

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE -BLIDA-1



Département de Biologie des Populations et des Organismes

MEMOIRE

De fin d'études en vue de l'obtention du

Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Option : Génomique et Biotechnologie végétales

Thème

Evaluation de quelques activités biologiques des extraits de (*Vitex agnus castus* L.) de la région d'Adrar.

Réalisé par : **ARIBI Nouredine**

Soutenu le : **02.11.2017**

Devant les membres de jury :

M ^{me} ZERKAOUI A.	MAA U.S.D.B.	Présidente
M ^{me} AMEDJKOUH H.	MAA U.S.D.B.	Examinatrice
M ^{me} MOHAMED OUALI D.	MAA U.M.M.T.O.	Promotrice
M ^{me} CHEBATA N.	MAA U.S.D.B.	Co-promotrice

Année Universitaire 2016 -2017

Remerciements

Avant tout je remercie Dieu tout puissant, de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens pour la réalisation de ce travail.

*Je tiens tout particulièrement à témoigner ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à ma promotrice M^{me} **MOHAMED OUALI D.**, et ma Co-promotrice M^{me} **CHEBATA N.**, d'avoir accepté de m'encadrer sur le thème, de m'avoir conseillé judicieusement, orienté, encouragé et de m'apporter une attention.*

Mes remerciements vont aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

** M^{me} **ZERKAOUI A.**, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.*

** M^{me} **AMEDJKOUH H.**, qui a bien voulu examiner ce travail.*

*Je profite pour remercier **Mr TEFFAHI D.**, l'ingénieur du laboratoire d'hygiène de Blida et M^{me} **NAKKAB S.**, leur esprit scientifique, aide, et soutien, Durant la réalisation des tests antimicrobienne.*

Tous mes remerciements vont ensuite à l'ensemble du personnel des départements de physicochimie de microbiologie et de pharmacotoxicologie du Complexe SAIDAL Antibiotical Médéa.

*Un grand merci à M^{me} **BEN ZEHRA S.**, l'ingénieur du laboratoire biotechnologie végétale, Mes vifs remerciements s'adressent à l'ingénieur du laboratoire des fins d'étude (PFE).*

Un grand merci à tout le personnel du laboratoire des zones arides de la faculté de biologie de l'université du Bab Ezzouoir .

A tout ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Résumé

Cette étude rentre dans la thématique de l'axe de recherche sur la biodiversité floristique algérienne et plus particulièrement des plantes aromatiques et médicinales au niveau du laboratoire de recherche sur les zones arides de l'Université de Bab Ezzouar. Nous avons entrepris entre autre dans ce volet une étude biologique consistant en une contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L, espèce résistante à la sécheresse, introduites dans les zones arides du Sahara Algérien pour un développement rural durable en Algérie.

Le screening phytochimique effectué sur les feuilles et les racines a permis de mettre en évidence diverses classes de métabolites secondaires : les flavonoïdes, les anthocyanes, les alcaloïdes, les tanins les mucilages. Cependant, les glucosides sont absents au niveau des racines mais présents au niveau des feuilles. Les saponines se sont avérées absentes dans les deux organes végétatifs analysés.

Les teneurs en anthocyanes sont quasiment identiques dans les racines et les feuilles, elles sont respectivement de l'ordre de $6,17 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.121 \text{ MVS}$ et $6,33 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.71 \text{ MVS}$. Ces valeurs restent très importantes comparées à celles des aglycones flavoniques dans les deux cas. Néanmoins, ces derniers sont plus importants dans les feuilles, avec une valeur moyenne de l'ordre de $0.96 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.076 \text{ MVS}$. Ce sont les flavones qui sont les plus importantes par rapport au flavonols dans les feuilles avec une teneur moyenne de l'ordre de $0.99 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.16 \text{ MVS}$. Cependant, les racines présentent des teneurs quasiment identiques en ces composés, avec respectivement des valeurs moyennes de l'ordre de $0.13 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0.020 \text{ MVS}$ et $0.12 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0.011 \text{ MVS}$.

Le dosage des alcaloïdes a montré que ce sont les feuilles qui sont les plus riches que les racines, avec une valeur moyenne de l'ordre de $0,001485 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0,000120 \text{ MVS}$.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire a révélé l'extrait d'aglycones flavoniques des feuilles représentent le pourcentage de réduction d'œdème le plus élevé 59.04% , par rapport à celui du produit de référence, qui est de 27.73% , Le pourcentage de réduction le plus faible est marqué par le macérât de racines 25.9 %.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien, a montré que toutes les souches bactériennes testées, se sont révélées résistantes vis-à-vis des deux extraits d'aglycones flavoniques et le macérât de *Vitex agnus castus* L. sauf *Staphylococcus aureus*, qui est très sensible à le macérât des racines avec une zone d'inhibition de 21mm et, moyennement sensible à le macérât des feuilles, avec une zone d'inhibition de 18 mm. Pour ce qui est de la souche fongique, *Candida albicans*, s'est montrée sensible vis-à-vis de des extraits flavoniques des racines et feuilles aux deux concentrations de 12.5 mg ml^{-1} et 25 mg ml^{-1} . À la plus faible concentration (0.58 mg ml^{-1}), les extraits flavoniques de feuilles et racines présentent une meilleure activité anti-oxydante, avec respectivement un pourcentage d'inhibition de l'ordre de $49,77 \% \pm 5,77$; $48,52\% \pm 1,54$ Au-delà de cette concentration (1.76 mg ml^{-1}), l'activité anti-oxydante des composés flavoniques des feuilles et racines ainsi que celle de l'acide ascorbique reste constante, avec des pourcentages d'inhibitions respectivement de l'ordre de $73.72\% \pm 3,3$; $83.60 \% \pm 1,24$ et $91.53\% \pm 0,8$.

Mots clés : Développement durable, zones arides, *Vitex agnus castus* L, flavonoïdes, alcaloïdes, activité anti-oxydante et antimicrobienne.

Abstract

This study is part of the theme of the research axis on the Algerian floristic biodiversity and more particularly the aromatic and medicinal plants at the level of the research laboratory on the arid zones of the University of Bab Ezzouar. Among other things, we undertook in this section a biological study consisting of a contribution to the study of some biological activities of extracts of leaves and roots of *Vitex agnus castus* L, a drought-resistant species, introduced in the arid zones of the Algerian Sahara. Sustainable rural development in Algeria.

Phytochemical screening carried out on leaves and roots revealed various classes of secondary metabolites: flavonoids, anthocyanins, alkaloids, tannins and mucilages. However, glucosides are absent in the roots but present in the leaves. Saponins were absent in both vegetative organs analyzed.

Anthocyanin levels are almost identical in the roots and leaves; they are respectively of the order of 6, 17 mg g⁻¹ ± 0.121 DVM and 6.33 mg g⁻¹ ± 0.71 DVM. These values remain very important compared to those of the flavonic aglycones in both cases. Nevertheless, the latter are more important in the leaves, with an average value of the order of 0.96mg g⁻¹ ± 0.076 DVM.

These are the flavones that are the most important compared to flavonols in the leaves with an average content of the order of 0.99 mg g⁻¹ ± 0.16 DVM. However, the roots have almost identical levels in these compounds, with average values of the order of 0.13 mg.g⁻¹ ± 0.020 DVM and 0.12mg.g⁻¹ ± 0.011 DVM respectively.

The determination of the alkaloids has shown that it is the leaves which are the richest that the roots, with an average value of the order of 0.001485 mg.g⁻¹ ± 0.000120 DVM.

The study of anti-inflammatory activity revealed the flavonite aglycone extract of the leaves represent the highest percentage of edema reduction 59.04%, compared to that of the reference product, which is 27.73%, The lowest percentage reduction is marked by root macerate 25.9%.

The evaluation of antimicrobial potency showed that all bacterial strains tested were resistant to both flavonal aglycone extracts and *Vitex agnus castus* L. macerate except for *Staphylococcus aureus*, which is very sensitive to root macerate with an inhibition zone of 21 mm and moderately susceptible to leaf macerate, with an inhibition zone of 18 mm. For the fungal strain, *Candida albicans* was sensitive to flavonoid extracts of roots and leaves at both concentrations of 12.5 mg ml⁻¹ and 25 mg ml⁻¹.

At the lowest concentration (0.58 mg ml⁻¹), the flavonic extracts of leaves and roots have a better antioxidant activity, with a percentage inhibition of the order of 49.77% ± 5.77; 48.52% ± 1.54 Beyond this concentration (1.76 mg ml⁻¹), the antioxidant activity of the flavonic compounds of leaves and roots as well as that of ascorbic acid remains constant, with percentages of inhibitions respectively of the order of 73.72% ± 3.3; 83.60% ± 1.24 and 91.53% ± 0.8.

Key words: Sustainable development, arid zones, *Vitex agnus castus* L, flavonoids, alkaloids, activity antioxidant and antimicrobial.

ملخص

هذه الدراسة هي جزء من موضوع البحث في التنوع البيولوجي للنباتات الجزائرية و خاصة النباتات العطرية والطبية، أجريت هذه الدراسة على مستوى مختبر الأبحاث بجامعة باب الزوار المتخصص في دراسة المناطق الجافة.

أجرينا في هذا القسم دراسة بيولوجية تتألف من دراسة بعض الأنشطة البيولوجية لمقتطفات من أوراق وجذور *Vitex agnus castus L*، وهي أنواع مقاومة للجفاف، أدخلت في المناطق الجافة في الصحراء الجزائرية من أجل تنمية مستدامة في الجزائر.

كشف الفحص الكيميائي النباتي الذي أجري على الأوراق والجذور عن أصناف مختلفة من الأيضات الثانوية: flavonoïdes و anthocyanes و alcaloïdes و tanins و mucilages بينما glucosides غائب في الجذور ولكن موجود في الأوراق. Les saponines غائبين في كل من الأعضاء النباتية التي تم تحليلها.

مستويات anthocyane متطابقة تقريبا في الجذور والأوراق، فهي على التوالي من الترتيب 17، 0.121 ± 6 ملغ/غ م ن ج و 0.71 ± 6.33 ملغ/غ م ن ج. هذه القيم مهمة جدا بالمقارنة مع تلك من aglycone flavonique في كلتا الحالتين. ومع ذلك، فإن هذه الأخيرة هي أكثر أهمية في الأوراق، مع قيمة متوسطة 0.076 ± 0.96 ملغ/غ م ن ج .

flavone هي الأكثر أهمية بالمقارنة مع flavonol في الأوراق مع محتوى متوسط لترتيب 0.16 ± 0.99 ملغ/غ م ن ج. فيما يخص الجذور فإن لها مستويات متطابقة تقريبا من هذه المركبات، مع قيم متوسطة 0.020 ± 0.13 ملغ/غ م ن ج و 0.12 ± 0.011 ملغ/غ م ن ج على التوالي.

وقد تبين من تحديد alcaloïdes أن الأوراق هي التي أغنى من الجذور، مع متوسط قيمة لترتيب 0.000120 ± 0.001485 ملغ/غ م ن ج.

كشفت دراسة النشاط المضاد للالتهابات أن مستخلص aglycone flavonique من الأوراق يمثل أعلى نسبة تخفيض للالتهاب ب 59.04٪، مقارنة مع أن المنتج المرجعي ب 27.73٪. بينما أقل نسبة تخفيض فسجلت من قبل macérât الجذور ب 25.9٪.

أظهر تقييم فاعلية مضادات الميكروبات أن جميع السلالات الجرثومية التي تم اختبارها كانت مقاومة لكل من مستخلصات aglycone flavonique و macérât من *Vitex agnus castus L*. باستثناء المكورات العنقودية الذهبية ، *Staphylococcus aureus* التي تكون حساسة جدا ل macérât الجذور مع منطقة تثبيط 21 ملم ومتوسطة الحساسية بالنسبة ل macérât الاوراق مع منطقة تثبيط 18 ملم.

السلالة الفطرية *candida albicans* حساسة لمستخلصات aglycone flavonique من الجذور والأوراق في كل من التركيزات 12.5 ملغ/مل و 25 ملغ/مل.

في أقل تركيز (0.58 ملغ/مل)، مستخلصات aglycone flavonique من الأوراق والجذور لها نشاط أفضل مضادات الأكسدة، مع نسبة تثبيط 49.77 ± 5.77 ؛ 48.52 ± 1.54 .

بعد هذا التركيز (1.76 ملغ/مل) يبقى النشاط المضاد للأكسدة للمركبات الفلافونية للأوراق والجذور وكذلك حمض الأسكوربيك ثابتا، مع النسب المئوية للمثبطات على التوالي من الترتيب 73.72 ± 3.3 ؛ 83.60 ± 1.24 و 91.53 ± 0.8 .

الكلمات المفتاحية : تنمية مستدامة، المناطق الجافة، *Vitex agnus castus L*، flavonoïdes، alcaloïdes، النشاط المضاد للأكسدة ومضادات الميكروبات.



Sommaire

Sommaire

Introduction.....	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. <i>Vitex agnus castus</i> L	03
1.1. Description botanique	03
1.2. Les noms communs / Synonymes.....	03
1.3. Classification Botanique	05
1.4. Répartition géographique	05
1.5. Les constituants chimiques de <i>Vitex agnus castus</i> .L.....	06
1.6. Propriétés et utilisation	06
2. Métabolite secondaire	07
2.1. Les polyphéols.....	07
2.1.1. Définition.....	07
2.1.2. Biosynthèse des polyphénols	07
2.1.3. Classification	07
2.1.3.1. Les flavonoïdes	08
2.1.3.1.1. Définition	08
2.1.3.1.2. Structure	08
2.1.3.1.3. Biosynthèse	09
2.1.3.1.4. Classification	10
2.1.3.1.5. Localisation et distribution	10
2.1.4. Propriétés biologiques et intérêt des polyphénols	11
2.2. Les alcaloïdes.....	12
2.2.1. Définition.....	12
2.2.2. Structure des alcaloïdes.....	12
2.2.3. Classification.....	12
2.2.4. Localisation.....	12
2.2.5. Propriétés.....	13
3. les activités étudiées.....	13
3.1. L'activité anti –inflammatoire.....	13
3.1.1. Définition de l'inflammation.....	13
3.1.2. Les anti-inflammatoires.....	13
3.2. L'activité antimicrobienne.....	14
3.3. Activité antioxydant.....	14

3.3.1. Les radicaux libres.....	14
3.3.1. Les antioxydants.....	15
3.3.2. Sources d'antioxydants.....	15
3.3.2.1. Source endogène.....	15
3.3.2.2. Source exogène.....	15

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel.....	17
1.1 Matériel végétal.....	17
1.2. Matériel animal.....	17
1.3. Les souches microbactériennes	18
2. Méthodes	19
2.1. Screening phytochimique	19
2.2. Préparation de l'extrait aqueux	20
2.3. Extraction des flavonoïdes	20
2.3.1. Extraction des aglycones flavoniques et des anthocyanes	20
2.3.2. Dosage des anthocyanes	22
2.3.3. Dosage des aglycones flavoniques	22
2.4. Extraction des alcaloïdes.....	23
2.5. Les activités biologiques.....	25
2.5.1. L'activité anti-inflammatoire	25
2.5.2. L'activité antimicrobienne.....	26
2.5.3. L'activité anti-oxydante.....	27
2.6. L'étude statistique	29

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Screening phytochimique	30
2. Dosage des anthocyanes et des aglycones flavoniques	31
3. La teneur en alcaloïdes totaux.....	33
4. l'activité anti-inflammatoire	34

4.1. Pourcentage de l'œdème	34
4.2. Réduction d'œdème	35
5. L'activité antimicrobienne.....	36
6. L'activité anti-oxydante.	39
Conclusion.....	41
Référence bibliographique	
Annexe	

LISTE DES ABREVIATIONS

AINS : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AIS : Les anti-inflammatoires stéroïdiens.

APG III : Angiosperm Phylogeny Group III.

ATCC : American Type Culture Collection.

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

DO : Densité Optique.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil.

FeCl₃: Chlorure de fer

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HCl : Acide chlorhydrique

IC₅₀ : concentration inhibitrice de 50%.

MVS : Matière Végétale Sèche.

UV : Ultraviolet.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Aspect morphologique de <i>Vitex agnus castus</i> L.....	04
Figure 2 : structure de base des flavonoïdes.....	08
Figure 3 : Biosynthèse des flavonoïdes	09
Figure 4 : Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes.....	10
Figure 5 : Localisation de la zone de l'échantillonnage.....	18
Figure 6 : Protocole d'extraction de flavoniques.....	21
Figure 7 : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux.....	24
Figure 8 : Teneurs moyennes en Anthocyane et en Aglycone flavonique des feuilles et racines de <i>Vitex agnus castus</i> .L exprimés en mg.g ⁻¹ MVS.....	32
Figure 9 : Teneur moyenne en Aglycone flavonique des feuilles et racines de <i>Vites Agnus Castus</i> .L exprimé en mg.g ⁻¹ MVS.....	32
Figure 10 : Teneur moyenne en alcaloïdes totaux des feuilles et racines de <i>Vites AgnusCastus</i> .L exprimé en mg.g ⁻¹ MVS.....	33
Figure 11 : Le pourcentage d'augmentation d'œdème.....	34
Figure 12 : Le pourcentage de réduction d'œdème.....	35
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extraits d'aglycones flavoniques des feuilles et racines et acide ascorbique.....	39
Figure 14 : Décantation.....	Annexe II
Figure 15 : Spectrophotomètre de type « JENWAY 6305 UV / VIS».....	Annexe II
Figure 16 : Rotavapor de type BÜCHI.....	Annexe II
Figure 17 : Résultats du test antimicrobien.....	AnnexeIV

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques.....	11
Tableau 2 : Caractéristique et conditions d'hébergement des souris.....	18
Tableau 3 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	19
Tableau 4 : Résultats descreening phytochimique des feuilles et racines de <i>Vitex agnus castus</i> . L.....	30
Tableau 5 : Résultats de l'activité antimicrobienne des feuilles et racines de <i>Vitex agnus castus</i> L.....	37
Tableau 6 : Concentration d'inhibition (IC50 (en mg /ml) de antioxydant de référence et des extrait testés.....	40
Tableau 7 : Les résultats de screening phytochimique des feuilles de <i>Vitex agnus castus</i> L.....	Annexe III
Tableau 8 : Les résultats de screening phytochimique des racines de <i>Vitex agnus castus</i> L.....	Annexe III



Introduction

Les plantes aromatiques et médicinales représentent un intérêt économique considérable par leur appartenance aux industries de la parfumerie, des cosmétiques, de l'agro-alimentaire et de la pharmacie (**BRUNETON, 2009**).

En effet, le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'Homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux (**BABA-AISSA, 2000**). Parmi ces composés, figurent les flavonoïdes, les alcaloïdes les terpènes, les coumarines, les acides phénoliques et les tanins (**BAHORUN et al., 1996**).

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux (**MEDDOUR et al., 2013**). Ces dernières années, l'attention s'est portée sur certaines activités biologiques notamment l'activité antioxydante des plantes médicinales en raison du rôle qu'elles jouent dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**MEDDOUR et al., 2013**).

Aussi, la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques, ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (**BENBRINIS, 2012**).

Les végétaux furent de plus en plus utilisés pour l'extraction des substances physiologiquement actives ou pouvant être transformées en médicament.

L'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (**TEIXEIRA DA SILVA, 2004**).

Dans le Maghreb, l'Algérie est considérée parmi les pays connus par leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendue entre la Méditerranée et l'Afrique subsaharienne (**POTTIER, 1981**). Le Sahara Algérien dispose d'une biodiversité floristique exceptionnelle, constituée d'environ 500 espèces végétales (**OZANDA, 1991**). Ce sont en effet des réservoirs de substances naturelles à intérêt majeur pour les oasiens.

Introduction

Cette étude rentre dans la thématique de l'axe de recherche sur la biodiversité floristique algérienne et plus particulièrement des plantes aromatiques et médicinales au niveau du laboratoire sur les zones arides de Bab Ezzouar. Dans ce cadre, notre travail rentre dans le volet de la valorisation de *Vitex agnus castus* L , sur le plan thérapeutique et à la processus d'un développement durable. Nous avons entrepris entre autre dans ce volet une étude biologique en relation avec l'activité de quelques extraits de *Vitex agnus castus* L. espèce introduite dans les zones arides du Sahara Algérien et plus particulièrement dans la région d'Adrar pour un développement rural durable en Algérie.

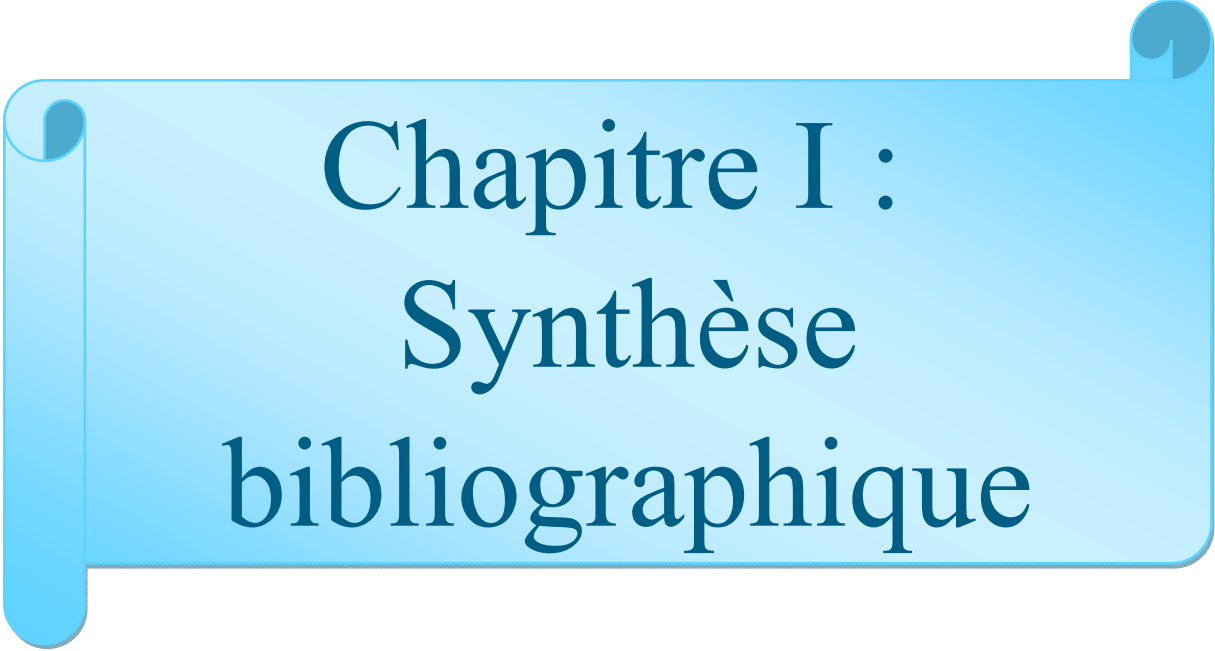
Pour cela nous avons fixé les étapes suivantes :

- Extraction des flavonoïdes (Aglycone flavonique, Anthocyane) et des alcaloïdes totaux
- Evaluation du pouvoir anti-inflammatoire des extraits de *Vitex agnus castus* L.
- Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de *Vitex agnus castus* L.
- Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits de *Vitex agnus castus* L. vis -à-vis du radical libre stable DPPH.

Cette étude comporte trois chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique, se présente en trois volets : le premier est consacré à la présentation de *Vitex agnus castus*.L et le second, portera sur les métabolites secondaires, et le dernier sur les activités biologiques étudiées.

Le second chapitre représente le matériel et les méthodes utilisées, et le troisième chapitre regroupera l'ensemble des résultats et discussion. Enfin nous terminons par une conclusion et certaines perspectives pour les travaux ultérieurs.



Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

1. *Vitex agnus-castus*

1.1. Description botanique

Vitex agnus-castus “L’arbre au poivre, ou gattilier” est une espèce d’arbustes (fig.1.a), appartenant à la famille des *Verbenaceae* selon la classification classique, ou à celle des *Lamiaceae* selon la classification phylogénétique.

Le système racinaire est pivotant, la tige est ligneuse ramifiée. Les feuilles sont composées palmées. Les folioles (fig.1b) sont vertes, linéaires, lancéolées, dentées (QUEZEL et SANTA, 1963). Il fleurit en août et septembre et ses fleurs sont petites, de couleur bleue violacée, regroupées en une inflorescence de type épi (fig.1c). Il donne des baies qui ressemblent à des grains de poivre, dur, d’un pourpre à la peau noire, jaunâtre à l’intérieur, à moitié couvert par leur calices verts et contenant quatre graines (fig.1d). L’odeur est aromatique et épicé, la saveur chaude et singulière après maturation (AISSAOUI, 2010).

1.2. Les noms communs / Synonymes

L’espèce *Vitex agnus-castus* possède plusieurs noms communs tels que : « Kef meriem » (QUEZEL et SANTA, 1963). Gattilier, « agneau chaste », petit poivre, poivre sauvage, herbe au poivre, arbre de poivre, Berry chaste, baie de l’arbre chaste, chastetree, chanvre arbre, le poivre de moine, les épices indiennes (TELA-BOTANICA, 2015), Kharouaa (Autochtones de la région d’Adrar)



Figure 1. (1.a) : Aspect morphologique de *vitex agnus castus L.* (1b) : feuilles ; (1c) : fleurs ; (1d) : fruits (ZAHID et al ., 2016)

1.3. Classification Botanique

CRONQUIST, (1981) a établi la classification suivante :

Régne : Plantae

Sous- règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Verbenaceae

Genre : *Vitex*

Espèce : *Vitex agnus castus* L.

Classification **APG III(2009)**

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

1.4. Répartition géographique

Le gattilier est originaire d'Asie, il a été introduit en Europe occidentale dans les jardins médiévaux, et s'est ensuite répandu dans toute la région du bassin méditerranéen où il pousse aujourd'hui spontanément. *Vitex agnus castus* se rencontre au nord de l'Afrique et en Asie centrale et l'Asie occidentale. Elle est maintenant cultivée partout dans le monde, y compris la partie sud des Etats-Unis. (**ALLAIS, 2008**). En Algérie, cette espèce trouve un ultime refuge dans les zones arides du Sahara (**AISSAOUI, 2010**).

Vitex agnus castus L. se retrouve plutôt en terrains humides au bord des ruisseaux et cours d'eau à faible altitude. (**ALLAIS, 2008**). Le gattilier pousse sur tous les sols, pauvres en éléments nutritifs, caillouteux ou calcaires. Il résiste aussi parfaitement à la sécheresse.

1.5. Les constituants chimiques de *Vitex agnus castus* L.

Le gattilier contient des alcaloïdes, des glucosides iridoïdes, huiles essentielle et des principes amers.

Plusieurs études ont montrées la présence d'autres constituants dans l'espèce *Vitex agnus castus* parmi lesquels on cite : Les acides gras ; Les acides aminés ; et des traces d'hormones progestérone et hydroxyprogestérone dans les feuilles et les fleurs. **(DU MEE , 1993)**.

1.6. Propriétés et utilisation

Le gattilier est apprécié pour ses nombreuses vertus. Ainsi, ses feuilles aromatiques sont utilisées comme antiparasitaires et vermifuges et permettent de calmer et de soulager les douleurs. Ses racines, quant à elles, donnent du tonus, permettent de lutter contre la fièvre, sont un puissant expectorant et ont aussi des propriétés diurétiques. Ses fruits, pour leur part, contiennent de la casticine et de l'irridoïde, des huiles grasses et des huiles essentielles, mais surtout des flavonoïdes.

Le gattilier est surtout connu pour son efficacité contre les différents troubles liés aux menstruations, voire la procréation. Ainsi, cette plante est utilisée pour régulariser les cycles menstruels, notamment pour les femmes touchées par l'aménorrhée ou l'absence des règles et pour celles qui ont des cycles irréguliers suite à la prise de contraceptifs. Le gattilier est également utilisé pour lutter contre l'infertilité due à un déséquilibre hormonal, il agit en effet sur l'ovulation, en régulant la sécrétion de prolactine et en augmentant le taux de progestérone. Enfin, il agit également sur les troubles de la pré-ménopause et de la ménopause **(MOHAMED OUALI, 2016)**.

2. Métabolites secondaire

Chez les plantes, il existe un métabolisme secondaire, c'est une exclusivité du monde végétal. Ces composés de métabolites secondaires, à structure chimique souvent complexe, très dispersée et très différente selon les espèces (CUENDET, 1999). Parmi ces métabolites : les polyphénols et les alcaloïdes.

2.1 Les polyphénols

2.1.1. Définition

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux. (GEE et JOHNSON, 2001). Ils forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes (DACOSTA, 2003).

Les polyphénols sont présents partout : dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux.

2.1.2. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont issus de deux grandes voies (BRUNETON, 2009) :

- **La voie de shikimate (l'acide shikimique)**

À partir de glucide, cette voie conduit à la formation du précurseur des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques.

- **La voie de l'acétate**

Conduit à des poly- β -cétoester de longueur variable « les polyacétates » menant, par cyclisation à des composés polycycliques tels que les isocoumarines ou les quinones.

2.1.3. Classification

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (BRUNETON, 1999).

Les Principales classes de ces composés phénoliques sont : les acide phénols, les flavonoïdes ; les tanins, les stilbènes, les coumarines, les lignines. Les flavonoïdes représentent le groupe le plus vaste des polyphénols et le plus largement distribué dans le règne végétal (AMIOT et al., 2009).

2.1.3.1. Les flavonoïdes

2.1.3.1.1. Définition

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (SEYOUM *et al.*, 2006), ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (GHESTEM *et al.*, 2001 ; BRUNETON, 1999).

Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet, plus de 6400 structures ont été identifiées (HARBORNE ET WILIAMS, 2000).

2.1.3.1.2. Structure

La structure de base des flavonoïdes est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques qui sont désignés par lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne par la lettre C (fig. 2) (DACOSTA ,2003).

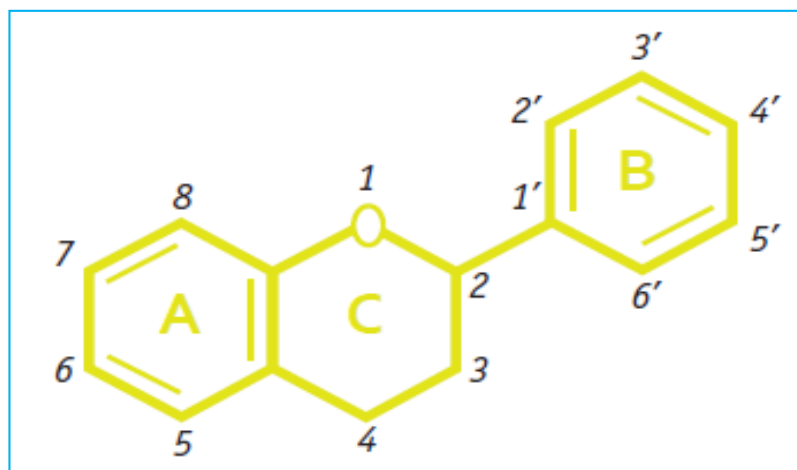


Figure 2. Structure de base de flavonoïde. (MASSAUX, 2012)

2.1.3.1.3. Biosynthèse

La voie biosynthétique de flavonoïdes est présentée dans la (fig.3).

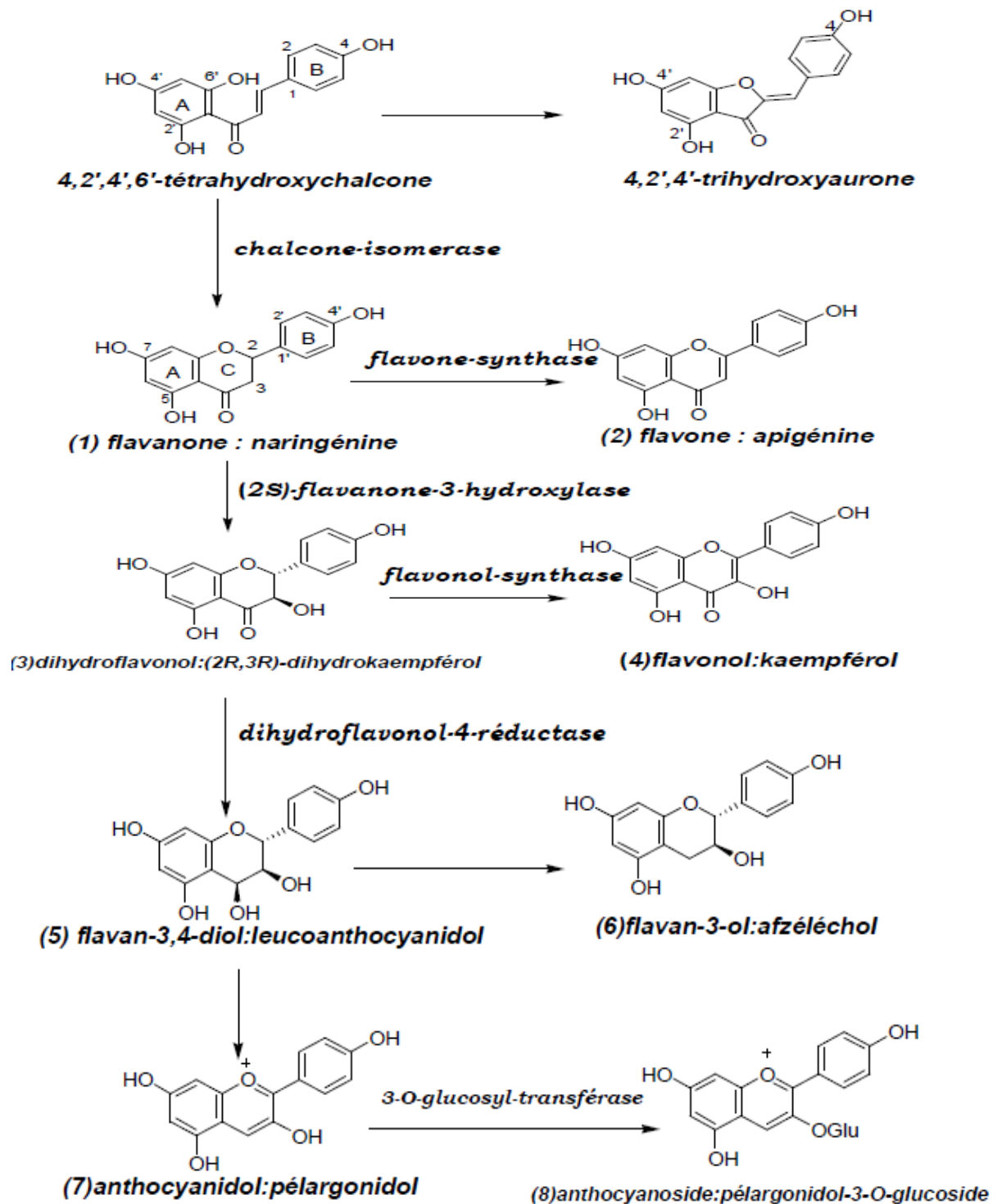


Figure 3. Biosynthèse des flavonoïdes. (BRUNETON, 1999)

2.1.3.1.4. Classification

Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes, ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle (fig. 4).

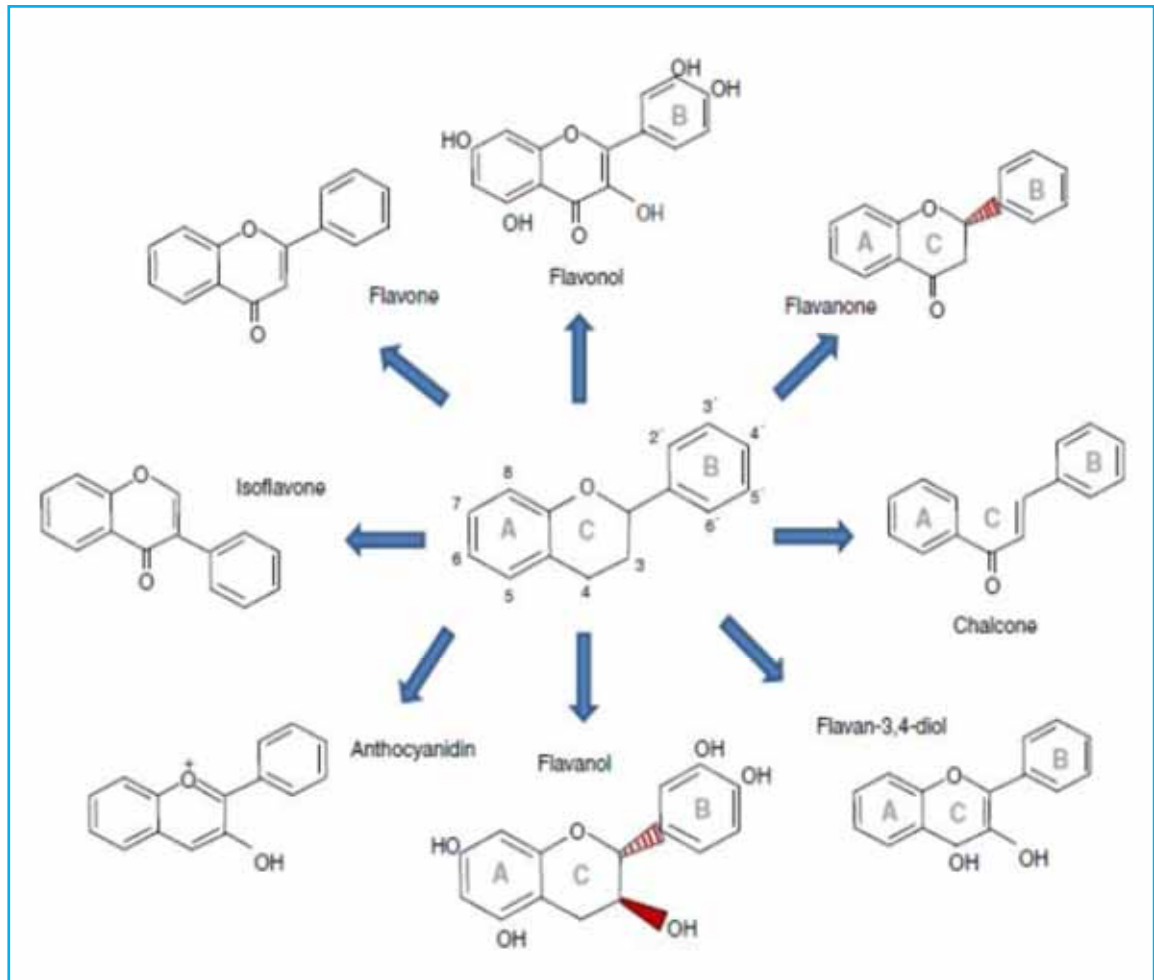


Figure 4. Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes (FRAGA et OTEIZA, 2011)

2.1.3.1.5. Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (MEDIC *et al.*, 2003). Ils s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, ils se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (BRUNETON, 1999).

2.1.4. Propriétés biologique et intérêt des polyphénols

Les composés phénoliques sont des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) (EDEAS, 2007).

Ils jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, en particulier contre les radiation UV, le stress oxydatif, les attaques microbiennes (MONEB *et al.*, 2011). Ils sont impliqués aussi dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (BIOZOT et CHARPENTIER., 2006).

Ils offrent également pour la santé humaine, une protection contre certaines maladies impliquant un stress oxydatif, comme les cancers et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (SUN *et al.*., 2011).

Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le tableau 1.

Tableau 1. Activités biologiques de quelques composés phénoliques (BAHORUN, 1997)

Composé phénolique	Activité biologique
Acides phénols	Antifongique, antioxydante , antibactérienne
Tanins	Antiseptique ; antioxydante , antidiurétique ,
Flavonoïdes	Anti-inflammatoire, antioxydante , anticarcinogène , antimicrobienne ,antivirale , antiallergique , diurétique.
Coumarines	Anticoagullante , antioxydante ; antioedémateuse .
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux , antioxydante .

2.2. Les alcaloïdes

2.2.1. Définition

Le terme alcaloïde, de *Alkali-like*, a été introduit par le pharmacien W. Meissner en 1806, en raison du caractère alcalin plus ou moins prononcé des membres de cette famille de composés (BRUNETON, 2009). Le terme alcaloïde comprend maintenant toutes les molécules naturelles alcalines extraites de plantes dont la structure contient au moins un atome d'azote (HARBORNE et HERBERT, 1995).

2.2.2. Structure des alcaloïdes

La plupart des alcaloïdes dérivent des acides aminés tels que le tryptophane, L'ornithine, la lysine, l'asparate, l'anthranilate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplés à d'autres squelettes carbonés (CYRIL, 2001)

2.2.3. Classification :

Les alcaloïdes sont généralement classés selon leurs précurseurs biogénétiques communs et la position de l'atome d'azote, ils se divisent en trois classes :

❖ Les alcaloïdes vrais :

L'azote est inclus dans un hétérocycle, ce groupe représente la majorité des alcaloïdes (GUIGNARD, 2000).

❖ Les pseudo-alcaloïdes :

Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (BRUNETON, 1999).

❖ Les proto-alcaloïdes :

Les proto-alcaloïdes dérivent d'acides aminés, mais l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique (BADIAGA, 2011).

2.2.4. Localisation :

Chez le végétal, les alcaloïdes existent sous la forme, soluble, de sels (citrate, malate, tartrate, méconate, isobutyrate, benzoate) (BRUNETON, 1999).

Ils peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon les espèces, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits (HARBORNE et HERBERT, 1995).

2.2.5. Propriétés

A forte dose, la plupart des alcaloïdes sont très toxique. À faible dose, ils peuvent avoir une valeur thérapeutique. En effet, les alcaloïdes ou des extraits qui en renferment ont été utilisés depuis la préhistoire comme médicaments relaxants musculaires, analgésique et tranquillisants (HOPKINS, 2003). Chez les plantes synthétisantes, les alcaloïdes constituent une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires à leur développement. En effet, ils régulent la croissance et le métabolisme, ils désintoxiquent et transforment les substances nocives aux plantes et, les protègent contre les rayons ultraviolets comme ils ont des effets contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes (MAURO, 2006).

3. Les activités étudiées

3.1. L'activité anti -inflammatoire

3.1.1. Définition de l'inflammation

L'inflammation est un processus de défense de l'organisme dont le but est de neutraliser, de combattre ou d'éliminer l'agent pathogène (endogène ou exogène) et, de préparer la réparation des tissus. Les signes de ce processus sont : La chaleur, la rougeur, la douleur, les gonflements (MAJNO et JORIS, 2004 ; KUMAR *et al.* , 2003). Il existe deux types d'inflammations : aigüe et chronique.

3.1.2. Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui antagonisent les processus inflammatoires. À côté des analgésiques antipyrétiques tels que l'acide acétylsalicylique (Aspirine) doués à forte dose ou à doses continues de propriétés anti-inflammatoires (MOHR *et al.* , 2001), les anti-inflammatoires sont répartis en deux grands groupes :

- Les anti-inflammatoires stéroïdes.

- Les anti-inflammatoire non stéroïdes .

3.2. Activité antimicrobienne

La découverte des antibiotiques en 1929 par Alexander Fleming, qui a mis en évidence pour la première fois l'action de la pénicilline, a donné l'espoir que les antibiotiques puissent éradiquer les pathologies causées par les infections, mais l'apparition de la résistance des micro-organismes a fait douter de cette opinion et poser le problème de l'échec de l'antibiothérapie (KHADIR *et al.*, 2013).

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. À l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur les souches fongiques et différentes souches bactériennes à Gram négatif et Gram positif. (VALSARAJ *et al.*, 1997 ; COWAN, 1999 ; WÄCHTER *et al.*, 1999; ULANOWSKA *et al.*, 2007).

3.3. Activité antioxydante

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, nous disons que la balance antioxydantes/ prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé Stress oxydatif.

Il est maintenant admis que le phénomène de stress oxydant est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies neurologiques (Alzheimer, Parkinson, Huntington), et dans les phénomènes de vieillissement (FAVIER, 2003).

3.3.1. Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement actif (VANSANT, 2004). L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs est souvent appelé « espèces réactives de l'oxygène » (FAVIER, 2003).

Parmi ces radicaux libres :

-L'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical perhydroxyle HO_2^{\cdot} , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , Le radical peroxyde RO_2^{\cdot} ,

3.3.2. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des espèces réactives de l'oxygène (VANSANT, 2004).

3.3.3. Sources d'antioxydants

Nous avons principalement deux sources d'antioxydants :

3.3.3.1. Source endogène

Se compose de protéines, d'oligoéléments et d'enzymes qui constituent la première ligne de défense en participant à la neutralisation excédentaire en radicaux libres (COENE, 2004).

- **La superoxyde dismutase (SOD)**

Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique, qui nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (CuZnSOD) et l'autre mitochondriale, qui utilise le manganèse comme cofacteur (MnSOD) (JACQUES et ANDRE, 2004). Elle transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui se transforme en O₂ et en eau par catalase (ALLAIN, 1996).

- **La catalase**

Détruit l'eau oxygénée et évite ainsi la formation de radicaux OH.

- **La glutathion peroxydase**

La glutathion peroxydase se trouve dans les mitochondries, elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants: le glutathion réduit et le sélénium. Elle détruit les peroxydases lipidiques.

- **Les chélateurs de métaux**

La ferritine, la transferrine, l'albumine qui par liaison aux métaux leur font perdre partiellement ou totalement leur activité de stimulation des réactions radicalaire (TRAORE, 2005).

3.3.3.2. Source exogène

Peuvent être soit des nutriments classiques (peptides et acides aminés, vitamines E et C) ou des composants bioactifs (flavonoïdes, caroténoïdes).

- **La vitamine E**

Vitamine E est le nom commun utilisé pour les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , δ , γ avec une activité antioxydant variable (SINGH *et al*, 2005).

- **La vitamine C**

Joue un rôle clé dans la protection des membranes lipidiques et doit être régénérée en permanence. Elle est apportée essentiellement par les fruits et les légumes.

- **Les polyphénols**

Doivent leur activité à un très grand nombre de résidus hydroxyle, qui sont autant de munition pour lutter contre les radicaux libres.

Les flavonoïdes réagissent avec les radicaux libres empêchant les dégradations liées à leur intense réactivité au niveau des phospholipides membranaire. Cette capacité antioxydante serait liée à l'affinité pour les radicaux et donc à la structure du flavonoïde.

Les tanins inhibent la peroxydation lipidique, ce sont des piègeurs de radicaux libre et des inhibiteurs de la formation de l'ion superoxyde (BRUNETON, 1993).

- **La β -carotène**

La β -carotène est apporté par l'alimentation. Elle est douée de plusieurs capacités : elle est précurseur de la vitamine A, elle capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, elle a le pouvoir de terminer les réactions en chaine de lipoperoxydation. Elle protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante : elle s'oppose à la génotoxicité de nombreux agents (ALLARD *et al*, 1994).



Chapitre II :

Matériel et méthodes

Notre travail consiste à l'évaluation de quelques activités biologiques des extraits de *Vitex anus castus* L, de la région d'Adrar, notre stage s'est déroulé durant la période allant de Mars à Juin 2017.

Le screening phytochimique a été réalisé au niveau du laboratoire des Projets de Fin d'Etudes, université de Blida 1.

L'extraction des polyphénols et des flavonoïdes a été réalisée au niveau du Laboratoire de Recherche sur les Zones Arides (LRZA), à la faculté de Biologie, Université des Sciences et Technologies Houari Boumediene.

L'étude de l'effet antimicrobien des extraits aqueux, flavoniques à été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de Blida.

L'extraction des alcaloïdes et l'étude de l'effet antioxydant des extraits flavoniques ont été réalisées au niveau laboratoire de recherche des plantes aromatique (LRPAM) à la faculté d'agronomie, Université de Blida 1.

L'étude de l'effet anti-inflammatoire des extraits aqueux, flavoniques à été réalisée au niveau du laboratoire de Toxicologie et Pharmacologie du groupe ANTIBIOTICAL-SAIDAL. MEDEA.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

L'étude a porté sur les feuilles et les racines de *V.anus cactus* L. L'échantillonnage a été réalisé de manière aléatoire durant le mois de Mars 2016, à la station de Ouled Aissa, dans la région d'Adrar (27°54 Nord, 00°17 à l'Ouest de l'Algérie) (fig.5), par une matinée ensoleillée, à une température de 30°C.

Les organes étudiés ont été séchés à température ambiante, à l'air libre et à l'ombre pendant une semaine. Par la suite, ils ont été broyés, par un broyeur électrique. La poudre ainsi obtenue est conservée dans des sacs en papier en vue de leur utilisation ultérieure.



Figure 5. Localisation de la zone de l'échantillonnage (www.google map.com)

1.2. Matériel animal

Pour évaluer *in vivo* l'activité anti-inflammatoire, 18 souris Albinos de souche NMRI, de sexe mâle et femelle ont été utilisées. Leurs poids varient entre 17 et 24 g et, sont obtenues suite à l'élevage au niveau de l'unité antibiotical SAIDAL de Médéa. Les caractéristiques des souris sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2. Les caractéristique et conditions d'élevages des souris

Nombre	Sexe	Poids	Alimentation	Condition d'élevage
18	Mâle/ Femelle	17 / 24 g	Granulés Eau de robinet	Température : 20 à 24 °C Humidité : 50% Éclairage 10h /24h

1.3. Les souches microbiennes

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur 4 souches microbiennes (tableau 3).

Tableau 3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

Souches microbiennes	Gram	Familles	Références
<i>Escherichia coli</i>	-	Enterobacteriacées	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Pseudomonadacées	ATCC 10876
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Staphylococcacées	ATCC 6538
<i>Candida albicans</i>	/	Saccharomycetacées	ATCC 24433

2. Méthodes

2.1. Screening phytochimique

Ce test est qualitatif, il est effectué soit sur le broyat, soit sur un infusé (BOUYER, 1996). Il constitue la première étape dans la recherche des molécules à activités thérapeutiques, et basé sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation.

Mode opératoire

A 10 g de poudre végétale, nous avons ajouté 100 ml d'eau distillée bouillante. Nous avons laissé infuser pendant 15 min avec agitation de temps en temps et enfin nous avons filtré.

➤ Les anthocyanes

A 5 ml de l'infusé, nous avons ajouté quelques gouttes d'ammoniaque ½. L'apparition d'une couleur rouge, indique la présence des anthocyanes.

➤ Les tanins

A 5 ml d'infusé, nous avons ajouté quelques gouttes d'une solution de F_eCl_3 à 5%. La réaction donne une coloration bleue noir en présence des tanins.

➤ Les tanins catéchiques

Nous avons additionné 7 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40% et 5 ml d'HCl concentré) à 15 ml de l'infusé. La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchiques.

➤ Les tanins galliques

A 5 ml de l'infusé, nous avons ajouté 2 g d'acétate de Sodium et quelques gouttes de F_eCl_3 . La réaction donne une coloration bleue foncée en présence des tanins galliques.

➤ **Les flavonoïdes**

A 5 ml d'infusé, nous avons additionné 5 ml d'HCl, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool isoamylique. La réaction donne une coloration rouge orangée en présence des flavonoïdes.

➤ **Les alcaloïdes**

A 1g de poudre végétal, nous avons ajouté 10 ml d'acide sulfurique (10%). Après 2 mn d'agitation nous avons filtré. Au filtrat, nous avons ajouté 2 gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité rouge orangé indique la présence des alcaloïdes.

➤ **Les glucosides**

A 2 g de poudre végétale, nous avons ajouté quelques gouttes d'acide sulfurique. La formation d'une coloration rouge brique qui vire ensuite au violet indique la présence des glucosides.

➤ **Le mucilage**

A 1ml de l'infusé, nous avons ajouté 5ml d'éthanol absolu. L'obtention d'un précipité floconneux indique la présence de mucilage.

➤ **Les saponines**

A 2 ml de l'infusé, nous avons ajouté 1 ml d'eau distillée, la solution est fortement agitée. Le mélange est laissé pendant 20 mn et la teneur en saponosides est estimée en mesurant la hauteur de la mousse (**TREASE et EVANS, 1987**) :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de plus de 2 cm = test fortement positif
- Mousse de 1 à 2 cm = test positif

2.2. Préparation de macérât

La méthode d'extraction des polyphénols est basée sur le protocole décrit par **SINGLETON et ROSSI, (1965)**.

5g de poudre végétale sont macérés dans 150 ml d'eau distillée pendant 24 h, sous agitation magnétique permanente (agitateur de type ANNOVA 2300). Ensuite, nous avons filtré sur du papier Wattman. Le macérât a servi pour tester l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire.

2.3. Extraction des flavonoïdes

2.3.1. Extraction des aglycones flavoniques et des anthocyanes

La technique utilisée a été mise au point par **BATH SMITH, (1954)**, reprise par **LEBRETON et al., (1967)** et enfin améliorée par **LARACINE, (1984)** (fig 6).

- **Mode opératoire**

1 g de matière végétale est mis en suspension dans 80 ml d'HCL à 2 N. Après 5 minutes de contact à froid, le mélange est porté dans un bain marie à 100°C, pendant 40 minutes. Nous procédons à des insufflations d'air toutes les 10 minutes. Après refroidissement, les extraits sont filtrés pour éliminer les traces de la matière végétale.

Deux décantations à l'éther diéthylique (30 / 30) sont réalisées. À chaque décantation, deux phases sont obtenues (fig.1, Annexe II) :

- Hypophase (phase aqueuse) contenant les anthocyanes (anthocyanidines), de couleur rouge orangé selon les échantillons.
- Epyphase (phase organique) de couleur jaune vert contenant les aglycones flavoniques .

Celle-ci est récupérée dans des petits Béchers, puis mise à évaporer à l'air libre, pendant 24 h. Après évaporation, les aglycones flavoniques sont récupérés par 3 ml d'éthanol à 96 °, dans des tubes à essai et conservés à froid.

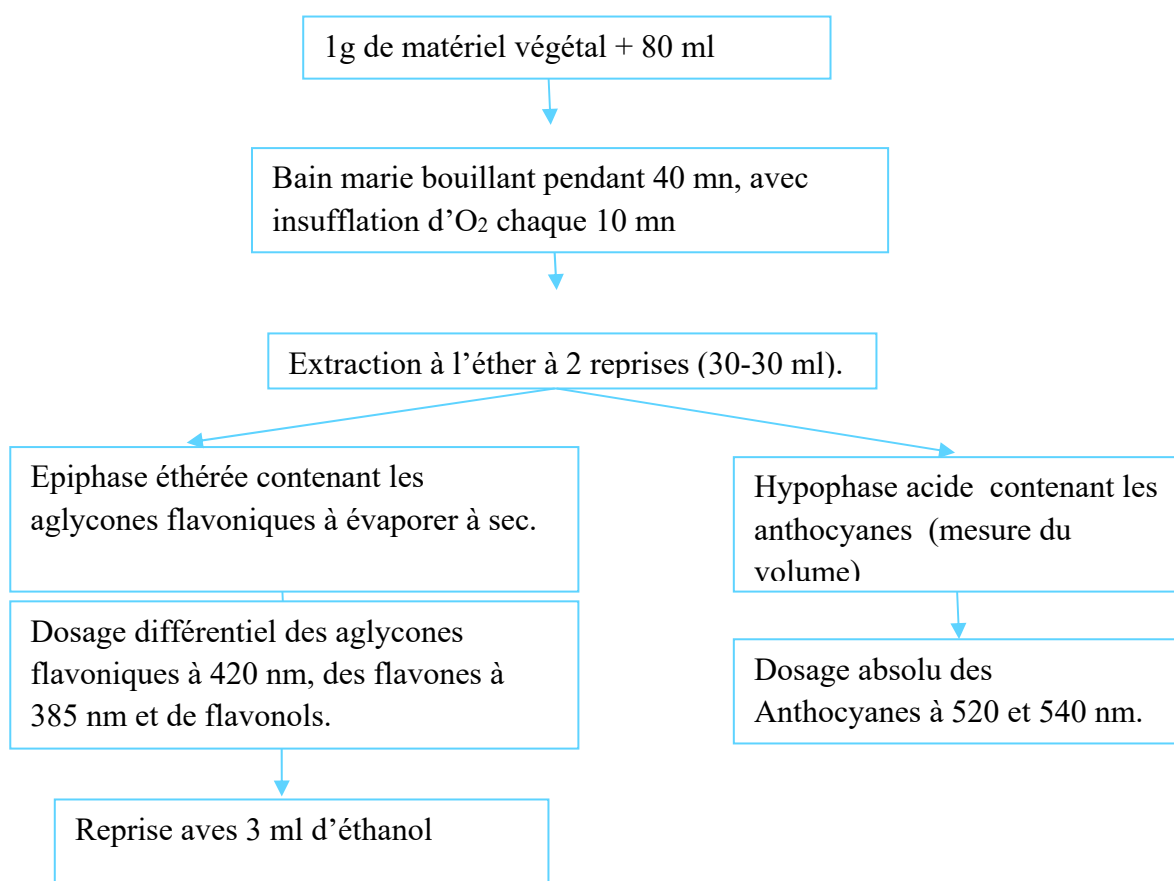


Figure 6. Protocole d'extraction de flavonoïdes (LEBRETON, 1967)

2.3.2. Dosage des anthocyanes

Après la mesure de volume totale de la phase aqueuse contenant les anthocyanes, ces dernières sont dosées juste après au spectrophotomètre de type « JENWAY 6305 UV / VIS » (fig.2, Annexe II), aux longueurs d'onde 520 et 540 nm.

La teneur absolue en anthocyanidines (T) est exprimée en mg g⁻¹ de cyanidines est donnée par la formule suivante :

$$T = 5,2 \times 10^{-2} \times DO \times V/p \times d$$

5,2 : valeur constante.

DO : densité optique à la longueur d'onde maximale, comprise entre 520 et 540 nm dans la phase aqueuse.

V : volume de la phase aqueuse mesuré.

d : facteur de dilution.

P : poids sec de matière végétale sèche en g.

2.3.3. Dosage des aglycones flavoniques

Pour déterminer la teneur en aglycones flavoniques, nous procédons à la méthode du dosage différentiel spectrophotométrique. Ce dernier fait intervenir les propriétés chélatantes du chlorure d'aluminium Al Cl₃ à 1% en solution dans l'éthanol à 96°.

Le dosage est basé sur deux dilutions :

- La 1^{ère} dilution se fait dans de l'éthanol (2,9 ml d'éthanol + 0,1 ml de l'extrait éthanolique).
- La 2^{ème} dilution se fait dans la solution d'Al Cl₃ (Annexe I) (2,9 ml d'Al Cl₃ + 0.1 ml de l'extrait éthanolique), laissées en contact pendant 10 minutes.

Le dosage mesuré à une longueur d'onde de 420 nm pour les aglycones flavoniques totaux, 435 nm pour les flavonols et 385 nm pour les flavones.

La hauteur du pic différentiel des deux solutions est proportionnelle à la concentration en aglycones flavoniques.

La teneur (T) en aglycones flavoniques et flavonols exprimée en quercétine flavonol et flavones exprimée en luteoline est calculée par la formule suivante :

$$T = 1.3 \times 10^{-2} \times \Delta DO \times V/P \times d.$$

1,3 : Valeur constante

ΔDO : Densité optique du pic différentiel (DO AlCl₃-DO MetOH.).

V : Volume de la solution éthanolique d'aglycones flavoniques.

d : Facteur de dilution.

P : Poids sec de matière végétale sèche en g.

2.4. Extraction des alcaloïdes

Nous avons suivi la méthode décrite par CAHLIKOVA *et al.*, (2011) et NIU WEI *et al.*, (2012) (fig.7).

- **Mode opératoire**

- Macérer 45g de matière végétale sèche dans 150 ml d'Ethanol absolue à température ambiante, sous agitation pendant 24h, puis filtrer.
- Le filtrat récupéré est évaporé sous pression réduite à 60°C par un Rotavapor de type BÜCHI Rotavapor R-20 (fig.3, Annexe II).
- L'extrait sec obtenu est dissous dans 10 ml d'HCl (2%), sous agitation pendant 15 min, puis filtrer.
- 15ml de diéthyl éther sont rajoutés au filtrat. Le tout est agité durant 30 min, après lesquels, nous avons procédé à la première décantation. Deux phases se forment, l'épiphase (éliminée) et l'hypophase, qui est récupérée.
- Nous avons appliqué deux autres décantations à la phase récupérée selon la même méthode avec 5 min d'agitation, afin d'éliminer les composés neutres.
- La solution récupérée est basifiée par 15 ml d'ammoniac à 25 %.
- 15 ml d'acétate d'éthyle sont additionnés à la solution précédente. Le tout est agité pendant 10 min, puis laisser décanter. L'hypophase est dans ce cas éliminée et l'épiphase qui est récupérée. Comme précédemment, nous avons suivi les mêmes étapes pour deux les autres décantations, avec 5 min d'agitation.
- Le filtrat récupéré est évaporé sous pression réduite à 60°C.

L'extrait alcaloïdique récupéré (avec une petite quantité de solvant) est filtré dans un tube à essai (préalablement pesé). Le tube, est mis dans le bain marie à 60°C pour évaporer le reste du solvant. Ainsi nous obtenons les alcaloïdes totaux.

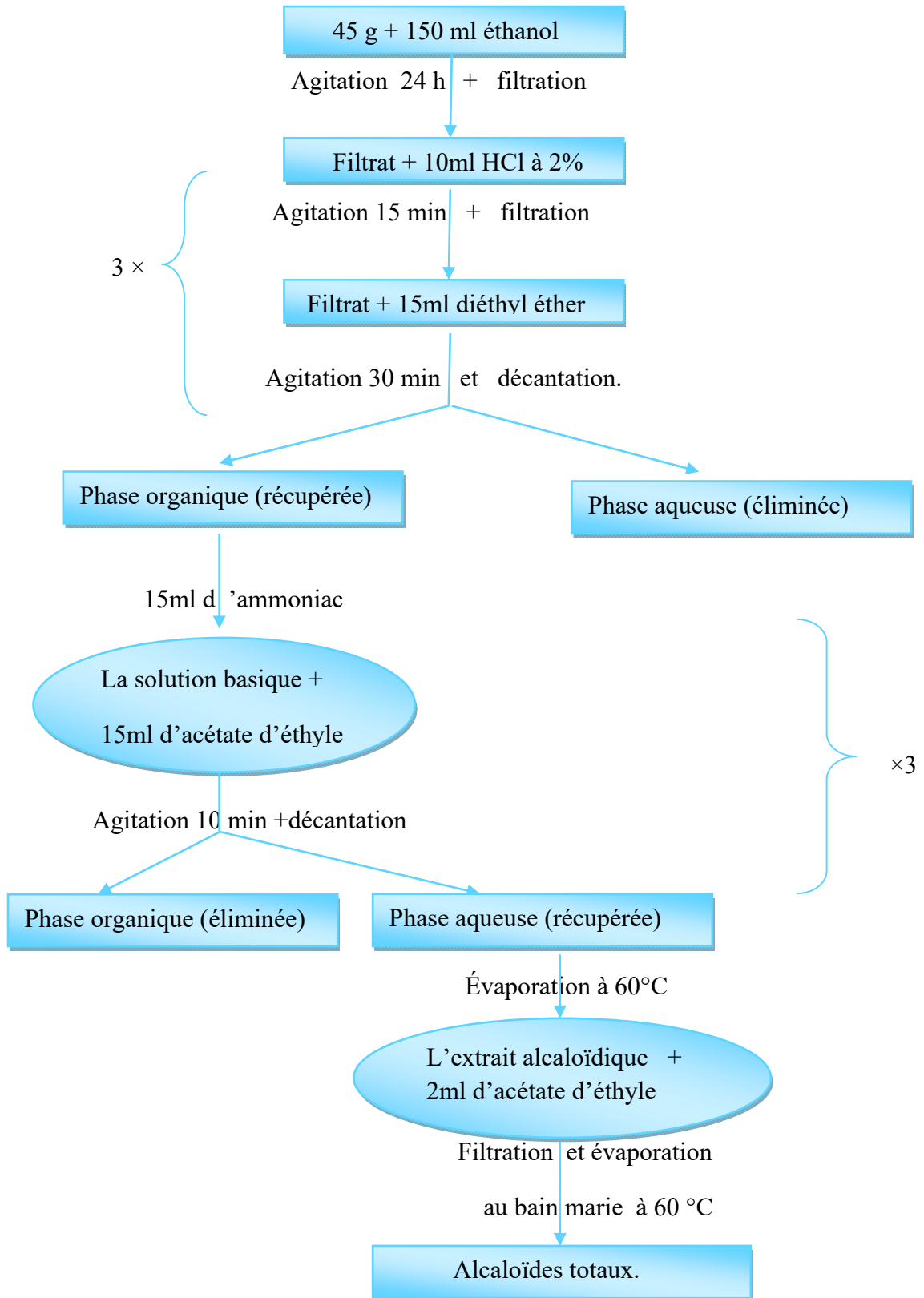


Figure 7. Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux (CAHLIKOVA *et al.*, 2011 ; NIU WEI *et al.*, 2012)

- Calcul des teneurs en alcaloïdes

La teneur (T) en alcaloïdes, exprimée en g g⁻¹ de MVS est déterminé selon la formule suivante :

$$T = (m - m_0)$$

Avec :

m₀ : la masse du tube à essai vide

m : la masse du tube à essai avec l'extrait.

m_T : la masse totale de matière végétale sèche utilisée en g .

2.5. Les activités biologiques

2.5.1. Activité anti-inflammatoire

Pour l'évaluation in vivo de l'activité anti-inflammatoire, nous avons adopté la méthode de (LEVY, 1969).

- Mode opératoire

Des souris regroupées en 6 lots (lot témoin de l'eau physiologique, lot référence de Diclofinac , lot essai 01 de macérât des feuilles à 3% , lot essai 02 de macérât des racine à 3% , lot essai 03 de l'extrait d'aglycone flavonique de feuilles, lot essai 04 de l'extrait d'aglycone flavonique de racines) de 3 chacun sont mises à jeûne pendant 18 heures avant l'expérimentation. Les souris du lot essais sont traitées oralement par 0.5 ml de macérât et d'aglycones flavoniques de feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L. En parallèle, le lot de référence a reçu 0.5 ml de Diclofinac à la dose de 12,5 mg/kg et le lot témoin de l'eau physiologique, au même volume.

Après 30 minutes, nous avons provoqué une inflammation par l'injection de 0,025 ml de carragénine à 1 % (Annexe I), sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des souris.

Quatre heures après l'administration des produits, nous avons sacrifié les souris par une forte concentration d'éther di-éthylique. Par la suite, nous avons coupé les pattes postérieures gauches et droites à hauteur de l'articulation. Ces dernières sont pesées à l'aide d'une balance analytique

- Expression des résultats

Le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% œdème) a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids de la patte gauche} - \text{moyenne des poids de la patte droite}}{\text{Moyenne des poids de la patte droite}} \times 100$$

Par la suite, nous avons calculé le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins par la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100$$

2.5.2. L'activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles et des racines, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme) qui a pour but de déterminer la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (BURNICHON et TEXIER, 2003)

Mode opératoire :

- **Préparation des suspensions**

Les suspensions microbiennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18 h. Les colonies sont mises dans des tubes stériles contenant 5 ml d'eau physiologique. Le mélange a été agité au vortex pendant quelques secondes pour bien disperser les amas de souches microbiennes.

- **Préparation des milieux**

Après la fonte de la gélose par autoclave à 120°C, pendant 15 à 20 min, nous avons coulé aseptiquement une couche de 4 mm d'épaisseur dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Ces dernières doivent être séchées durant 30 minutes, à une température, au laboratoire, avant leur emploi.

- **Préparation des extraits**

Nous avons pesé 25 mg de l'extrait sec d'aglycones flavoniques, lequel est dissous dans 1 ml de DMSO. Dans un bécher, nous avons mis 0.5 ml de la solution mère. Le volume de cette dernière est complété au 1ml par le DMSO.

- **Ensemencement**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîte de Pétri. L'écouvillon est trempé dans la suspension microbienne puis essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. Par la suite l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

- **Dépôt de disque et Incubation**

Les disques de 9 mm de diamètre sont imprégnés par 40 µl de chaque extrait sont déposés délicatement sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile. Deux répétitions ont été réalisées pour l'extrait de aglycones flavoniques.

Des disques témoins positifs chargés avec une solution d'antibiotique (Gentaxyn 2mg/ml) ou d'antifongique (Amykos 1mg/ml) sont inclus dans les essais et, d'autres disques sont imbibés par le DMSO ont été employés en tant que contrôles négatifs.

Les boîtes de Pétri sont fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 min. Par la suite les boîtes sont mises dans l'étuve à 37° C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 h pour les levures.

- **Lecture des résultats**

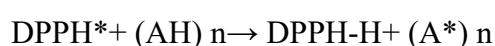
Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) apparues sous formes de halos claires autour des disques et sont mesurés à l'aide d'une règle graduée.

D'après CHIFUNDERA et *al.*,(1990), les intervalles de la zone d'inhibition sont interprétés comme suit :

- **ZI = 9 mm : souche résistante**
- **10 ≤ ZI <15 mm : souche sensible**
- **16 ≤ ZI < 20 mm : souche sensible intermédiaire.**
- **ZI > 20 mm : souche très sensible.**

2.5.3. Activité antioxydant

Le radical DPPH· est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (KANOUN, 2011). Il est de couleur violette en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. Cette couleur vire au jaune lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti-radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (SANCHEZ-MORENO, 2002), selon la réaction suivante:



Où:

(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (BRAND *et al.*, 1995).

- **Mode opératoire**

L'activité antioxydant a été étudiée selon la méthode décrite par BRAND *et al.*, (1995).

Nous avons récupéré les extraits secs de *Vitex agnus castus* L. avec le même volume du méthanol. Pour chaque extrait, nous avons préparé des dilutions de (0,8 ml ; 0,6 ml ; 0,4 ml et 0,2 ml). Une solution méthanolique de DPPH est préparée en mélangeant 4mg de DPPH et 100 ml de méthanol.

À 100 µl de chaque dilution de l'extrait considérée, nous avons rajouté 2 ml de la solution de DPPH. En parallèle, un témoin positif, représenté par l'acide ascorbique est préparé selon le même protocole.

Les tubes sont incubés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 mn, après lesquelles l'absorbance est mesurée à 517 nm.

Les résultats sont exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues.

Pour chaque extrait, nous avons déterminé la concentration du substrat causant la perte de 50% de l'activité du DPPH : la IC50 (SAMARTH *et al.*, 2008).

- **Expression des résultats**

- **Pourcentage d'inhibition (PI)**

Selon SHARIFIFAR *et al.*, (2007), l'inhibition du radical DPPH exprimée en pourcentage (I%) est calculée par la formule suivante :

$$PI\% = (Abs\ c - Abs\ d) / Abs\ c \times 100$$

Avec :

Abs c : Absorbance du contrôle.

Abs d : Absorbance pour chaque dilution.

Un autre paramètre est introduit pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, l'IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50%) ou l'EC₅₀ (Efficient concentration 50), qui représente la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testées, selon la formule suivante :

$$Y = a x + b$$

y = 50% (pourcentage de réduction de DPPH)

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

2.6. Etude statistique

L'étude statistique a été réalisée par Microsoft Office Excel 2007. Toutes les expériences du dosage et d'évaluation de l'activité antimicrobienne ont été réalisées en deux répétitions. Concernant l'activité anti-oxydante a été réalisée en triple. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type.



Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Screening phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques des feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L. Sont regroupés dans le tableau 4 et Annexe III.

Tableau 4. Résultats du screening phytochimique des feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L

Organes Végétatifs	Les feuilles	Les racines
Métabolites Secondaires		
Les anthocyanes	+	+
Les tanins	+	+
Les tanins catéchiques	+	+
Les tanins galliques	+	+
Les flavonoïdes	+	+
Les alcaloïdes	+	+
Les glucosides	+	-
Les mucilages	+	+
Les saponines	-	-

+ : présence

- : absence;

Les feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L présentent des différents métabolites secondaires notamment les flavonoïdes, les anthocyanes, les alcaloïdes, les mucilages. Néanmoins, les glucosides se sont révélés au niveau des feuilles mais, absents au niveau des racines. Pour ce qui est des saponines, ils se sont avérées absentes dans les deux organes végétatifs analysés.

Cette analyse phytochimique a permis de déterminer qualitativement les composés non nutritifs mais biologiquement actifs qui confèrent la saveur, la couleur et d'autres caractéristiques à la plante. En effet, le potentiel d'une plante médicinale est attribué à l'action de ses constituants phytochimiques. Ils sont produits comme métabolites secondaires, en réponse au stress environnemental ou pour assurer un mécanisme de défense aux agressions provoquant des maladies chez les végétaux (MOHAMMEDI, 2013).

L'ensemble des groupes chimiques ainsi identifiés, ayant des propriétés pharmacologiques diverses (OUEDRAOGO, 2001), justifient l'utilisation multiple de *V.agnus castus* L. en thérapeutique et, de l'autre côté, pour se défendre et pouvoir subsister aux contraintes imposées par le climat et le milieu (RIRA, 2006) en zones arides. En effet, Les flavonoïdes jouent un rôle dans la coloration des végétaux (RIBEREAU GAYON et REYNAUD, 1968), protègent les plantes contre le stress hydrique et génère une tolérance des plantes aux métaux lourds présents dans les sols. Plusieurs effets pharmacologique sont attribués aux flavonoïdes notamment dans la protection des aliments d'origine végétale de l'oxydation, ce sont des antioxydants réputés pour leur action anti radicaire (MAKHLOUFI, 2010).

Les tanins, sont connus pour donner un goût amer aux plantes notamment l'écorce ou aux feuilles et les rendent ainsi impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail (EBERHARD *et al.*, 2005). Ils sont également produits en réponse à un stress environnemental, suscité par différents facteurs: déficience en éléments nutritifs, sécheresse, températures élevées et l'intensité lumineuse (RIRA, 2006).

Aux alcaloïdes, diverses activités biologiques le sont attribuées (MILCENT et CHAU, 2003) : à faibles doses, ils sont d'anesthésiques locaux, analgésique, antibiotiques, antiparasitaires, antipaludique, anti-tumoraux et amoebicides (CHENNI, 2010).

2. Dosage des anthocyanes et des aglycones flavoniques

Les teneurs absolues et absolues différentielles exprimées en milligramme de cyanidine pour les proanthocyanes, de lutéoline pour les flavonols et les flavones et de quercétine pour les aglycones flavoniques par gramme de matière végétale sèche sont calculées à la suite de dosages effectués à des longueurs d'onde maximales pour chaque type d'extrait natif de la plante.

Les teneurs en anthocyanes exprimées en mg de cyanidines /g de MVS et des aglycones flavoniques exprimées en mg de quercétines /g de MVS sont représentées respectivement dans la (fig.8).

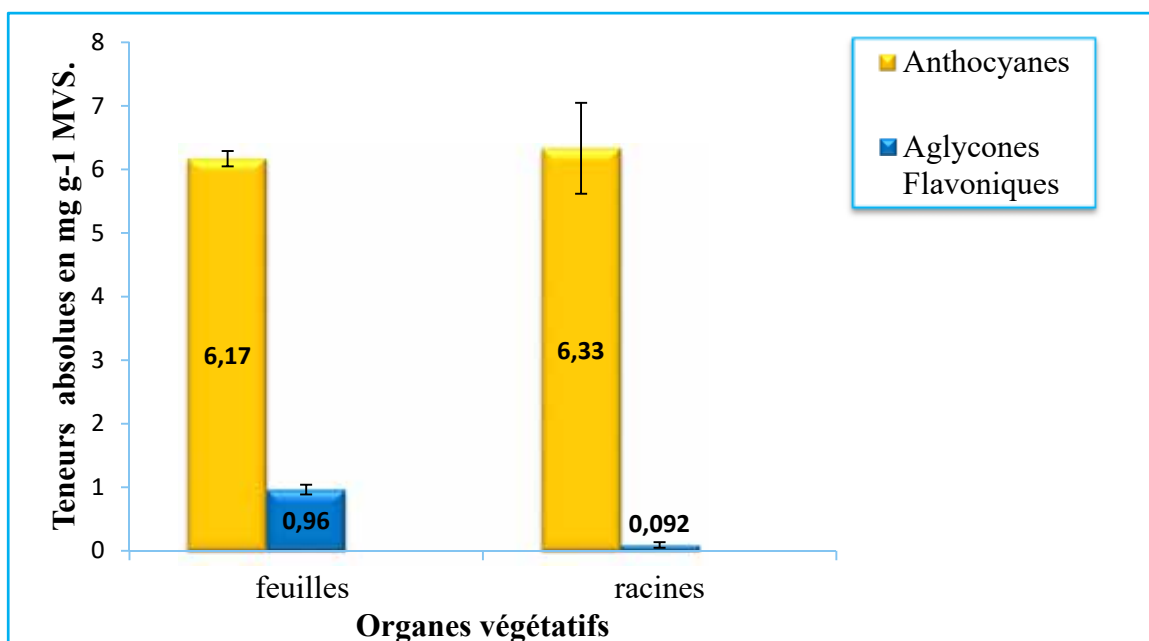


Figure 8. Teneurs moyennes en Anthocyane et en Aglycone flavonique des feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L. exprimées en mg.g⁻¹ MVS

Les teneurs en anthocyanes sont quasiment identiques dans les deux organes végétatifs analysés (fig.8). Néanmoins, ces valeurs restent très importantes comparées à celles des aglycones flavoniques dans les deux cas. Néanmoins, ces derniers sont plus importants dans les feuilles, avec une valeur moyenne de l'ordre de 0.96 mg.g⁻¹ ± 0.076MVS.

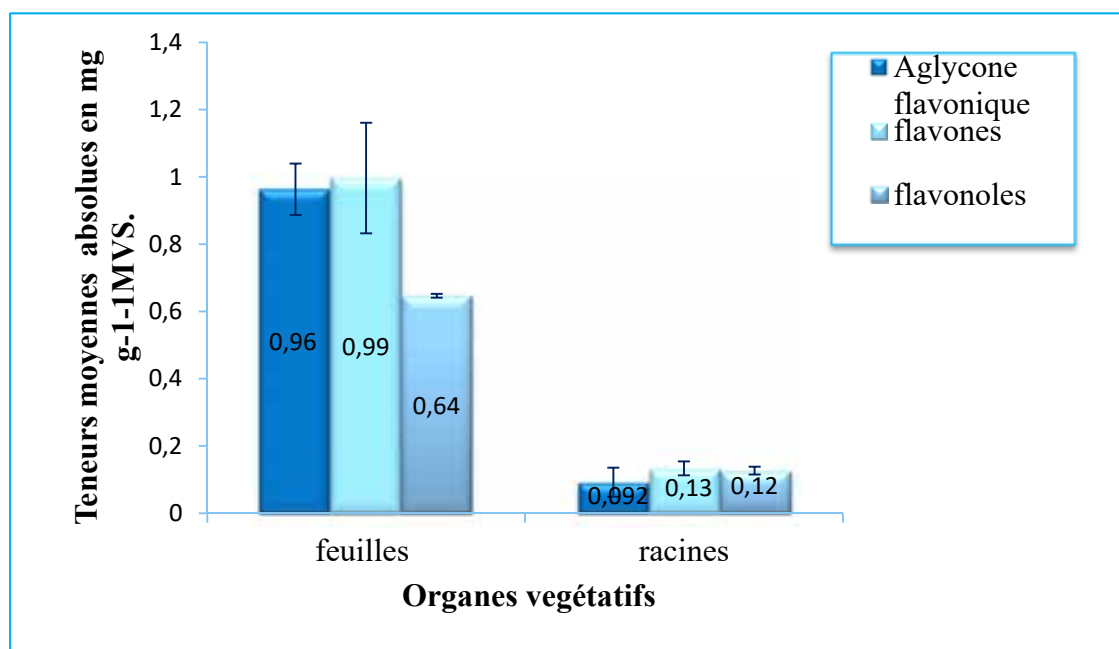


Figure 9. Teneurs moyenne en aglycones flavoniques des feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L. exprimées en mg.g⁻¹MVS

La figure 9 montre que ce sont les flavones qui sont les plus importantes par rapport au flavonols dans les feuilles avec une teneur moyenne de l'ordre de $0.99 \text{ mg g}^{-1} \pm 0,164 \text{ MVS}$. Cependant, les racines présentent des teneurs quasiment identiques en ces composés, avec respectivement des valeurs moyennes de l'ordre de $0.13 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0.020 \text{ MVS}$ et $0.12 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0.011 \text{ MVS}$. Cette inégale répartition des flavonoïdes pourrait s'expliquer par le fait que les feuilles sont plus exposées à l'ensoleillement solaire que les racines. En effet, les flavonoïdes assurent la protection des tissus de la plante contre les effets nocifs du rayonnement solaire. (GEHIN et al., 2006). Aussi la distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante, ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température, exposition solaire, sécheresse, salinité) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols et les flavonoïdes (FALLEH et al., 2008).

3. La teneur en alcaloïdes totaux

Les résultats des teneurs en alcaloïdes totaux sont présentés dans la (fig.10).

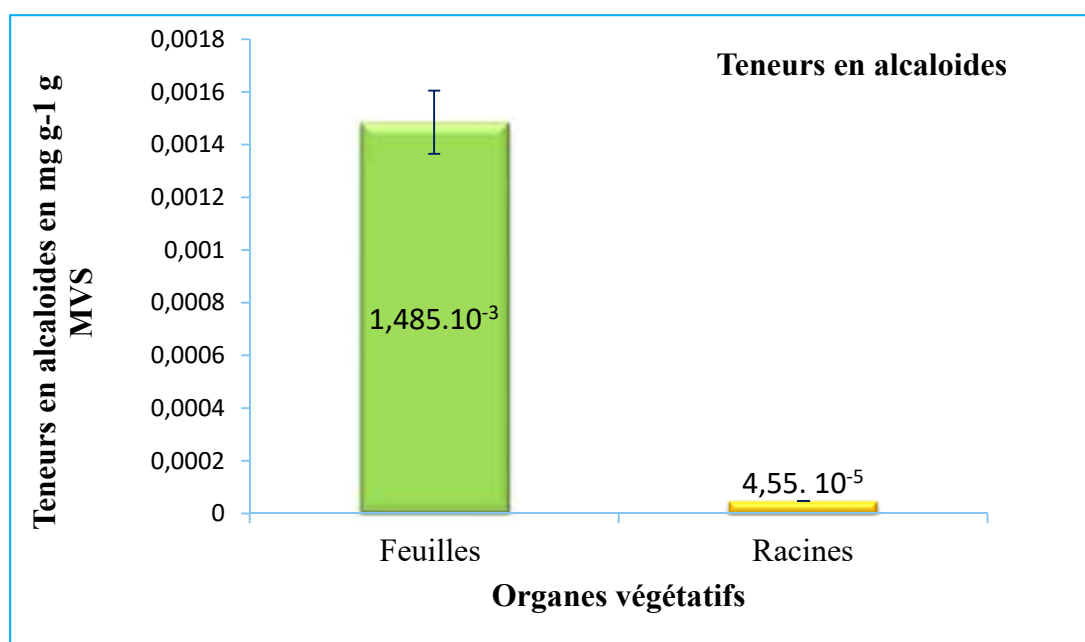


Figure 10. Teneurs moyennes en alcaloïdes totaux des feuilles et racines de *Vitex agnus castus*.L exprimées en mg.g⁻¹MVS

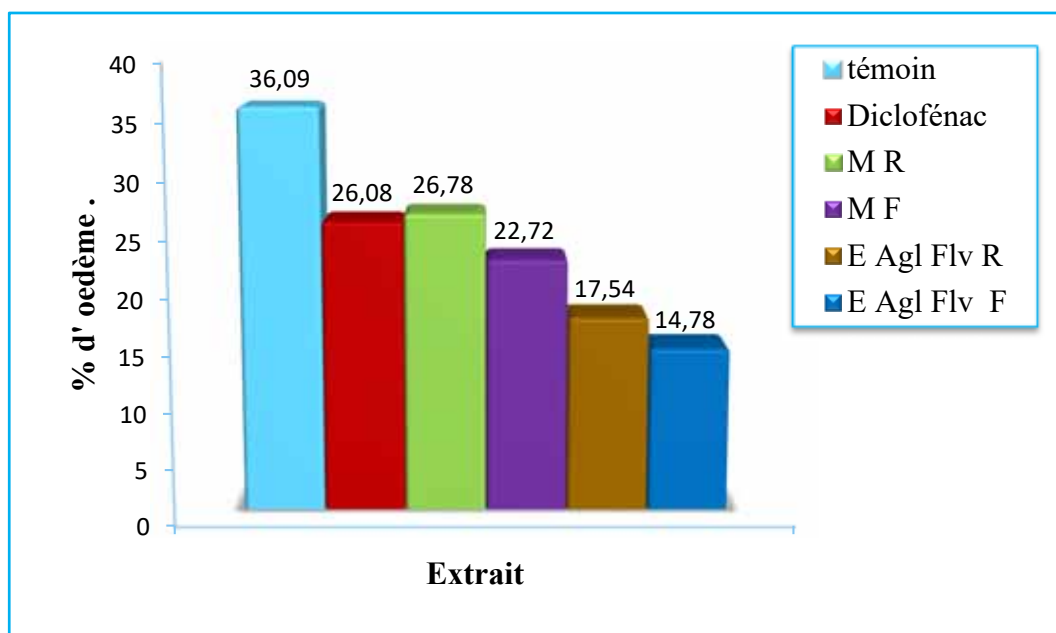
Au vu des résultats, les alcaloïdes sont à l'état de traces dans les deux organes analysés. Néanmoins, ce sont les feuilles qui sont les plus riches en alcaloïdes que les racines, avec une valeur moyenne de l'ordre de $0,001485 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0,000120 \text{ MVS}$. La teneur en alcaloïdes varie suivant les organes, les espèces, le stade de la végétation, l'habitat et la génétique

(BEZANGER-BEAUQUESNE, 1958). La différence des teneurs en alcaloïdes entre les organes est probablement due au jeune âge de la plante qui n'a pas encore fini d'élaborer les étapes importantes de son métabolisme secondaire (BADIAGA, 2011), ou encore au fait de leur migration rapide des racines, qui représentent leur lieu de synthèse vers les feuilles.

4. l'activité anti-inflammatoire

4.1 : Pourcentage de l'œdème

Les résultats d'augmentation des pourcentages d'œdèmes sont présentés dans la (fig.11).



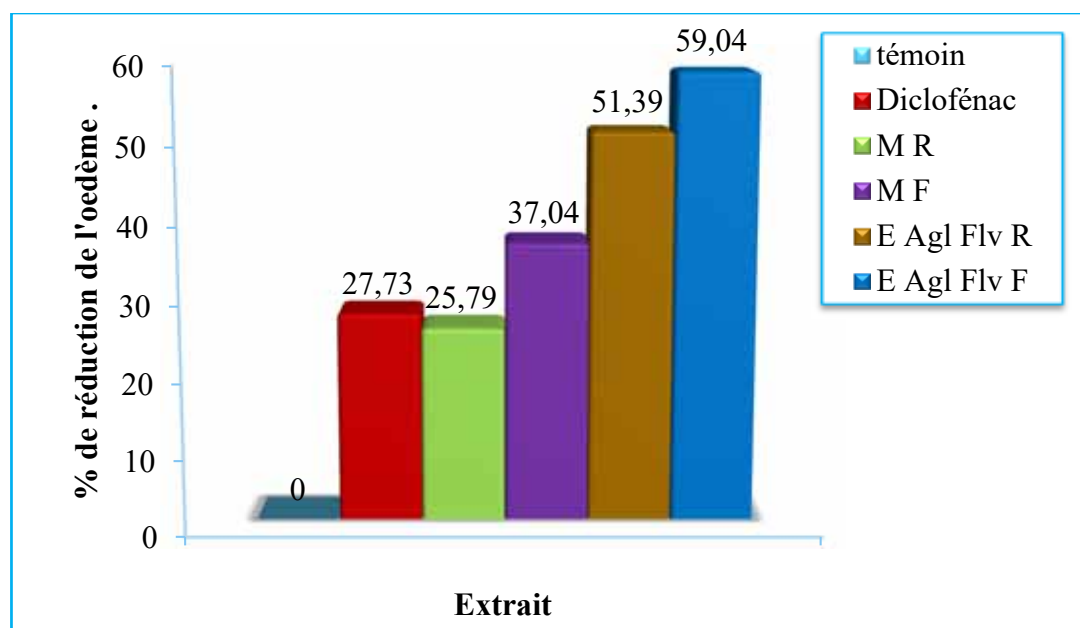
MF : Macérât des Feuilles ; MR : Macérât des Racine, E Agl Flv F : Extrait d'Aglycone Flavoi que des Feuilles, E Agl Flv R : Extrait d'Aglycone Flavoi que des Racines.

Figure 11. Le pourcentage d'œdème

C'est le lot témoin qui représente le pourcentage d'œdème le plus élevé, avec 36.03 %. Par ailleurs, nous notons que le pourcentage d'œdème du lot de référence et celui de macérât de feuilles et racines montrent des valeurs proches, respectivement de ordre de 26.08 %, 22.72 % et 26.78 % alors que le lot de l'extrait d'aglycone flavonique de racines, avec un une valeur de 17.54 %. Cependant l'extrait d'aglycone flavonique des feuilles représente le pourcentage d'œdème le plus faible, de l'ordre de 14.78 %.

4.2. Réduction d'œdème

Les résultats des pourcentages de réduction d'œdème sont représentés dans la (fig.12).



MF :Macérât des Feuilles ; MR : Macérât des Racine , E Agl Flv F : Extrait d'Aglycone Flavoiqe des Feuilles , E Agl Flv R : Extrait d'Aglycone Flavoiqe des Racines.

Figure 12. Le pourcentage de réduction d'œdème

Les résultats obtenus montrent que les extraits aglyconiques des feuilles et racines ont réduit d'une façon appréciable l'œdème, par rapport au produit de référence Diclofenac. En effet, l'extrait d'aglycones flavoniques des feuilles représentent le pourcentage de réduction d'œdème le plus élevé (59.04%) par rapport à celui du produit de référence, qui est de 27.73%. Cependant, nous constatons que le pourcentage de réduction le plus faible est marqué par le macérât de racines (25.9 %).

Les extraits aglyconiques des deux organes analysés ont montré une réaction anti-inflammatoire intéressante. En effet, de nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations (GONZALEZ-GALLEGO *et al.*, 2007).

5. L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits obtenus à partir des feuilles et des racines de *Vitex agnus castus* L (le macérât et l'extrait d'aglycones flavoniques) a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Cette méthode permet de déterminer l'action des différents extraits dissous dans le DMSO vis-à-vis des différentes souches microbiennes, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait. Les résultats de l'évaluation antimicrobienne des extraits sont repris ci-dessous (tableau 5 et Annexe IV). Le tableau 5 représente les valeurs en (mm) des zones ou diamètres d'inhibition de la croissance microbienne, le diamètre de disque (9 mm) est inclus dans les résultats.

Tableau 5. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne des macérâtes et l'extraits flavoniques des feuilles et des racines de *Vitex agnus castus* L.

Les zones d'inhibitions en mm					
Les souches microbiennes Les extraits testés	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	Les normes selon CHIFUNDERA et al.,(1990)
M F	9	9	18	9	ZI = 9 Souche résistante
M R	9	9	21	9	
E Agl Flv R [25 mg/ml]	9	9	9	15	
E Agl Flv R [12.5 mg/ml]	9	9	9	12.5 ±0.7	9 <ZI ≤15 Souche Sensible.
E Agl Flv F [25 mg/ml]	9	9	9	13±1.41	16 ≤ZI≤20
E Agl Flv F [12.5 mg/ml]	9	9	9	10.5±0.7	Souche sensible intermédiaire.
DMSO	9	9	9	9	ZI >20 Souche très Sensible.
Gentamycine (2mg/ml).	25	40	35	-	
Amikoz (1mg/ml).	-	-	-	40	

MF :Macérât des Feuilles ; MR : Macérât des Racine , E Agl Flv F : Extrait d'Aglycone Flavoioue des Feuilles , E Agl Flv R : Extrait d'Aglycone Flavoioue des Racines.

De toutes les souches bactériennes traitées aux différents macérâts et flavoniques des feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L, seul *Staphylococcus aureus*, s'est montré d'un côté très sensible à le macérât des racines avec une zone d'inhibition de 21mm et de l'autre, moyennement sensible à le macérât de feuilles, avec une zone d'inhibition de 18 mm. Cependant, cette réaction des extraits testés sur *Staphylococcus aureus*, est de loin dépassée par rapport à l'effet marqué par la Gentamycine sur la croissance de la bactérie, avec une zone d'inhibition de 35 mm.

Pour ce qui est de la souche fongique, *Candida albicans*, s'est montrée sensible vis-à-vis de des extraits flavoniques des racines et feuilles, avec respectivement des zones d'inhibition de l'ordre de 12.5 ± 0.7 mm et 10.5 ± 0.7 mm, à la concentration de 12.5 mg ml^{-1} .

À la concentration 25 mg ml^{-1} , nous enregistrons le même comportement de *Candida albicans* vis à vis des extraits aglyconiques des racines et feuilles de *Vitex agnus castus* L, avec respectivement des zones d'inhibition de l'ordre de 15mm et de $13 \text{ mm} \pm 1.41$. Cependant, ces effets demeurent très faibles par rapport à celui d'amikoz (antifongique).

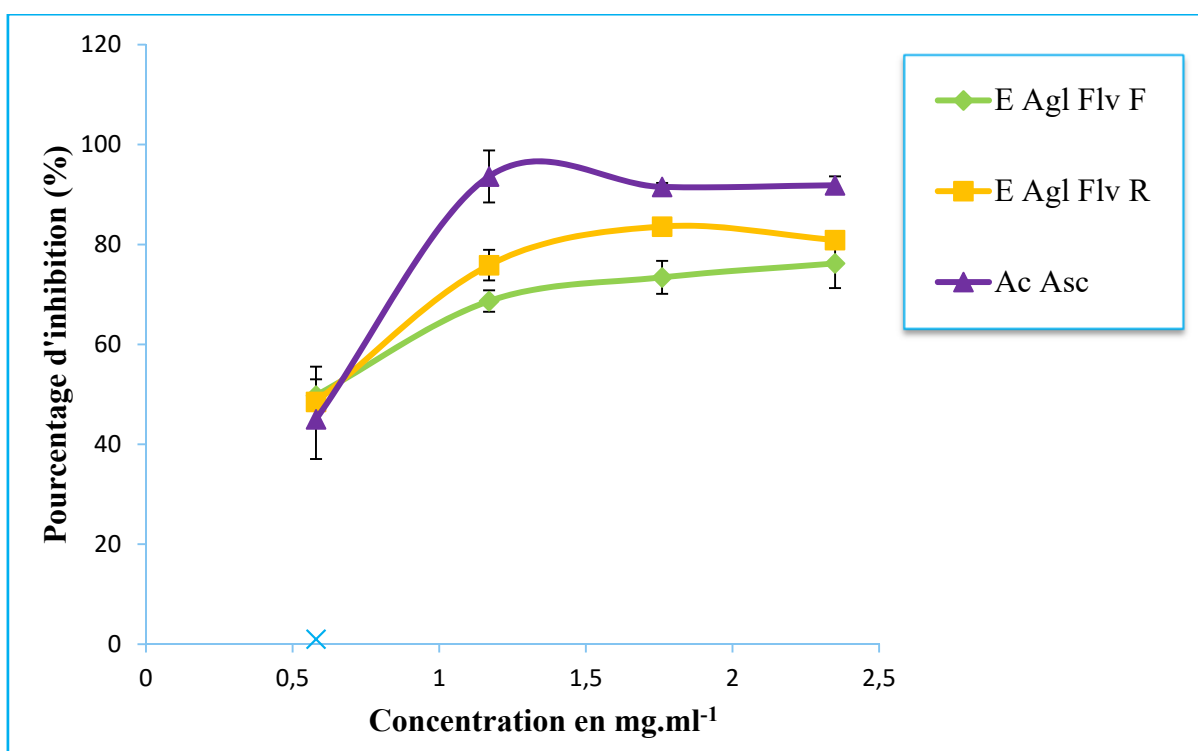
Les aglycones flavoniques ainsi que le macérât des deux organes analysés pourraient constituer une source potentielle de nouveaux antibiotiques. En effet, le macérât de *Vitex agnus castus* L paraît avoir un effet légèrement inhibiteur sur les bactéries gram (+) seulement ; cependant, les extraits d'aglycones flavonique un pouvoir légèrement inhibiteur sur les levures uniquement.

Les réactions positives des extraits d'aglycones flavoniques sur les différentes souches microbiennes sont expliquées par la présence des molécules flavoniques possédant des propriétés antimicrobiennes. En effet, les polyphénols notamment les flavonoïdes sont reconnus pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (COWAN ,1999). La résistance d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* pourrait s'expliquer par le fait que ces bactéries gram (+) possèdent une paroi squelettique, très riche en lipopolysaccharides, ce qui empêcheraient les molécules antimicrobiennes d'y pénétrer. (GHEDADBA et al., 2014).

Plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antimicrobienne comme : le type des micro-organismes ciblés, la concentration, le type de l'extrait (GHEDADBA et al., 2014).

6. L'activité antioxydant

L'activité antioxydante des extraits flavoniques des feuilles et des racines de *Vitex agnus castus* L vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par un spectrophotomètre et mesurée à 517 nm, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (MAJHENIC et al.,2007) Les résultats de l'activité antioxydante des extraits de feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L ainsi que le standard présentés dans la (fig.13).



E Agl Flv F : Extrait d'Aglycone Flavonique des Feuilles, E Agl Flv R : Extrait d'Aglycone Flavonique des Racines, Ac Asc : Acide Ascorbique.

Figure 13. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits de feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L. et de l'acide ascorbique

À partir des résultats obtenus, nous constatons qu'à la plus faible concentration (0.58 mg ml⁻¹), les extraits flavoniques de feuilles et racines présentent une meilleure activité anti radicalaire, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 48,52 % ± 1,54 pour l'extrait d'aglycone flavonique de racines et 49,77% ± 5,77 pour l'extrait d'aglycone flavonique de feuilles. Ces pourcentages sont supérieures à celui marqué par l'acide ascorbique, qui est de l'ordre de 45.03 % ± 7,97 à la même concentration.

Au-delà de cette concentration, l'activité anti radicalaire des composés flavoniques des feuilles et racines ainsi que celle de l'acide ascorbique suit une progression ascendante jusqu'à la valeur de 1.76 mg ml^{-1} , où nous constatons que l'activité reste constante, avec des pourcentages d'inhibitions respectivement de l'ordre de $73.42\% \pm 3,3$; $83.60\% \pm 1,24$ et $91.53\% \pm 0,8$ pour les extraits d'aglycones flavoniques de feuilles et racines et l'extrait d'acide ascorbique.

À partir des équations des régressions linéaires des graphes. Nous avons déterminé pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical libre DPPH ou l'IC₅₀. Une valeur plus faible de l'IC₅₀ indique une activité anti-oxydante plus élevée. Les valeurs sont représentées dans le tableau 6 :

Tableau 6. La concentration d'inhibition (IC₅₀ (en mg /ml) de antioxydant de référence et des extraits testés.

L'extrait testé	Ac Asc	E Agl Flv F	E Agl Flv R
IC ₅₀ (mg ml ⁻¹).	0.16	0.26	0.21

E Agl Flv F : Extrait d'Aglycone Flavoiqque des Feuilles, E Agl Flv R : Extrait d'Aglycone Flavoiqque des Racines, Ac Asc : Acide Ascorbique.

Les résultats consignés dans le tableau 6 montrent que les extraits d'aglycones flavoniques des racines et feuilles présentent respectivement des valeurs de I50 de l'ordre de 0.21 mg ml^{-1} et 0.26 mg ml^{-1} , valeur qui n'est pas très loin de celle enregistrée par l'acide ascorbique, qui est de l'ordre de $0,16 \text{ mg ml}^{-1}$.

L'analyse chimique des feuilles de *Vitex agnus castus* L confirme donc l'existence de propriétés antioxydants révélées par le test DPPH. Ceci est lié à la richesse de *Vitex agnus castus* L. en polyphénols surtout en flavonoïdes, ces derniers sont connus par leurs activités anti-oxydantes et anti-radicalaires (BARRECA *et al.*, 2011 ; OSUAGWN, EME 2013). En effet, ces derniers peuvent être des capteurs puissants des radicaux libres (peroxydes) et peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives (ion superoxyde, radical hydroxyle, oxygène singlet (MONICA *et al.*, 2010). L'action de ces antioxydants est supposée d'être due à leur capacité de donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons dérivée principalement de l'hydroxyle du cycle A des flavonoïdes (LE *et al.*, 2007).



Conclusion

Conclusion

Le présent travail a porté sur l'évaluation de quelques activités biologiques des extraits d'une espèce médicinale, *Vitex agnus castus* L., de la famille des *Lamiaceae*, espèce introduite dans les zones arides du Sahara Algérien et plus particulièrement dans la région d'Adrar.

Le screening phytochimique effectué sur les feuilles et les racines a permis de mettre en évidence diverses classes de métabolites secondaires : les flavonoïdes, les anthocyanes, les alcaloïdes, les tanins (catéchiques et galliques), les mucilages, les glucosides. Cependant, les glucosides sont absents au niveau des racines mais présents au niveau des feuilles. Les saponines se sont avérées absentes dans les deux organes végétatifs analysés. La présence de ces composants est liée à leur rôle important dans les réponses des plantes aux stress environnementaux ou pour assurer un mécanisme de défense aux agressions provoquant des maladies chez les végétaux

Les teneurs en anthocyanes sont quasiment identiques dans les racines et les feuilles, elles sont respectivement de l'ordre de $6,17 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.121 \text{ MVS}$ et $6,33 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.71 \text{ MVS}$. Ces valeurs restent très importantes comparées à celles des aglycones flavoniques dans les deux cas. Néanmoins, ces derniers sont plus importants dans les feuilles, avec une valeur moyenne de l'ordre de 0.96 ± 0.076 . Ce sont les flavones qui sont les plus importantes par rapport au flavonols dans les feuilles avec une teneur moyenne de l'ordre de $0.99 \text{ mg g}^{-1} \pm 0.164 \text{ MVS}$. Cependant, les racines présentent des teneurs quasiment identiques en ces composés, avec respectivement des valeurs moyennes de l'ordre de $0.13 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0.020 \text{ MVS}$ et $0.12 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0.011 \text{ MVS}$.

Le dosage des alcaloïdes a montré que ces composés sont à l'état de traces dans les feuilles et racines de *Vitex agnus castus* L. Néanmoins, ce sont les feuilles qui sont les plus riches que les racines, avec une valeur moyenne de l'ordre de $0,001485 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0,000120 \text{ MVS}$.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire a révélée que l'extraits d'aglycones flavoniques et Les macérâtes des feuille et racines de *Vitex agnus castus* L possèdent une activité anti-inflammatoire.

Les extraits aglyconiques des deux organes analysés ont montré une réaction anti-inflammatoire intéressante. En effet, les résultats obtenus montrent que les extraits aglyconiques des feuilles et racines ont réduit d'une façon appréciable l'œdème, par rapport au produit de référence Diclofenac. En effet, l'extrait d'aglycones flavoniques des feuilles représentent le pourcentage de réduction d'œdème le plus élevé (59.04%), par rapport à celui du produit de référence, qui est de 27.73%. Cependant, nous constatons que le pourcentage de réduction le plus faible est marqué par le macérât de racines (25.9 %).

L'évaluation du pouvoir antimicrobien, a montré que toutes les souches bactériennes testées, se sont révélées résistantes vis-à-vis des deux extraits d'aglycones flavoniques et le macérât de

Conclusion

Vitex agnus castus L. Sauf *Staphylococcus aureus* qui est très sensible à le macérât des racines avec une zone d'inhibition de 21mm et, moyennement sensible à le macérât des feuilles, avec une zone d'inhibition de 18 mm.

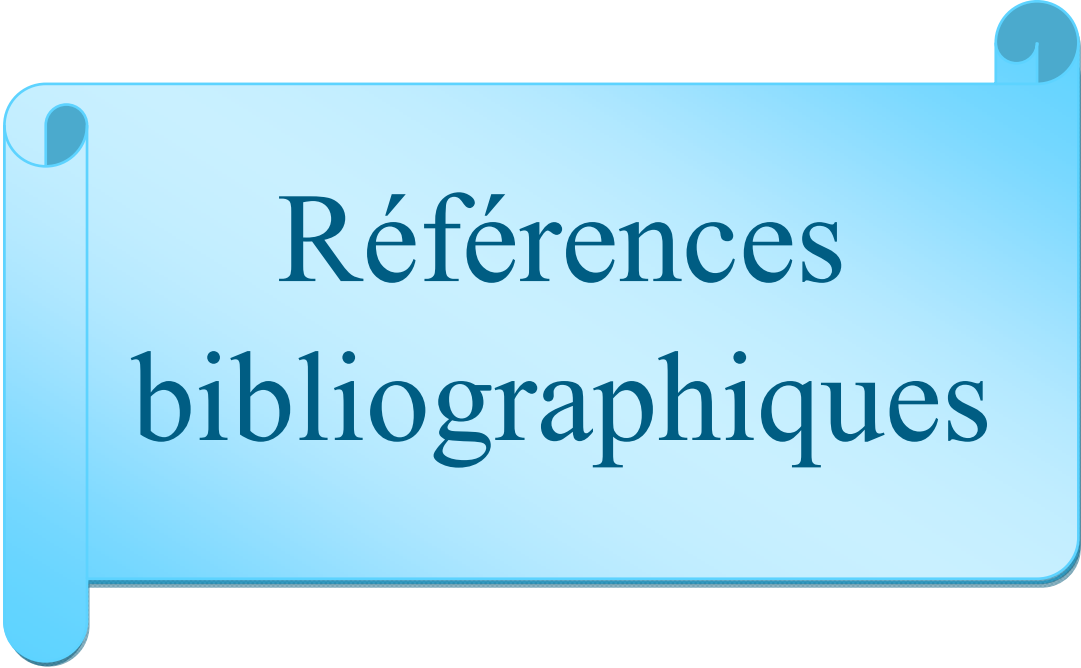
Pour ce qui est de la souche fongique, *Candida albicans*, s'est montrée sensible vis-à-vis de des extraits flavoniques des racines et feuilles, avec respectivement des zones d'inhibition de l'ordre de 12.5 ± 0.7 mm et 10.5 ± 0.7 mm, à la concentration de 12.5 mg ml^{-1} . À la concentration 25 mg ml^{-1} , nous enregistrons le même comportement de *Candida albicans* vis à vis des extrais aglyconiques des racines et feuilles de *Vitex agnus castus* L, avec respectivement des zones d'inhibition de l'ordre de 15mm et de $13 \text{ mm} \pm 1.41$.

L'évaluation du pouvoir antioxydant a indiqué que les extraits d'aglycones flavoniques des feuilles et racines ont montré une efficacité antioxydante. En effet, à la plus faible concentration (0.58 mg ml^{-1}), les extraits flavoniques de feuilles et racines présentent une meilleure activité anti radicalaire, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de $48,52 \% \pm 1,54$ pour l'extrait d'aglycone flavonique de racines et $49,77\% \pm 5,77$ pour l'extrait d'aglycone flavonique de feuilles. Ces pourcentages sont supérieures à celui marqué par l'acide ascorbique, qui est de l'ordre de $45.03 \% \pm 7,97$ à la même concentration.

Au-delà de cette concentration, l'activité anti radicalaire des composés flavoniques des feuilles et racines ainsi que celle de l'acide ascorbique suit une progression ascendante jusqu'à la valeur de 1.76 mg ml^{-1} , où nous constatons que l'activité reste constante, avec des pourcentages d'inhibitions respectivement de l'ordre de $73.72\% \pm 3,3$; $83.60 \% \pm 1,24$ et $91.53\% \pm 0,8$ pour les extraits d'aglycones flavoniques de feuilles et racines et l'extrait d'acide ascorbique.

Ces résultats, suggèrent que *Vitex agnus castus* L pourrait représenter une source naturelle et prometteuse de molécules chimiques qui possède des activités biologiques très importantes. L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, il est souhaitable de

- réaliser des analyses par diverses techniques chromatographiques quantitatives et qualitatives.
- augmenter l'effectif des souches bactériennes et fongiques pour mieux évaluer l'activité antimicrobienne,
- évaluer d'autres activités pharmacologiques telles que les activités : antidiabétique, antispasmodique, antivirale.



Références bibliographiques

Références bibliographiques.

- **AISSAOUI, H., 2010**, Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de type flavonique d'une espèce de la famille des *Verbenacées*, thèse de doctorat, université mentouri constantine, 97 p.
- **ALLAIN, P., 1996**, Les médicaments. Ed ESTEM, Paris.
- **ALLAIS, D., 2008**, Le gattilier, *Actualités Pharmaceutiques*, Vol 47, n°479, p 49-52.
- **ALLARD, J., ROYALL D., KURIAN, R., MUGGLI, R., JEEJEE BHOY, K ., 1994** , Effects of β -carotene supplementation on lipid peroxidation in humans, *Amj Clim Nutr*, 59: 884 – 90.
- **AMIOT, M-J., RIOLLET, C., LANDRIER, J-F., 2009** , Polyphenols et syndrome métabolique, *Dossier thématique* , Vol. 3 - N°5 ,476-481.
- **APG III. The Angiosperm Phylogeny Group, 2009**, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105-121.
- **BABA IASSA, F., 1999**, Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ; Ed : librairie moderne – rouiba ; p : 243 - 244.
- **BADIAGA, M., 2011**, Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.
- **BAHORUN, T., GRESSIER, B., TROTIN, F., BRUNET, C., DINE, T., LUYCKX, M., VASSEUR, J., CAZIN, M., CAZIN, J., PINKAS, M., 1996** , Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations, *Arznei, Forschung* , 46: 1086-1089pp.
- **BAHORUN, T., 1997**, Substances Naturelles actives: La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.
- **BARRECA, D., BELLOCCO, E., CARISTI, C., LEUZZI, U., KUMQUAT, G.G., 2011**, *Fortunella japonica* Swingle juice : Flavonoïd distribution and antioxidant properties. *Food Research International*. Vol. (44): 2190-2197.
- **BATE-SMITH, E., 1954** , The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *J. Linn, Soc. of London* , 58 (371) p 95.
- **BENBRINIS, S., 2012**, Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Thèse de Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas-Sétif. Algérie. 84p .
- **BEZANGER-BEAUQUESNE, L., 1958**, Les alcaloïdes dans les plantes, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 105:5-6, 266-291
- **BOIZOT, N., CHARPENTIER, J., 2006**, Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79 – 82.
- **BOUYER, J., 1996**, Méthodes statistiques, médecine biologie, 139p.

Références bibliographiques.

- **BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C., 1995** , Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 25–30
- **BRUNETON, J., 1993**, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Techniques et Documentation, 2^{ème} Ed ,*Lavoisier* ,Paris, 274-285.
- **BRUNETON, J., 1999**, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3^{ème} éd.). Editions Tec ET Doc *Lavoisier*, Paris, 1120 p.
- **BRUNETON, J., 2009**, Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. 4^{ème}ed, Paris. France. 1288 p.
- **CAHLÍKOVÁ, L., ZAVADIL, S., MACÁKOVÁ, K., VALTEROVÁ, I., KULHÁNKOVÁ, A., HOŠŤÁLKOVÁ, A., KUNEŠ, J., OPLETAL, L., 2011** , Isolation and Cholinesterase Activity of Amaryllidaceae Alkaloids from *Nerine bowdenii* , *Natural Product Communications* , Vol. 6 (12) , 1827 – 1830 pp.
- **CHENNI, M., 2010**, Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *Bryonia dioica* Jacq. Thèse de Magister. Université d'Oranes-Senia, Oran. Algérie. 138 p.
- **CHIFUNDERA, K., BALAGIZI, K., KIZUNGU, B., 1990**, Les empoisonnements et leurs antidotes en médecine traditionnelle au Bushi, Zaire. *Fitoterapia*.65: 307-313.
- **COENE, I., 2004**. Les antioxydants et l'alimentation, nutrition information center NICE, Symposium, 23 Octobre 2004, Bruxelles, Belgique. *Nutrinews*, N°4.
- **COWAN, M.M., 1999**, Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): p 564-570.
- **CRONQUIST, A., 1981**, An Integrated System of Classification of Flowering Plants, *Columbia University Press*, New York, NY.
- **CUENDET, M., 1999**, Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie, Thèse de doctorat, p 24.
- **CYRIL, T., 2001**, Etude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus Roseusen*, vue du développement d'un modèle cinétique, université de Montréal. 28p.
- **DACOSTA, Y., 2003**, Les phytonutriments bioactifs, Ed Yves Dacosta ,Paris ,317p.
- **DU MEE, C., 1993**, *Aust. J. Med , Herb* , 5, 63–65.
- **EBERHARD, T., ROBERT, A., ANNELISE, L., 2005**, Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, Paris. France. 521p.
- **EDEAS, M., 2007**, Les polyphenols et les polyphenols de thé. *Phytothérapie*, 5, 264 – 270.

Références bibliographiques.

- **FALLEH, H., KSOURI, R., CHAIEB, K., KARRAY-BOURAOUI, N., TRABELSI N., BOULAABA, M., ABDELLY, C., 2008**, Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *C. R. Biologies*. Vol. (331). 372-379.
- **FAVIER, A., 2003**, le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108- 115pp.
- **FRAGA, C. J et OTEIZA, P. I., 2011** , Dietary flavonoides : Role of (-) – epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 813 – 823.
- **GEE, J.M., JOHNSON, I.T., 2001** , Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 1-182.
- **Gehin, A., Guyon C., Nicod L.** Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 2006, 22, 27-34.
- **GHEDADBA, N., BOUSSELSA, H., HAMBABA, L., BENBIA, S., MOULOUD ,Y.2014** , Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* ,12:15-24 .
- **GHESTEM, A., SEGUIN, E., PARIS, M., ET ORECCHIONI ,A.M., 2001.** Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème}Ed *TEC&DOC*. Paris. pp275.
- **GONZÁLEZ-GALLEGO, J., S. SÁNCHEZ-CAMPOS, AND M.J. TUÑÓN, 2007**, Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion hospitalaria*. 22 (3): p. 287-293.
- **HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C-A., 2000**, Advances in flavonoid research since 1992.
- **HARBORNE, J-B., HERBERT, B., 1995**, Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Bristo : Taylor et Francis. 791p.
- **HOPKINS, W. G., 2003**, Physiologie végétale. *De Boeck Supérieur*, p 280.
- **JACQUES, B., ANDRE, R., 2004**, Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219.
- **KANOUN, K., 2011**, Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Thèse de Magister en Biologie. Université aboubekr belkaid -Tlemcen. Algérie.110 p.
- **KHADIR,A.,BENDAHOUM., BENBELAID, F.,ABDOUNE,M-A., ABDELOUAHID,D-E.,2013**,Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf, récolté en Algérie ; *Phytothérapie* ; 1-6.
- **KUMAR, V., COTRAN, S., ROBBINS, L., 2003**, Robbins Basic Pathology, Saunders. *Komplementmed*.16: 79–90.
- **LARACINE, C., 1984** ; Etude de la variabilité flavonique infra-spécifique chez deux conifère : le *Pin sylvestre* et le *Genévrier commun*, Thèse de doctorat, université de Lyon I.

Références bibliographiques.

- **LE, K., CHIU, F., NG, K., 2007**, Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii. *Food Chemistry*. Vol. (105): 353-363.
- **LEBRETON, P., JAY, M., VOIRIN, B., 1967**, Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes, *Chimie Analytique*, Paris, 49(7): 375 – 383 pp.
- **LEVY, L., 1969**, Carragenan paw edema in the mouse. *Life Sci.*; 8, 601 -606
- **MAJHENIC, L., KERGET, M.S., KNEZ, Z., 2007**, Antioxidant and antimicrobial activity of Guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104: 1258–1268.
- **MAJNO, G., JORIS, I., 2004**, Cellules, tissus et maladies. Oxford Univ. Press.
- **MAKHLOUFI, 2010**, Etude des activités antimicrobienne et anti-oxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre. Thèse de doctorat d'état en biologie, université aboubaker belkaid, Tlemcen. Algérie. 136 p.
- **MASSAUX, C., 2012**, Polyphénols : des alliés pour la santé ; *abeilles & Cie* ; n°149 ; 1-4p.
- **MAURO, N. M., 2006**, Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.
- **MEDDOUR, A., YAHIA, M., BENKIKI, N., AYACHI, A., 2013-** Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis Spinosa* L. *Lebanese Science Journal*. Vol. (14): 49-60.
- **MEDIC-SARIC, M., JASPRICA, I., SMOLCIC, A., MOMAR, A., 2003** ; Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids ; *Croatica Chemica Acta* ; Vol.77 ; N°1-2 ; p:361-366.
- **MILCENT, R., Chau, F., 2003**, Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentale, chimie et biochimie des principaux composés naturels. Ed. Francois chau EDP. Paris. France. 846p.
- **MOHAMED OUALI, D., 2016**, Travaux en cours.
- **MOHAMMEDI, Z., 2013**, Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 169 p.
- **MOHR, K., LÜLLMANN, H., ZIEGLER, A., 2001** , Atlas de poche de pharmacologie. Flammarion, *Médecine-Science*. 384p.
- **MONEB, A., IBRAHIM, R-K., ROY, R., SARHAN, F., 2011** , Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation. *Phytochemistry*, 72, 2294 – 2307.
- **MONICA, G., SANDRA, V.V., PATRICIA, I.O., CESAR, 2010**, Antioxdant action of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analys. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501p.
- **NIU Wei et al., 2012**, Study on the Extraction Method of Alkaloids from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem (Research Institute of Horticultural Products Transport and Preservation, College of Horticulture) , Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 19p.

Références bibliographiques.

- **OUEDRAOGO, Y., NACOUлма, O., GUISSOU, I.P., GUEDE GUINA, F., 2001-**, Evaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* (willd.)o.ktz (rubiaceae). *Pharm. Méd. Trad.* Vol. (11). 13-29.
- **OZANDA, P., 1991**, Flore et végétation du Sahara 3^{ème} éd. Ed. CNRS, Paris, France. 662 p.
- **POTTIER, G., 1981**, *Artémisia herba alba* Flore de Tunisie: angiospermes dicotylédones gamopétales, 1012p.
- **QUEZEL, P., SANTA, S., 1963**, Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Vol II), Paris, Centre National de la Recherche Scientifique.
- **RIBEREAU-GAYON, P., 1986**, les composés phenoliques des vegetaux, Ed, *Dumond*, Paris, 245 p.
- **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.
- **SAMARTH, R.M., PANWAR, M., SONI, A., KUMAR, M., KUMAR, A., 2008**, Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract *Food Chemistry*, 106, 868-873.
- **SANCHEZ-MORENO C., LARRAURI J.A., SAURA-CALIXTO F. ; 1998**. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Sci. Technology International*, 8, 121-137.
- **SEYOUM, A., ASRES, K., EL-FIKY, F.K., 2006**, Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids , *Phytochemistry* ,67: 2058–2070 .
- **SHARIFIFAR, F., DEHGHN-NUDEH, G., MIRTAJALDINI, M., 2009**; Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L, *Food Chem*112: 885-888.
- **SINGH, U., DEVARAJ, S., JIALAL, I., 2005**, vitamine oxidative stress and inflammation, *Annual Review of Nutrition*, 25, 151-175pp.
- **SINGLETON, V.L; ROSSI, J.A., 1965**, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- **SUN, L., ZHANG, J., LU, X., ZHANG, L., ZHANG, Y., 2011**, Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol.* 49: 2689-2696.
- **TELA-BOTANICA, 2015**, le réseau de la botanique francophone.
- **TEIXEIRA, DA SILVA, J. A., 2004**, Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. (3): 706-720.
- **TRAORE, M. C., 2005**, Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse De Doctorat. Université De Bamako, Mali.

Références bibliographiques.

- **TREASE, G., EVANS, W., 1987**, Textbook of Pharmacognosy. Ed13, *Balliere Tindall*, London.
- **ULANOWSKA, K., MAJCHRZYK, A., MOSKOT, M., JAK BKIEWICZ-BANECKA, J. AND_ÂGRZYN, G., 2007**, Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures, *Biologia*, 62: 132-135.
- **VALSARAJ, R., PUSHPANGADAN, P., SMITT, U.W., ADSERSEN, A., CHRISTENSEN, S. R. B. G., SITTIE, A., NYMAN, U., NIELSEN, C., OLSEN C. E. 1997**; New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod.* 60: 739-742.
- **VANSANT, G., 2004**, Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Ed Institut Danone.
- **WÄCHTER, G.A., HOFFMANN, J., FURBACHER, T., BLAKE, M-E., TIMMERMANN, B-N., 1999**, Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*, *Phytochem* 52: 1469-1471.
- **ZAHID, H., RIZWANI, H., ISHAQE, S., 2016**; Phytopharmacological Review on *Vitex agnus-castus* : A Potential Medicinal Plant ; *Chinese Herbal Medicines*, 8(1): 24-29 PP.

Site internet

- **WWW.GOOGLE MAP.COM**
- **WWW.GOOGLE.Vitex agnus castus L. /HABITAT**



Annexes

- Préparation de réactif stiasny :

10 ml de formol à 40% et 5 ml d'HCL concentré

- Préparation de la 1^{ère} dilution :

2,9 ml d'éthanol + 0,1 ml de l'extrait éthanolique

- Préparation de la 2^{ème} dilution :

2,9 ml d'Al Cl₃ + 0.1 ml de l'extrait éthanolique

- Préparation de la carragénine 1% :

1 g de carragénine	—————>	100ml d'eau distillée.
X	—————>	50ml d'eau distillée.

Donc :

$$X = 50 \times 1 / 100 = 0.5g$$

Pour la préparation : on met 25ml d'eau distillée dans un petit bécher, on lui ajoute progressivement de la carragénine (0.5g), puis on ajuste le volume à 50ml avec de l'eau distillée.



Figure 14 .Décantation



Figure15. Spectrophotomètre de type
« JENWAY 6305 UV / VIS»



Figure 16. Rotavapor de type BÜCHI

Tableau 7 : Les résultats de screening phytochimique des feuilles de *Vitex agnus castus* L.

Métabolites secondaires de feuilles	Après le test	Interprétation
Anthocyane		+
Tanins		+
Tanins catéchiques		+
Tanins galliques		+
Flavonoïdes		+



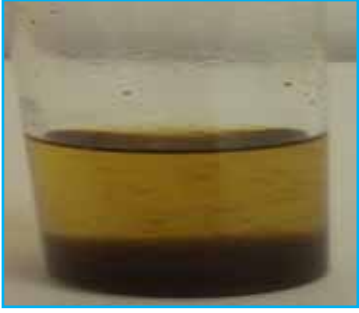








<p>Alcaloïdes</p>		<p>+</p>
<p>Glucosides</p>		<p>+</p>
<p>Mucilages</p>		<p>+</p>

Tableau 8 : Les résultats de screening phytochimique des racines de *Vitex agnus castus* L.

Métabolites secondaires de racines.	Après le test	Interprétation
Anthocyane		+
Tanins		+
Tanins catéchiques		+
Tanins galliques		+
Flavonoïdes		+

Alcaloïdes		+
Glucosides		-
Mucilages		+

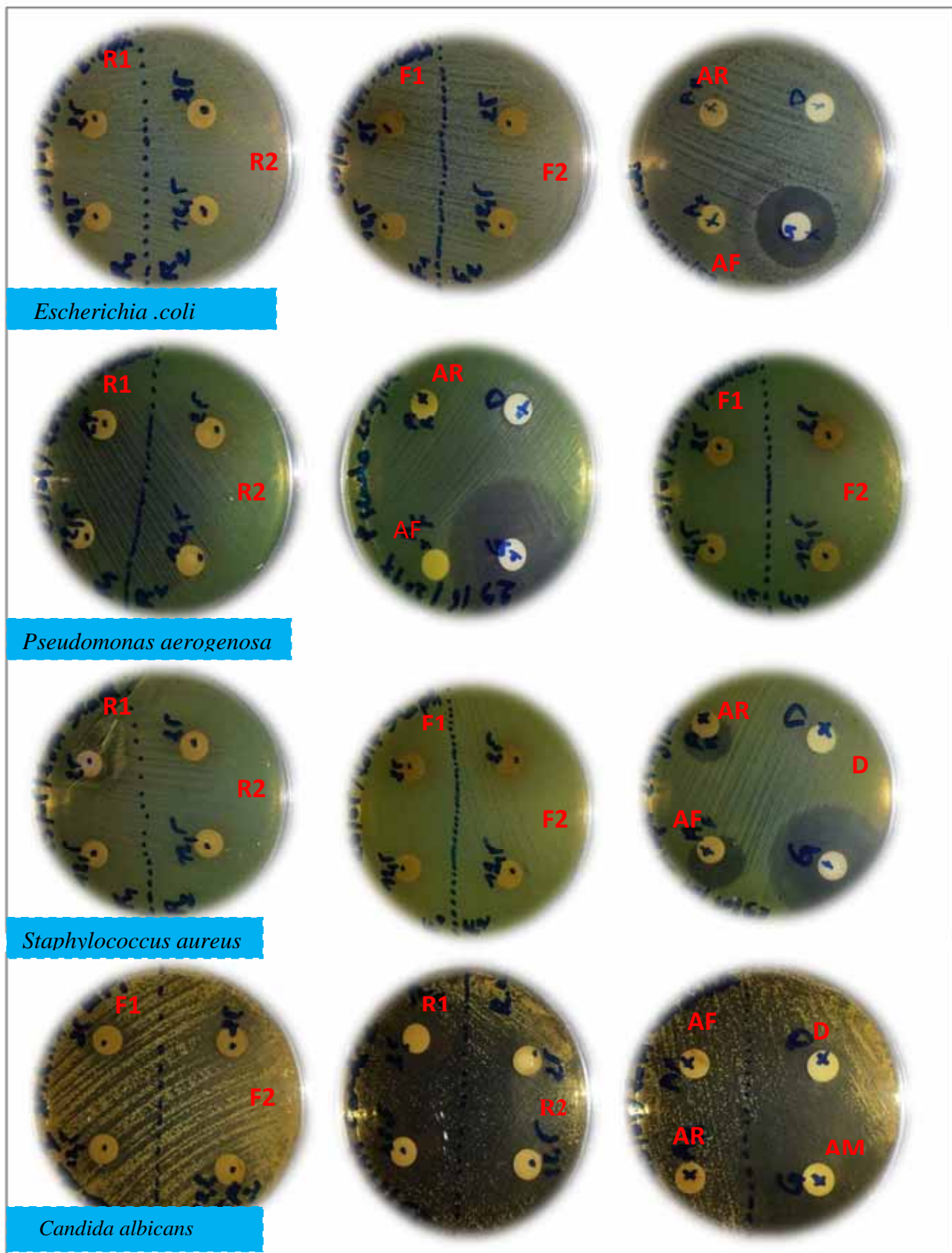


Figure 17 : Résultats du test antimicrobien