides.

6. Characterization of sterols and triterpenes

The presence of sterols and triterpenes is demonstrated using concentrated H₂SO₄. An extract is first made from maceration for 24 h of 1 g of sample powder in 20 mL of ether. The extract obtained is also used for the characterization of coumarins. Sterols and triterpenes are evidenced by adding 1 mL of CHCl₃ to the 10 mL residue of the evaporated macerate. The solution obtained is divided into two test tubes, then 1–2 mL of concentrated H₂SO₄ are added to the bottom of one of the tubes, the second one serves as a control. The formation of a brownish or purple red ring at the interface reveals their presence.

7. Characterization of coumarins

The presence of coumarins is achieved by evaporating to dryness 5 mL of an ethereal extract. Two milliliters of hot water are added and then 1 mL of 25% NH₄OH. The mixture is illuminated with UV light at 366 nm. An intense blue fluorescence indicates the presence of coumarins.

4. Conclusions

Salvia argentea has great potential in Algeria for the treatment of respiratory diseases. Many perspectives and expectations emerge from this study, in both the scientific and the public health domains. Thus, the continuity of this study should allow by *in vitro* and *in vivo* pharmacological approaches assessing the therapeutic efficacy attributed to *Salvia argentea* and to help clarify the cellular and subcellular mechanisms involved in the anti-inflammatory effects. Further studies would focus on the secondary metabolites and bioactive substances with the help of methods of extraction and fine

characterization and should contribute to a better knowledge of the medicinal flora of the traditional Algerian pharmacopoeia.

Acknowledgments: This study is part of a doctoral research. We would like to thank all herbalists in the Saïda Province that kindly participated in our survey and agreed to provide us with information about their careers and profiles. We would also like to thank K. Nabi and A. Baghdadi for their contributions to this study and Michel Guilloton for help in manuscript editing.

Author Contributions: Y.B., K.H. and K.K. conceived and designed the experiments; Y.B. and K.H. performed the experiments; Y.B., K.H. and K.K. analyzed the data; M.S. contributed reagents/materials/analysis tools; and Y.B. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

- 1- Link: Saida, Youb, SidiBoubkeur, Hessassna, OuledBrahim, Sidi Ahmed, Moulay El Arbi, Ain El-Hadjar.
- 2- Informant: Age, Sex, Family situation, Academic level, Type of collector, Origin of information.
- 3- Use of the plant: Therapeutic, Cosmetic, Others.
- 4- Type of diseases treated: Dermatological, Respiratory, Cardiovascular, Genito-urinary, Osteo-articular, Metabolic, Digestive tract, Neurological, Others.
- 5- Used part: Leaves, Stem, Flowers, Fruits, Root, Whole plant, Others
- 6- Preparation: Powder, Infusion, Decoction, Pultice, Maceration, Cooked, Others.
- 7- Method of administration: Oral, Massage, Rinsing, Painting, Others.
- 8- Result: Healing, Improvement or Ineffective.

References

1. Hamburger, M.; Hostettman, K. *Bioactivity in Plants: The Link between Phytochemistry and Medicine*; Masson: Paris, France, 1991.
2. Riccobono, L.; Maggio, A.; Rosselli, S.; Ilardi, V.; Senatore, F.; Bruno, M. Chemical composition of volatile and fixed oils from of *Salvia argentea* L. (Lamiaceae) growing wild in Sicily. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 25–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Begnis, C. Etude des Propriétés Pharmacologiques et Des Principes Actifs Des Lamiaceae, à L'exception Des Huiles Essentielles. Ph.D. Thesis, University of Montpellier, Montpellier, France, 1995.
4. Rayouf, M.B.T.; Msaada, K.; Hosni, K.; Marzouk, B. Essential Oil Constituents of *Salvia argentea* L. from Tunisia: Phenological Variations. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* **2013**, *7*, 40–44.
5. Salah, K.B.H.; Mahjoub, M.A.; Ammar, S. Antimicrobial and antioxidant activities of the methanolic extracts of three *Salvia* species from Tunisia. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 1110–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fu, Z.; Wang, H.; Hu, X.; Sun, Z.; Han, C. The Pharmacological Properties of *Salvia* Essential Oils. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, *3*, 122–127.
7. Farhat, M.B.; Landoulsi, A.; Chaouch-Hamada, R.; Sotomayor, J.A.; Jordán, M.J. Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *47*, 106–112. [[CrossRef](#)]
8. Quezel, P.; Santa, S. *Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*; CNRS: Paris, France, 1963. (In French)
9. Battandier, J.A.; Trabut, M. *Flore de l'Algérie*; ADOLPHE JORDAN: Paris, France, 1888. (In French)
10. Mossi, A.J.; Cansian, R.L.; Paroul, N.; Toniazzo, G.; Oliveira, J.V.; Pierozan, M.K.; Pauletti, G.; Rota, L.; Santos, A.C.A.; Serafini, L.A. Morphological characterization and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp. (Lamiaceae). *Braz. J. Biol.* **2011**, *71*, 121–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Baran, P.; Özdemir, C.; Aktas, K. Structural investigation of the glandular trichomes of *Salvia argentea*. *Biologia* **2010**, *65*, 33–38. [[CrossRef](#)]
12. Rhattas, M.; Douira, A.; Zidane, L. Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). *J. Appl. Biosci.* **2016**, *97*, 9187–9211. (In French) [[CrossRef](#)]

13. Doukkali, Z.; Boudida, H.; Srifi, A.; Taghzouti, K.; Cherrah, Y.; Alaoui, K. Les plantes anxiolytiques au Maroc. Études ethnobotanique et ethno-pharmacologique. *Phytothérapie* **2015**, *13*, 306–313. (In French) [[CrossRef](#)]
14. Bigendako-Polygenis, M.J.; Lejoly, J. *La Pharmacopée Traditionnelle au Burundi. Pesticides et Médicaments en Santé Animale*; Press University Namur: Namur, Belgium, 1990; pp. 425–442. (In French)
15. Poffenberger, M.; McGean, B.; Khare, S.; Campbell, J. *Field Method Manual—Community Forest Economy and Use Pattern: Participatory Rural Appraisal (PRA) Methods in South Gujarat, India*; Society for Promotion of Wastelands Development: New Delhi, India, 1992; Volume 2.
16. Cunningham, A.B. *Peuples, Parc et Plantes: Recommandations Pour Les Zones à Usages Multiples et Les Alternatives de Développement Autour du Parc Naturel de Bwindi Impénétrable, Ouganda*; Documents de travail Peuples et Plantes n° 4; UNESCO: Paris, France, 1996; p. 66.
17. Dextreit, R. *La Cure Végétale, Toutes Les Plantes Pour se Guérir, Vivre en Harmonie*, 3rd ed.; Editions de la Revue Vivre en Harmonie: Paris, France, 1984; p. 184. (In French)
18. Benlamdini, N.; Elhafian, M.; Rochdi, A.; Zidane, L. Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haute Moulouya, Maroc. *J. Appl. Biosci.* **2014**, *78*, 6771–6787. (In French) [[CrossRef](#)]
19. Mafart, P. *Génie Industriel et Alimentaire, Procédés Physiques de Conservation*, 2nd ed.; Lavoisier: Paris, France, 1996. (In French)
20. Analyses Physicochimiques I. Available online: <http://dhaouadiramzi.e-monsite.com/medias/files/analysephysico-chimie.pdf> (accessed on 18 August 2017). (In French)
21. Houndji, B.V.S.; Ouetchehou, R.; Londji, S.B.M.; Eamouzou, K.S.S.; Yehouenou, B.; Ahohuendo, C.B. Caractérisations microbiologiques et physico-chimiques de la poudre de feuilles de *Moringa oleifera* (Lam.), un légume feuille traditionnel au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **2013**, *7*, 75–85. (In French) [[CrossRef](#)]
22. Bouchet, N.; Lévesque, J.; Pousset, J.-L. HPLC isolation, identification and quantification of tannins from *Guiera senegalensis*. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 52–56. [[CrossRef](#)]
23. Andersen, Q.M.; Markham, K.R. *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry, and Applications*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006.
24. Kubmarawa, D.; Ajoku, G.A.; Enworem, N.M.; Okorie, D.A. Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of 50 medicinal plants from Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* **2007**, *6*, 1690–1696.
25. Rubrique Monographie Wilaya—Aniref.dz. Available online: <http://www.aniref.dz/monographies/saida.pdf> (accessed on 18 August 2017). (In French)
26. Multon, J.L.; Bizot, H.; Martin, G. Eau (teneur, activité, absorption, propriétés fonctionnelles). Humidités relatives. In *Techniques D'analyse et de Contrôle Dans les Industries Agro-Alimentaires*; Deymie, B., Multon, J.L., Simon, D., Eds.; Lavoisier-Tec et Doc: Paris, France, 1981; Volume IV. (In French)
27. AFNOR. *Produits Dérivés Des Fruits et Légumes Jus de Fruits*; Lavoisier-Tec et Doc: Paris, France, 1986; pp. 36–41. (In French)
28. Nout, M.J.R.; Rombouts, F.M.; Havelear, A. Effect accelerated natural lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **1989**, *8*, 351–361. [[CrossRef](#)]
29. Harborne, A.J. *Phytochemical Methods a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 3rd ed.; Springer: London, UK, 1998.
30. Bruneton, J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plante Médicinales*, 4th ed.; Lavoisier: Paris, France, 2009. (In French)

