



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre
et de l'Univers Département de Biologie



Laboratoire de recherche

« Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

MÉMOIRE

Présenté par : **KADDOURI IMANE**

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

**Evaluation de l'activité antioxydante de quelques extraits de gattilier
« *Vitex agnus-castus* »**

Soutenu le 13/06/2024 devant le jury :

Mme Merghache D.	MCA	Présidente	Université de Tlemcen
Mme Adida H.	MCA	Examinatrice	Université de Tlemcen
Mme Belkacem N.	MCA	Promotrice	Université de Tlemcen

Année universitaire 2023/2024

Remerciements

Tout d'abord Nous remercions le dieu pour nous avoir donné la force, la volonté et le courage pour réaliser ce travail.

Mes remerciements vont également à **Mme Belkacem N.** Maître de conférences A au Département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, pour m'avoir accordé l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, sa gentillesse, sa compréhension, et ses précieux conseils ont été inestimables.

J'exprime mes remerciements à **Mme Merghache D.** Maître de conférences A au Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen - d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à remercier **Mme Adida H.** Maître de conférences A au Département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner attentivement mon travail.

Je souhaite remercier tous les membres du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » pour leur aide

Enfin, je remercie gracieusement toute personne qui a m'ont aidé ou encouragé, de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Je souhaite remercier spécialement ma collègue **Betoui Khadidja** pour sa gentillesse et leur aide

Dédicace

Grâce à l'aide de Dieu Tout-Puissant, j'ai réussi à terminer ce modeste travail.

C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail à mes chers parents **Lamia** et **Boucef** pour leur encouragement durant mon parcours scolaire, leur soutien, leur amour, leur patience.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers mon cher frère, **Abd el Ilah** et ma sœur **Radja** pour leurs encouragements et leurs soutiens.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Introduction	02
Chapitre 1 : <i>Vitex agnus castus</i>	
1. Description botanique	05
2. Noms communs de <i>V. castus</i>	07
3. Répartition géographique.....	07
4. Utilisation traditionnelle.....	07
5. Classification botanique.....	07
6. Composition chimique.....	08
7. Activités biologiques.....	09
8. Autres activités.....	10
Chapitre 2 : Les métabolites secondaires et leur pouvoir biologique	
1. Les métabolites secondaires.....	12
1.1. Composés phénoliques.....	12
1.2. les tanins.....	13
1.3. flavoïdes.....	14
1.4. les alcaloïdes.....	16
1.5. les saponines	16
1.6. les terpenoïdes	17
1.7. les quinones.....	18
Chapitre 3 : Stress oxydatif	
1. Définition du stress oxydatif.....	20
2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	21
3. Les radicaux libres.....	21
4. Les antioxydants.....	22
5. Sources d'antioxydants.....	22

6. Conséquences du stress oxydatif.....	23
7. Mécanismes d'action des antioxydants.....	23
8. Les méthodes les plus utilisés dans l'étude de l'activité antioxydante.....	23

PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal.....	28
2. Analyses phytochimique.....	30
3. Dosage des composés phénoliques.....	31
4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	33

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

1. Calcul des rendements d'extraction.....	37
2. Analyses phytochimiques.....	37
3. Teneurs des composés phénoliques.....	38
4. Activité antioxydante.....	40
Discussion	47
Conclusion	52
Références bibliographies	54

Liste des abréviations

ABTS: Acide 2,2-azino-bis-ethyl benzothiaziline-6-sulfonique.

APG III: Angiosperm phylogeny group III.

BHA: Hydroxyanisol butylé.

BHT: Hydroxytoluène butylé.

DPPH : 2-2-diphénylepicrilylhydrazyl.

ERO : Espèces réactives oxygénées.

FRAP: Ferric reducing antioxidant power.

V.Castus : *Vitex agnus castus*

Liste des figures

Figure n°1 : Les feuilles de <i>V. castus</i>	05
Figure n°2 : La plante de <i>V. castus</i>	06
Figure n°3 : Les fleurs de <i>V. castus</i>	06
Figure n°4 : Les fruits de <i>V. castus</i>	06
Figure n°5 : Les différents groupes des phénols	13
Figure n°6 : Structures d'un tanin condensés	14
Figure n°7 : Structure de base de flavonoïde	15
Figure n°8 : Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes.....	15
Figure n°9 : Structure de base des saponines.....	17
Figure n°10 : Structure de la molécule d'isoprène.....	17
Figure n°11 : Structure d'une molécule de quinone	18
Figure n°12 : La balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants..	20
Figure n°13 : Changement chimique dans le test CUPRAC.....	24
Figure n°14 : Modifications des radicaux ABTS avec le persulfate de potassium.....	25
Figure n°15 : Modifications de l'activité de suppression des radicaux DPPH.....	25
Figure n°16 : Mécanisme de réaction du ferricyanure de potassium	26
Figure n° 17 : Protocole expérimental réalisé sur <i>V. castus</i>	29
Figure n°18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.....	38
Figure n° 19 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	38
Figure n°20 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.....	39
Figure n°21 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait aqueux	40
Figure n°22 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait eau éthanol.....	40
Figure n°23 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait eau acétone.....	40

Figure n°24 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par l'acide ascorbique.....	41
Figure n°25 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par le BHA.....	41
Figure n°26 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par le BHT.....	42
Figure n° 27 : Pouvoir réducteur du fer par l'extrait aqueux	43
Figure n°28 : Pouvoir réducteur du fer par l'extrait eau éthanol.....	43
Figure n°29 : Pouvoir réducteur du fer par l'extrait eau/acétone.....	43
Figure n°30 : Pouvoir réducteur du fer par l'acide ascorbique.....	44
Figure n°31 : Pouvoir réducteur du fer par le BHA.....	44
Figure n°32 : Pouvoir réducteur du fer par le BHT.....	45

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Classification botanique selon APGIII (2009).....	08
Tableau n°2 : Classification selon Cronquist (1981).....	08
Tableau n°3 : Activités biologiques de la plante.....	09
Tableau n°4 : Rendements des différents extraits de <i>V. castus</i>	37
Tableau n°5 : Les résultats du testes phytochimique des extraits de <i>V. castus</i>	37
Tableau n°6 : Résultats du dosage des polyphénols totaux.....	39
Tableau n°7 : Valeurs des IC ₅₀ des extraits et des molécules de référence (DPPH)	42
Tableau n°8 : Valeurs des EC ₅₀ des extraits et des molécules de référence (FRAP).....	45

المخلص

هذه الدراسة تستهدف البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية في نبات شجرة مريم من خلال إجراء دراسة كيميائية واختبارات تقييم القدرة المضادة للأكسدة بواسطة طريقتي DPPH و FRAP. وذلك باستخدام ثلاث مستخلصات (مائي، ماء/الإيثانول وماء/الأسيتون 30:70، حجم/ حجم).

أظهرت نتائج التحليل الفيتوكيميائي لهذه المركبات أن مستخلص ماء/الأسيتون غني بشكل خاص بالمركبات الفينولية، كما تبين أن أعلى تراكيز للفلافونويد والبوليفينول موجودة في مستخلص ماء/الإيثانول بنسبة (2.16 ± 34.63) مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد و (0.00 ± 151.37) مغ مكافئ حمض الغاليك في الغرام الواحد) على التوالي. بينما وجد أكبر تركيز من العفص المكثف في مستخلص ماء الأسيتون بمعدل (0.00 ± 69.70) مغ مكافئ كاتشين في الغرام الواحد).

بالنسبة للاختبارات الحيوية في نشاط المضاد للأكسدة تبين أن المستخلصات العضوية لهذا النبات لها قدرة ملحوظة على إرجاع الحديد والتخلص من الجذور الحرة DPPH•، كما أظهرت النتائج أن مستخلص ماء/الأسيتون له نشاطاً مضاداً قوياً قدره 7.95 مغ/مل، وهي نسبة جد عالية مقارنة بمستخلص ماء/الإيثانول (18.41 مغ/مل) ومستخلص الماء (102.62 مغ/مل)، إذن مستخلص ماء/الأسيتون يكتسب نشاطاً معتبراً كمضاد للأكسدة ولكن يظل حمض الأسكوربيك يمثل أكبر نشاط (0.05 مغ/مل) بكونه جزيء مرجعي.

كشفت تقنية FRAP أن مستخلص ماء/الأسيتون يتميز بقدرة إرجاع حديد ممتازة وتقدر ب 11.62 مغ/مل مقارنة بالمستخلصات الأخرى المدروسة أما بالنسبة للجزيئات المرجعية فإن حمض الأسكوربيك يمثل أعلى قدرة بمعدل 0.53 مغ/مل.

وفقاً لهذه النتائج، نلاحظ أن نبات شجرة مريم يعد مصدراً غنياً بالجزيئات المضادة للأكسدة و التي تلعب دوراً أساسياً في تحييد الجذور الحرة، مما يقلل من الأضرار التأكسدية للخلايا. إذن هذه النتائج تفتح الطريق لاستخدام نبات شجرة مريم في العلاجات النباتية التي تستهدف الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي.

الكلمات المفتاحية: شجرة مريم، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة.

Résumé

Ce travail explore la recherche d'antioxydants naturels et vise à réaliser une étude phytochimique tout en évaluant l'activité antioxydante de divers extraits de *V.castus*. L'extraction du matériel végétal a été effectuée sous reflux en utilisant trois solvants : eau , eau/éthanol et eau/acétone (30 :70, v/v). Les extraits obtenus ont été soumis à une analyse phytochimique, à un dosage des composés phénoliques, ainsi une évaluation du pouvoir antioxydant selon deux méthodes : DPPH et FRAP.

L'analyse phytochimique a révélé que l'extrait eau/acétone de *V.castus* est particulièrement riche en quinones libres, en terpénoïdes et en tanins. Le dosage de composé phénolique indique que la concentration la plus élevée de tanins est obtenue dans l'extrait eau/acétone, avec une teneur de $69,70 \pm 0,00$ mg EQC/gE , tandis que les concentrations en flavonoïdes et en polyphénols totaux les plus élevées sont obtenues dans l'extrait eau/éthanol ($34,63 \pm 2,16$ mg EQC/gE) ; ($151,37 \pm 0,00$ mg EAG/gE) respectivement.

Les résultats de l'activité antioxydante ont montré que les extraits organiques de cette plante présentent une capacité à réduire le fer et à piéger le radical DPPH•. Pour ce dernier, l'extrait eau/acétone montre une forte activité antioxydante avec une IC₅₀ de 7,95 mg/ml, une capacité nettement supérieure à celle de l'extrait eau/éthanol (IC₅₀ de 18,41 mg/ml) et de l'extrait aqueux (IC₅₀ de 102,62 mg/ml). Par ailleurs, l'acide ascorbique, a montré l'activité antiradicalaire la plus puissante avec une IC₅₀ de 0,05mg/ml.

En ce qui concerne la méthode FRAP, l'extrait eau/acétone présente la meilleure activité avec une EC₅₀ de 11,62 mg/ml. L'extrait aqueux, qui montre le plus faible pouvoir réducteur, a une EC₅₀ de 633,33 mg/ml, et l'extrait eau/éthanol a une EC₅₀ de 18,66 mg/ml. En comparaison, la capacité de ces extraits à réduire le fer est nettement inférieure à celles du l'acide ascorbique, BHA et BHT. Par ailleurs, l'acide ascorbique présente le meilleur pouvoir réducteur du fer (EC₅₀ = 0,53 mg/ml) par rapport aux autres standards.

D'après ces résultats on note que *V. castus* constitue une source de molécules antioxydantes qui jouent un rôle clé dans la neutralisation des radicaux libres, réduisant ainsi les dommages oxydatifs. Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation de *V. castus* dans le développement de traitements phytothérapeutiques ciblant les maladies liées au stress oxydatif.

Mots Clés : *Vitex agnus castus*, Composés phénoliques, Activité antioxydante.

Abstract

This work explores the search for natural antioxidants and aims to conduct a phytochemical study while evaluating the antioxidant activity of various extracts from *Vitex agnus-castus* (*V. castus*). The extraction of plant material was carried out under reflux using three solvents: water, water/ethanol, and water/acetone (30:70, v/v). The obtained extracts were subjected to a phytochemical analysis, phenolic compound quantification, and an evaluation of antioxidant power using two methods: DPPH and FRAP.

Phytochemical analysis revealed that the water/acetone extract of *V. castus* is particularly rich in free quinones, terpenoids, and tannins. The phenolic compound quantification indicates that the highest concentration of tannins is found in the water/acetone extract, with a content of 69.70 ± 0.00 mg EQC/gE. Meanwhile, the highest concentrations of flavonoids and total polyphenols are found in the water/ethanol extract, with 34.63 ± 2.16 mg EQC/gE and 151.37 ± 0.00 mg EAG/gE, respectively.

The results of the antioxidant activity showed that the organic extracts of this plant possess the ability to reduce iron and scavenge the DPPH• radical. For the latter, the water/acetone extract demonstrates strong antioxidant activity with an IC₅₀ of 7.95 mg/ml, which is significantly higher than that of the water/ethanol extract (IC₅₀ of 18.41 mg/ml) and the aqueous extract (IC₅₀ of 102.62 mg/ml). Additionally, ascorbic acid exhibited the most potent radical scavenging activity with an IC₅₀ of 0.05 mg/ml.

Regarding the FRAP method, the water/acetone extract presents the best activity with an EC₅₀ of 11.62 mg/ml. The aqueous extract, showing the lowest reducing power, has an EC₅₀ of 633.33 mg/ml, and the water/ethanol extract has an EC₅₀ of 18.66 mg/ml. In comparison, the iron-reducing capacity of these extracts is significantly lower than that of ascorbic acid, BHA, and BHT. Furthermore, ascorbic acid demonstrates the best iron-reducing power (EC₅₀ = 0.53 mg/ml) compared to other standards.

These results indicate that *V. castus* constitutes a source of antioxidant molecules that play a key role in neutralizing free radicals, thereby reducing oxidative damage. These findings pave the way for the use of *V. castus* in developing phytotherapeutic treatments targeting diseases related to oxidative stress.

Keywords: *Vitex agnus castus*, Phenolic Compounds, Antioxidant Activity.

Introduction

INTRODUCTION

Pendant des siècles, des plantes et des herbes sauvages ont été considérées comme des outils utiles pour traiter diverses maladies. Les plantes fournissent environ 25 % des médicaments prescrits dans le monde en raison de leur richesse en substances actives telles que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines, les quinones, les polyphénols vitaminiques, les glycosides et les huiles essentielles. Ces composés naturels, possèdent des propriétés permettant de lutter contre les ravageurs, les bactéries, les virus et les champignons (**Habbab, 2016**).

Les plantes aromatiques et médicinales suscitent un intérêt économique considérable en raison de leur utilisation dans les industries de la parfumerie, des cosmétiques, de l'agroalimentaire et de la pharmacie. Ainsi sont largement utilisés dans les systèmes médicaux traditionnels en raison de leurs propriétés phytochimiques et bioactives qui présentent des effets pharmacologiques significatifs (**Bruneton, 2009 ; Rahmatullah, 2011**).

Ces dernières années, un intérêt croissant s'est manifesté pour diverses activités biologiques, notamment l'activité antioxydante des plantes médicinales. Cette attention découle de leur implication dans la prévention de maladies chroniques telles que le cancer, le diabète, l'hypertension, la maladie d'Alzheimer, ainsi que dans la lutte contre le stress oxydatif (**Meddour et al., 2013**).

De nombreuses maladies ont des complications ou sont déclenchées par le stress oxydant. Le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux, ce qui fait que la majorité des maladies induites par le stress oxydant se manifestent avec l'âge (**Meddour et al., 2013**).

L'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydantes et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes utilisées rarement ou peu fréquemment dans la médecine traditionnelle. Ces plantes sont une nouvelle source de composés actifs (**Teixeira da Silva, 2004**).

Vitex agnus castus appartient à la famille des Verbénacées et est également connu sous les noms communs de gattilier et de poivre des moines. Il peut être trouvé dans les environnements d'Asie centrale, de la région méditerranéenne et du sud de l'Europe, et est également récolté dans différentes régions (**Niroumand et al., 2018**).

INTRODUCTION

Traditionnellement, *V. castus* a été utilisé par les praticiens de la phytothérapie pour traiter divers troubles féminins, tels que les irrégularités menstruelles les déséquilibres hormonaux prémenstruels, l'hyperprolactinémie, l'infertilité, l'acné, les symptômes de la ménopause et les problèmes d'allaitement (Danieel, 2005).

Face à la prévalence croissante des maladies liées au stress oxydatif et à la demande croissante de solutions thérapeutiques naturelles, quelle est l'efficacité de *V. castus* en tant qu'agent antioxydant ? À travers une analyse de ses composés phytochimiques, l'objectif de cette étude est de mener une analyse phytochimique et d'évaluer l'activité antioxydante de différents extraits de la *V. castus*.

Ce travail débute par une synthèse bibliographique qui comporte trois chapitres, Le premier définit les généralités sur la plante de *V. castus*, sa composition chimique et ses activités biologiques. Le deuxième chapitre illustre les métabolites secondaires et les composés phénoliques. Pour le troisième donnera un aperçu sur le stress oxydatif et les sources d'antioxydants.

Pour la deuxième partie, regroupera le matériel et les méthodes utilisé dans notre expérimentation et les résultats obtenus avec une interprétation, suivie d'une discussion. Enfin, nous terminons avec une conclusion générale et des perspectives.

Partie 1 :
Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :
Vitex agnus castus

1. Description botanique

Le genre *Vitex*, le plus étendu de la famille des Verbénacées, compte 250 espèces réparties à travers le monde. Les plus répandus sont : *V. canescences*, *V. cooper*, *V. cymosa*, *V. fisherii*, *V. gardneriana*, *V. glabrata*, *V. leptobotrys*, *V. scabra*, *V. ptygama*, *V. agnus castus* L (Senafilho *et al.*, 2008 ; Rani et Sharma, 2013).

V. castus est classifiée soit comme un arbuste de grande taille soit comme un arbre de petite taille, avec une hauteur moyenne variant entre 1,5 et 2 mètres. Ses feuilles caduques ont un diamètre compris entre 7,6 et 10 cm et sont de type palmé, chaque feuille étant composée de 5 à 7 folioles digitiformes (fig. n°1). Après le séchage, cela devient comme des doigts (fig. n°2).

Les feuilles de cette plante sont aromatiques, présentant une couleur gris-vert avec un revers plus clair. Ses fleurs, groupées en grappes, varient du violet au bleu et jusqu'au violet foncé, et sont parfumées. Elles éclosent de l'été jusqu'au début de l'automne (fig. n°3). Les fruits sont des baies violettes qui contiennent chacune quatre graines ressemblant à du poivre noir (fig. n°4) (Niroumand, 2018).



Figure n° 1 : Les feuilles de V. castus (Zahid et al., 2016)



Figure n°2 : La plante *V. castus*

<https://www.iqrashop.com/Chajarat-Mariam-Gattilier-Rose-de-Jericho-Kef-Meriem--Sante-Dietetique-p14144-.html>



Figure n°3 : Les fleurs de *Vitex agnus-castus* (Zahid et al., 2016)



Figure n°4 : Les fruits de *Vitex agnus-castus* (Zahid et al., 2016)

2. Noms communs de *V. agnus castus*

V. castus est appelé sous plusieurs noms, dont l'un est Kef Meriem, Le gattier, l'agneau charnu, le petit poivre, le poivre sauvage, l'herbe à poivre, l'arbre à poivre, le Berry charnu La baie de l'arbre chaste, l'arbre chaste, l'arbre du chanvre, le poivre du moine et Khrouaâ se trouvent dans la région d'Adrar (Grieve, 1982).

3. Répartition géographique

Originaire d'Asie centrale, le gattilier s'est par la suite répandu dans différentes régions du monde, notamment dans les vallées des pays méditerranéens, principalement dans les zones côtières rocheuses. Il trouve spontanément dans des terrains plutôt humides le long des ruisseaux et des rivières de faibles altitudes. Sa présence est également observée dans le nord de l'Afrique (Allais, 2008).

Il est présent en Algérie, notamment dans les régions arides du Sahara. Il pousse sur tous les sols qui manquent de nutriments, sont caillouteux ou calcaires. Il se développe naturellement près des ruisseaux et des rivières de faibles altitudes, dans des terrains relativement humides (Allais, 2008 ; Aissaoui, 2010).

4. Utilisation traditionnelle

Dans l'Antiquité cette plante utilisait pour favoriser la sécrétion du lait ou déclencher les règles chez les femmes. Au Moyen-âge, il était utilisé comme remède contre les morsures de serpents ou pour calmer l'hystérie.

Il était utilisé pendant la Renaissance pour maintenir la chaleur, traiter les problèmes d'estomac, les flatulences, les maux de tête et soulager les douleurs et les inflammations chez les femmes. Elle était indiquée contre les troubles hormonaux féminins en Angleterre et en Amérique du Nord au XXe siècle (Allais, 2008).

5. Classification botanique

La gattilière ou *V. castus* est une espèce d'arbuste qui fait partie de la famille verbenaceae selon la classification classique et de la famille lamiaceae selon la classification phylogénétique (APG III, 2009).

Tableau n°1 : Classification botanique selon APG III (2009).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous - règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Verbenaceae</i>
Genre	<i>Vitex</i>
Espèce	<i>Vitex agnus castus L</i>

Tableau n°2 : Classification botanique Selon Cronquist (1981).

Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>

6. Composition chimique

Le gattilier (*V. castus*) se distingue par sa riche composition en terpènes et en composés phénoliques, incluant des diterpènes bicycliques spécifiques aux fruits tels que la labdane et la clérodane. Les fruits, les fleurs et les feuilles du gattilier contiennent également des huiles essentielles, avec des concentrations variant respectivement de 0,10 à 1,8 %, de 0,20 à 1,40 %, et des tanins et flavonoïdes en concentrations diverses. Les feuilles présentent la teneur la plus élevée en tanins (1,0 à 3,0 %), alors que les flavonoïdes, incluant la casticine et des dérivés de la lutéoline et de l'apigénine, sont présents en quantités variables dans différentes parties de la plante. Ces composants confèrent au gattilier des propriétés pharmacologiques potentielles, renforcées par la présence d'acides gras comme l'acide linoléique dans les fruits (Allais, 2008).

La présence d'acide phénolique et de ses dérivés glycosides, flavonoïdes, tanins, iridoïdes, diterpénoïdes, stéroïdes et huile essentielle ont été découvertes dans les analyses phytochimiques du *V. castus* (Sarac *et al.*, 2015).

V. Castus contient des huiles essentielles telles que les monoterpénoïdes, le 1,8 cinéol, les limes, le linalool, l'acétate de terpinyle, les alphapinènes et les bêtas. Il contient également de la sabinène, de la castine, du myrcène, du citronellol, du cymène et de la cymène, champignon. Des sésquiterpénoïdes tels que le ledol, le farnescène, le cardinène et le caryophyllène sont également présents (Chabra, 2011).

7. Activités biologiques

V. castus possède plusieurs activités biologiques présentées dans le tableau n°3.

Tableau n°3 : Activités biologiques de la plante.

Activité biologique	Partie	Référence
Antiparasitaire, vermifuge permettent de calmer et de soulager les douleurs.	Feuilles aromatiques	(Mohamed Ouali, 2016).
Permettent de lutter contre la fièvre, expectorant, propriétés diurétiques	Racines	(Mohamed Ouali, 2016).
Soulager et /ou améliorer les Symptômes des maladies obstétricales et gynécologiques	Fruits	(Mohamed Ouali, 2016).
Utilisées pour traiter les calculs rénaux, les troubles urinaires et utilisées comme aphrodisiaque, antispasmodique, somnifère et digestif	Grains	(Lahsissene <i>et al.</i> , 1999).

8. Autres activités

V. castus est réputé pour son efficacité dans le traitement des troubles menstruels, notamment pour favoriser la régulation des cycles menstruels chez les femmes présentant des irrégularités ou souffrant d'aménorrhée. Il est également utilisé pour traiter l'infertilité liée à des perturbations hormonales, ainsi que pour stabiliser les cycles menstruels chez les femmes prenant des contraceptifs, elle est aussi utilisée pour traite l'acné, De plus, il a été démontré que *V. castus* a amélioré la fonction du corps jaune dans le syndrome de carence en corps jaune en raison de l'effet crisogène des hormones lutéinisantes (**Mohamed Ouali, 2016 ; Daniele *et al.*, 2005 ; Ohyama, 2003**).

Cette plante démontre est un agent de chimioprévention, modulateur immunitaire, et possède des propriétés cytotoxiques, antimutagènes, insectifuges, larvicides, et cicatrisantes. En outre, le *V. castus* est étudié pour ses potentialités dans le traitement de l'ostéogenèse, la réduction de la douleur, les effets opioïdiques, antiépileptiques, la prévention de la stéatose hépatique non alcoolique, ainsi que ses activités anti-inflammatoires et antioxydantes (**Niroumand *et al.*, 2018**).

Elle est utilisée pour fabriquer du savon traditionnel (**Bammi et Douira, 2002**).

Chapitre 2 :
***Les métabolites secondaires et leurs
pouvoirs biologiques***

1. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés organiques complexes produits et stockés en faibles quantités par les plantes autotrophes (Lutge *et al.*, 2002 ; Marouf et Reynaud, 2007).

Ces molécules ne participent pas aux processus normaux de croissance et de développement d'un organisme (Agostini-costa *et al.*, 2012).

Les métabolites secondaires jouent un rôle essentiel dans la réponse aux contraintes biotiques (telles que les phytopathogènes et les herbivores) et abiotiques (comme les rayons UV et les variations de température) (Naboulsi et Aboulmouhajir, 2018).

Les plantes synthétisent plus de 200 000 métabolites secondaires, regroupés principalement en trois catégories majeures : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes (Macheix, 2005).

Les métabolites secondaires sont abondants dans l'espèce *V. castus*, dont les principaux constituants sont les flavonoïdes, les iridoïdes, les diterpénoïdes, les progestatifs, les huiles essentielles et les kétéroïdes (Kuruuzum, 2003 ; Van Die, 2008).

Les polyphénols étaient présents dans les feuilles (7,36 % à 20 %), les fleurs (9 % à 10,64 %) et les fruits (6,92 % à 24 %) (Chhabra, 2011 ; Yushchyshena, 2014).

1.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont définis par la présence commune d'un ou plusieurs cycles benzéniques (C6) auxquels sont liés un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH) (Bruneton, 1993). Ils sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux (Gee et Johnson, 2001).

Cette vaste famille comprend plus de 8000 composés naturels et est subdivisée en plusieurs catégories distinctes, notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les coumarines et les lignanes (Dacosta, 2003).

La distinction des différents groupes de composés phénoliques est réalisée sur la base de leur structure chimique (Castellarine *et al.*, 2012).

Les polyphénols sont catégorisés en divers groupes selon le nombre de noyaux aromatiques qu'ils comportent et les substitutions qui les relient (fig. n°5) (Manallah, 2012).

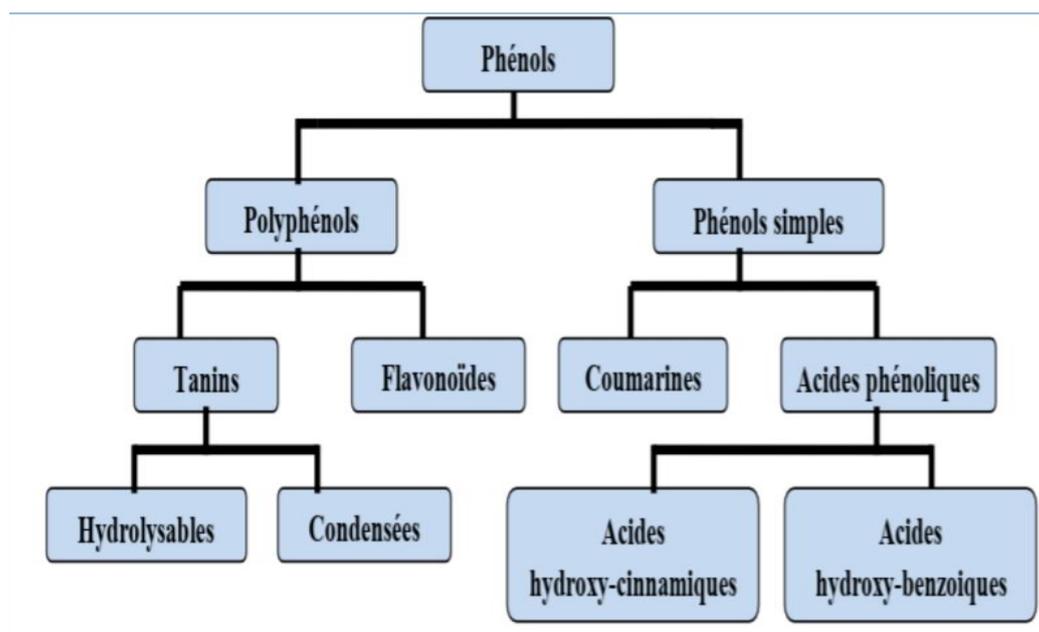


Figure n°5 : Les différents groupes des phénols (Goleniowski et al., 2013)

Les composés phénoliques sont les pigments qui colorent les feuilles et les fleurs en jaune, orange et rouge à l'automne (Edeas, 2007).

Ils protègent la plante contre les radiations UV, le stress oxydatif et les attaques microbiennes. Ils participent également à de nombreux processus physiologiques, tels que la thizogénèse, la germination des graines, la maturation des fruits et la croissance cellulaire (Biozot et charpentier, 2006).

De plus, ils protègent la santé humaine contre les maladies liées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Sun et al., 2011).

1.2. Les tanins

Les tanins, des composés polyphénoliques, se trouvent couramment dans divers végétaux comme les écorces d'arbres et les fruits tels que les raisins, les dattes, le café et le cacao. Leur structure complexe est caractérisée par des motifs monomériques répétitifs qui varient en fonction de leurs centres asymétriques et de leur degré d'oxydation. Ils présentent la capacité de former des complexes avec des macromolécules, notamment les protéines, ainsi que des liaisons avec les fibres de collagène. Bien que leur structure chimique puisse être hautement variable, ils possèdent toujours une composante polyphénolique (fig. n° 6) (Paolini et al., 2003).

Chapitre 2 : Les métabolites secondaires et leurs pouvoirs biologiques

Les tanins présentent une diversité de propriétés biologiques. Ils contribuent au recyclage de l'urée en réduisant la concentration d'ammoniac dans le rumen. La précipitation des protéines par les tanins protège les microorganismes du rumen contre leurs effets délétères. Ils participent également à des activités antidiarrhéiques en rendant imperméables les couches externes de la peau et des muqueuses, notamment la muqueuse intestinale, préservant ainsi les organes digestifs des agressions. Enfin, les tanins favorisent la cicatrisation en stimulant la régénération des tissus en cas de blessures superficielles (**Bruneton, 2008**).

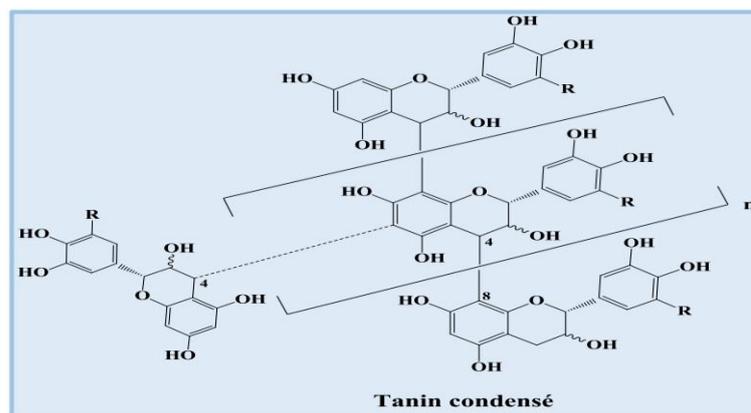


Figure n°6 : Structures d'un tanin condensés (Sereme *et al.*, 2008).

1.3. Flavonoïdes

La famille des polyphénols comprend une large gamme de substances naturelles appelées flavonoïdes (Seyoum *et al.*, 2006).

Les flavonoïdes se localisent dans divers organes tels que les racines, les tiges, le bois, les feuilles, les fleurs et les fruits, et exercent un rôle crucial dans la protection des plantes (**Bruneton, 1993**).

Les flavonoïdes sont généralement considérés comme des pigments presque universels dans les plantes, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel, ils sont le plus souvent présents sous forme d'hétérosides (**Ghestem *et al.*, 2001 ; Bruneton, 1999**).

Les flavonoïdes se divisent en diverses classes de molécules, avec plus de 6400 structures identifiées (fig. n°7) (**Harborne et williams, 2000**).

Les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs catégories distinctes, notamment les anthocyanidines, les flavonols, les isoflavonoles, les flavones, les isoflavones, les flavanes, les

Chapitre 2 : Les métabolites secondaires et leurs pouvoirs biologiques

isoflavanes, les flavanols, les isoflavanols, les flavanones, les isoflavanones et les aurones (fig. n°8) (Edenharder et Grünhage, 2003).

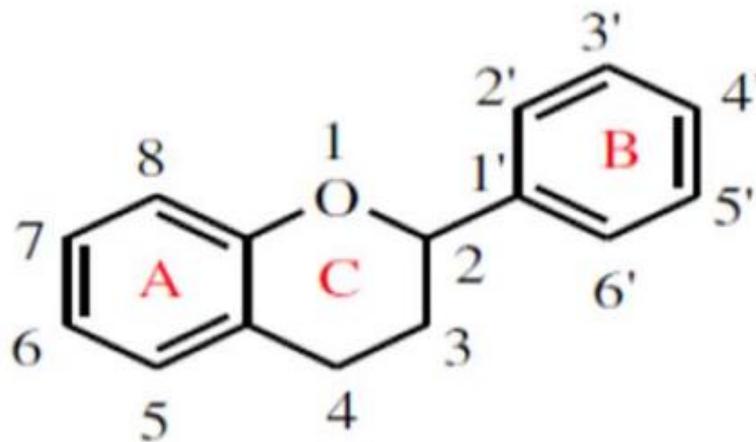


Figure n°7 : Structure de base de flavonoïde (Massaux, 2012)

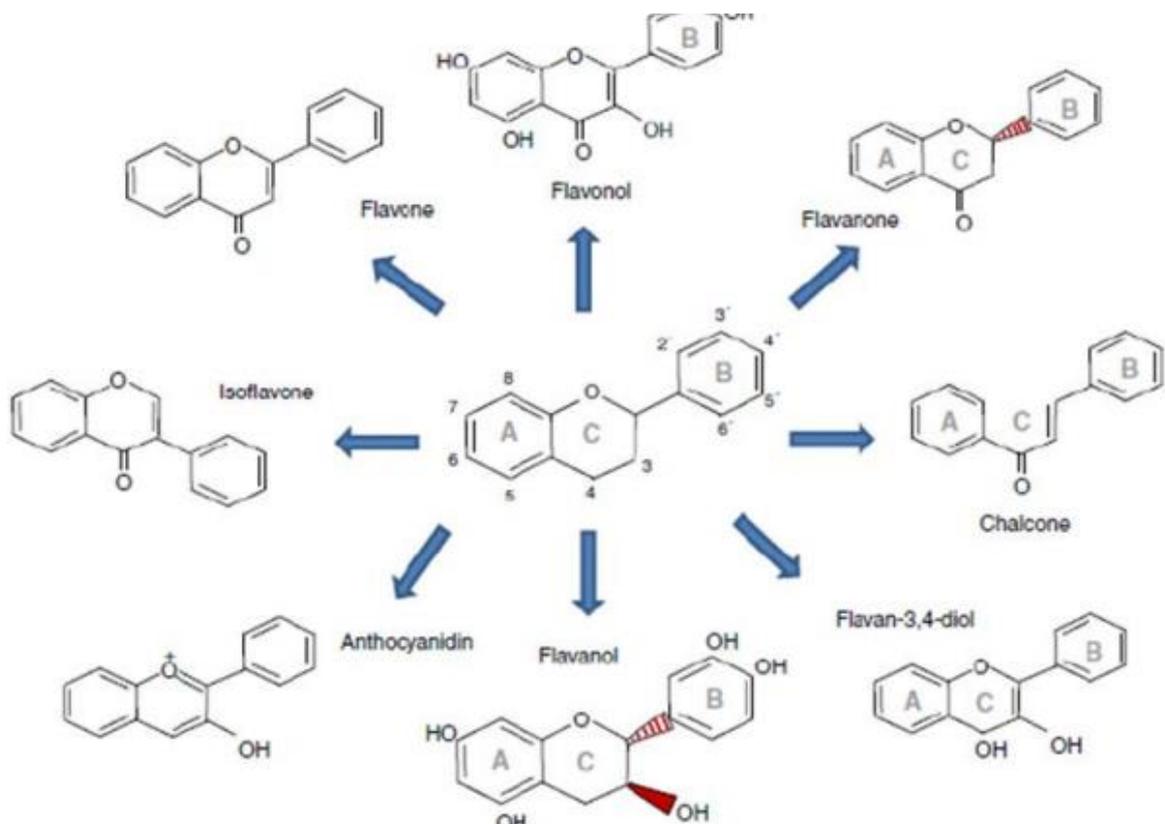


Figure n°8 : Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes (Fraga et Oteiza, 2011)

1.4 Les alcaloïdes

Chapitre 2 : Les métabolites secondaires et leurs pouvoirs biologiques

Les alcaloïdes constituent un ensemble varié de composés à faible poids moléculaire, comprenant de l'azote et dérivant principalement des acides aminés. Ils sont présents dans environ 20% des espèces végétales **(Roberts, 2013)**.

Les alcaloïdes peuvent être distribués dans tous les organes de la plante. Leur présence est généralement sous forme de combinaisons avec des acides organiques ou des tanins, plutôt que sous forme libre **(Ziegler et Facchini, 2008)**.

La majorité des alcaloïdes sont issus d'acides aminés tels que le tryptophane, la lysine, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés subissent une décarboxylation pour former des amines qui sont ensuite couplées à d'autres structures carbonées **(Cyril, 2001)**.

À fortes doses, la plupart des alcaloïdes démontrent une toxicité élevée. Toutefois, à des doses plus faibles, certains alcaloïdes peuvent présenter une valeur thérapeutique.

Depuis la préhistoire, ces composés ou leurs extraits ont été employés comme agents médicaux pour leurs propriétés relaxantes musculaires, analgésiques et tranquillisantes **(Hopkins, 2003)**.

1.5. Les saponines

Les saponines ou saponosides constituent une catégorie particulière de métabolites secondaires, des produits naturels largement répandus dans le monde végétal **(Sparg et al., 2004)**.

Les saponines sont des glycosides à activité tensioactive. Elles sont principalement synthétisées par les plantes supérieures, mais également par certains organismes marins et quelques bactéries **(Francis et al., 2002 ; Das et al., 2012)**

Les saponines sont des glycosides, des stéroïdes ou des triterpènes qui moussent lorsqu'ils sont en contact avec l'eau. Ils sont constitués d'aglycones non polaires qui sont liés à un ou plusieurs sucres (fig. n°9). Ce mélange d'éléments structuraux polaires et non polaires explicatif de leur moussage dans une solution aqueuse **(Manach et al., 2004)**.

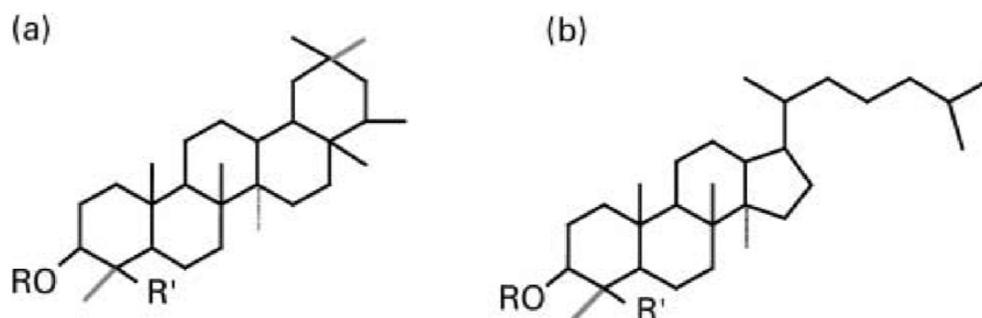


Figure n°9 : Structure de base des saponines (a) Triterpène (b) Stéroïde
(Fransic *et al.*, 2002)

1.6. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, qui proviennent de sources naturelles, sont le groupe de métabolites secondaires le plus large et le plus varié sur le plan structurel (Isah *et al.*, 2018).

Les terpénoïdes, également appelés isoprénoïdes, sont des produits chimiques de la famille des terpènes qui sont hydrophobes. Ce sont principalement des hydrocarbures fabriqués par condensation et cyclisation des sous-unités d'isoprène (C₅H₈) (Ruchika, 2018).

De nombreux terpénoïdes végétaux ont des qualités aromatiques, comme celles que trouvés dans les huiles essentielles d'eucalyptus et de gingembre (Toogood, 2012).

Les terpènes sont classés en plusieurs sous-classes selon le nombre de sous-unités d'isoprène (fig. n°10), comme les hémiterpènes, sesquiterpènes, monoterpènes, diterpènes, triterpènes et tétraterpènes (Naik, 2019).

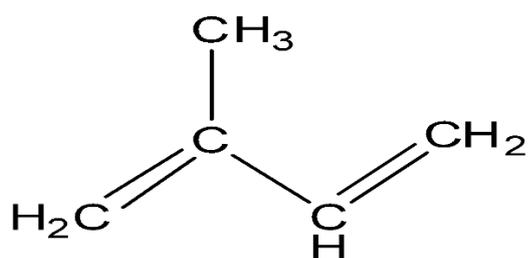


Figure n°10 : Structure de la molécule d'isoprène (Taibi et Bousbeh, 2022).

Chapitre 2 : Les métabolites secondaires et leurs pouvoirs biologiques

1.7. Les quinones

Les hydroquinones sont les quinones les plus courants. Ils peuvent être combinés avec des sucres appelés Anthoquinones. Ils proviennent de divers processus de biosynthèse. Le couple quinone-hydroquinone a un potentiel redox important dans de beaucoup de systèmes biologiques.

Les polyprényls quinones, également appelés quinones terpénoïdes, dérivent de l'acide 4-hydroxybenzoïque et ont des chaînes polyisopréniques dans leur noyau benzoquinone (fig. n°11). Certains dérivés, tels que la plastoquinone et l'ubiquinone, transportent les électrons. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour complexer irréversiblement avec certains acides aminés, des protéines qu'elles inactivent ou rendent inutilisables. Cela explique les effets antimicrobiens potentiels des quinones. De nombreuses d'entre elles sont toxiques et anti-appétantes (**Gilbert et Norris, 1968**).

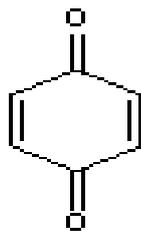


Figure n°11 : Structure d'une molécule de quinone (Cowan, 1999).

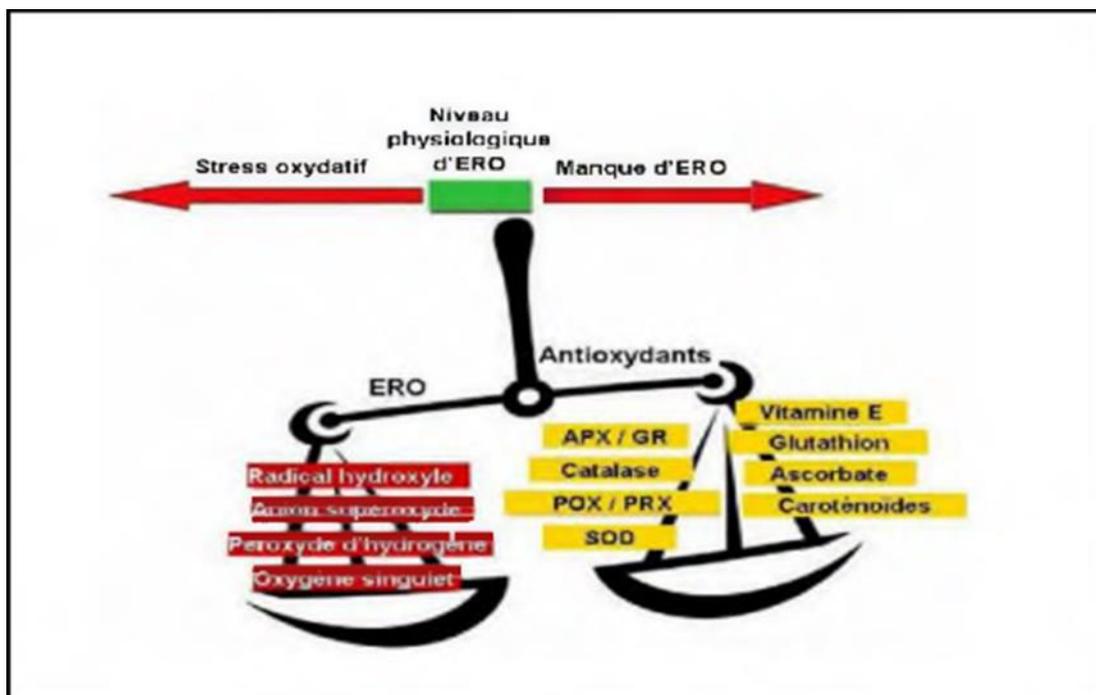
Chapitre 3 : Stress oxydatif

1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydant dans les systèmes biologiques est le résultat d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) et leur destruction par les systèmes de défense antioxydants (Bennefont-Rousselot *et al.*, 2003).

Les radicaux libres peuvent causer des dommages significatifs aux cellules en dégradant différentes parties, telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Ce sont des espèces chimiques particulières avec un électron non apparié (Angelos *et al.*, 2005).

Dans des situations normales de la vie quotidienne, de petites quantités d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) sont produites, agissant comme médiateurs ou résidus de divers processus tissulaires ou métaboliques. Ces productions sont régulées par des systèmes de défense adaptatifs en fonction du niveau de radicaux présents. Lorsque cette régulation est efficace, on parle d'équilibre entre les pro-oxydants et les anti-oxydants. Cependant, cet équilibre peut être perturbé pour diverses raisons, favorisant alors les pro-oxydants et entraînant un stress oxydatif (fig. n°12) (Favier, 2003).



*Figure n°12 : Balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants (Pourrut *et al.*, 2008).*

2. Les espèces réactives de l'oxygène

Chapitre 3 : Stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) désignent les formes d'oxygène qui sont plus réactives sur le plan énergétique que l'oxygène moléculaire. Elles comprennent à la fois des dérivés d'oxygène sous forme de radicaux et d'autres composés non-radicaux très réactifs (Asada, 2000 ; Foyer et Noctor, 2003 ; Edreva, 2005).

3. Les radicaux libres

Toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement actif est appelée radical libre (Vansant, 2004).

Le terme "espèces réactives de l'oxygène" est souvent utilisé pour désigner tous les radicaux libres ainsi que les substances à partir desquelles ils se forment (Favier, 2003).

Les radicaux libres sont des atomes ou des groupes d'atomes qui possèdent un nombre impair d'électrons dans leur couche externe. Ils se forment lorsqu'une molécule d'oxygène interagit avec certaines autres molécules. Ces radicaux libres sont très instables et cherchent rapidement à réagir avec d'autres composants afin de capturer les électrons nécessaires pour atteindre la stabilité (Kristina et Marika, 2003).

4. Les antioxydants

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

5. Sources d'antioxydants

5.1. Source exogène

Ils peuvent être des composants bioactifs (flavonoïdes, caroténoïdes) ou des nutriments traditionnels (peptides et acides aminés, vitamines E et C).

5.1.1. La β -carotène

La β -carotène est un composé présent dans les aliments. Elle offre plusieurs avantages : elle se transforme en vitamine A dans le corps, elle capture l'oxygène singulet lorsque la pression d'oxygène est faible, et elle participe, avec d'autres caroténoïdes, à l'arrêt des réactions en chaîne de lipoperoxydation. De plus, elle protège les cellules contre les dommages causés par l'oxydation et elle aide à prévenir les effets néfastes de divers agents génotoxiques (Allard *et al.*, 1994).

5.1.2. Les polyphénols

Leur activité est due à la présence d'un grand nombre de résidus d'hydroxyle, qui sont autant d'armes contre les radicaux libres.

Les flavonoïdes interagissent avec les radicaux libres pour empêcher leur dégradation. Très réactif aux phospholipides membranaires. La structure du flavonoïde et son affinité pour les radicaux sont liées à cette capacité antioxydante.

Les tanins sont des piègeurs de radicaux libres et des inhibiteurs de la formation d'ion superoxyde, ainsi que des inhibiteurs de la peroxydation lipidique (**Bruneton, 1993**).

5.1.3. La vitamine C

La forme énediol de la Vit C crée la forme dicétonique en transférant successivement ses deux atomes d'H. En présence de catalase, l'enzyme superoxyde dismutase restaure la forme énediol. La vitamine C peut être trouvée dans les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi. Elle est essentielle à la régénération du vit E (**Bossokpi,2002**).

5.1.4. La vitamine E

La vitamine E est un terme général utilisé pour désigner les molécules ayant des effets biologiques similaires à ceux des tocophérols. La vitamine E naturelle comprend quatre isomères de tocophérols - α , β , δ , γ - qui ont des niveaux variables d'activité antioxydante. (**Singh et al,2005**).

5.2 Source endogène

Se compose de protéines, d'oligoéléments et d'enzymes qui jouent un rôle essentiel dans la neutralisation des radicaux libres excédentaires. (**Coene, 2004**).

5.2.1. La superoxyde dismutase (SOD)

Il existe deux versions de cette enzyme : la première est cytoplasmique et utilise les ions de cuivre et de zinc (CuZnSOD) comme cofacteur ; la deuxième est mitochondriale et utilise le manganèse comme cofacteur (**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**).

5.2.2. Les chélateurs de métaux

Chapitre 3 : Stress oxydatif

La ferritine, la transferrine et l'albumine perdent partiellement ou complètement leur activité de stimulation des réactions radicalaires lorsqu'elles sont liées aux métaux (Traore, 2005).

6. Conséquences du stress oxydatif

Les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comprennent la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines et les mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent entraîner une perte de fonction et d'intégrité des cellules, et même conduire à la mort cellulaire, notamment par le processus d'apoptose, qui est une forme de mort cellulaire programmée (Ait Yahia et Zemmoura, 2014).

7. Mécanismes d'action des antioxydants

Les antioxydants agissent de différentes manières pour protéger notre corps contre les dommages causés par les radicaux libres. Ils capturent l'oxygène singulet, neutralisent les radicaux en formant des liaisons covalentes, réduisent les radicaux ou les peroxydes, et peuvent également se lier aux métaux de transition pour les neutraliser (Favier, 2006).

8. Les méthodes les plus utilisés dans l'étude de l'activité antioxydante

Différentes méthodes sont utilisées pour mesurer l'efficacité antioxydante, que ce soit dans des expériences en laboratoire ou sur des organismes vivants.

8.1. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Le principe du test CUPRAC est similaire à celui du test FRAP, où le Cu^{2+} se convertit en Cu^+ lors du transfert d'électrons par divers polyphénols. Le produit chimique largement utilisé dans cet essai est le cation bis-cuivre, qui agit comme un agent de transfert d'électrons dans la sphère externe. Le changement d'une réaction chimique est représenté sur (fig. n°13). Le réactif cuivrique est réduit au cours de la réaction et la couleur passe du bleu clair au jaune-orange (Abeyrathne *et al.*, 2021).

La méthode CUPRAC est mesurée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

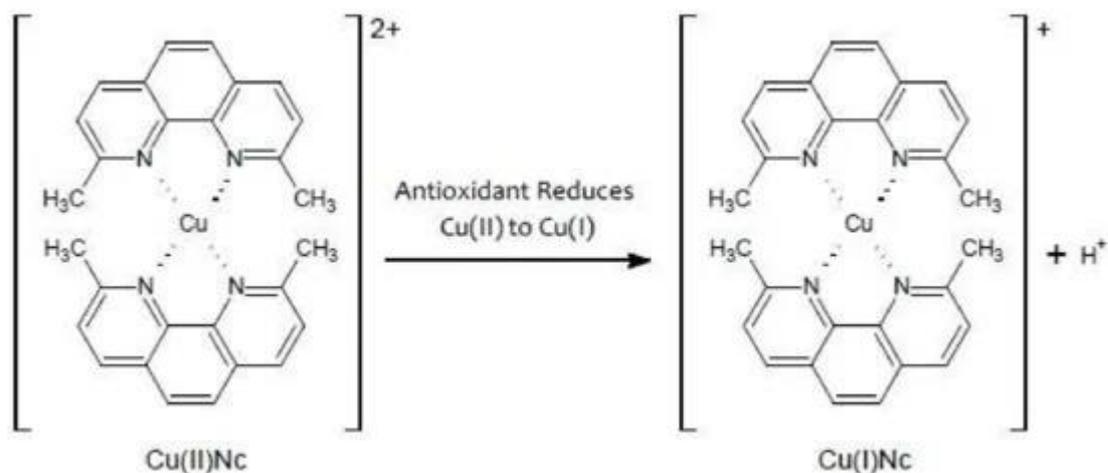


Figure n°13 : Changement chimique dans le test CUPRAC (Abeyrathne *et al.*, 2021).

8.2. Superoxyde DMSO Alcalin

Cette méthode permet d'évaluer la capacité d'un extrait antioxydant à neutraliser l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ce qui prévient la réduction du tétrazolium bleu de nitro en bleu de formazan. Le test est considéré positif si la solution reste jaune, indiquant ainsi l'absence de formation de formazan. En effet, la formation de ce radical anionique stable est favorisée par l'alcalinisation du DMSO (Parejo *et al.*, 2002).

8.3. Test ORAC

Cette méthode évalue l'effet des antioxydants sur la dégradation de la fluorescéine, une molécule particulière, provoquée par la décomposition thermique à 37°C de l'AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride), qui génère deux radicaux libres. La présence d'antioxydants dans l'échantillon retarde cette dégradation. La réaction est étalonnée en utilisant des concentrations connues de Trolox, une substance reconnue pour ses propriétés antioxydantes (Lavoisier, 2009).

8.4. Piégeage de l'ABTS (2,2'-azinobis- [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])

La méthode ABTS ou test de décoloration des cations radicaux ABTS (Meda *et al.*, 2013).

La méthode ABTS implique l'utilisation de potassium persulfate pour transformer le ABTS en un radical cationique $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (fig. n°14), qui a une couleur bleu-vert. Lorsqu'un antioxydant est ajouté, il donne un hydrogène au radical, le transformant en ABTS-H^+ , qui est incolore. La diminution de la couleur (mesurée par l'absorbance) indique l'efficacité de l'antioxydant à neutraliser le radical libre (Ait mouhoub et Oubouid, 2017).

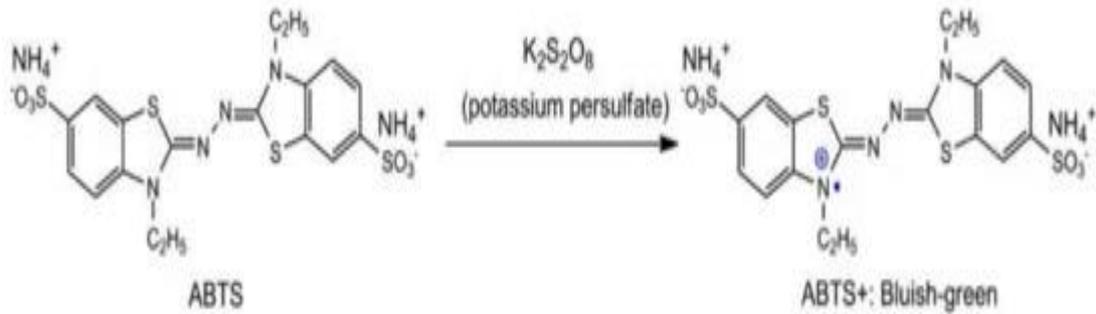


Figure n°14 : Modifications des radicaux ABTS avec le persulfate de potassium (Abeyrathne *et al.*, 2021).

8.5. Test de piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le test de neutralisation DPPH• est basé sur le don d'électrons provenant antioxydants afin de neutraliser le radical DPPH• (fig. n°15). La réaction est accompagnée d'un changement de couleur du DPPH• mesuré à 517 nm, et la décoloration agit comme un indicateur de l'activité antioxydante (Munteanu et Apetrei, 2021).

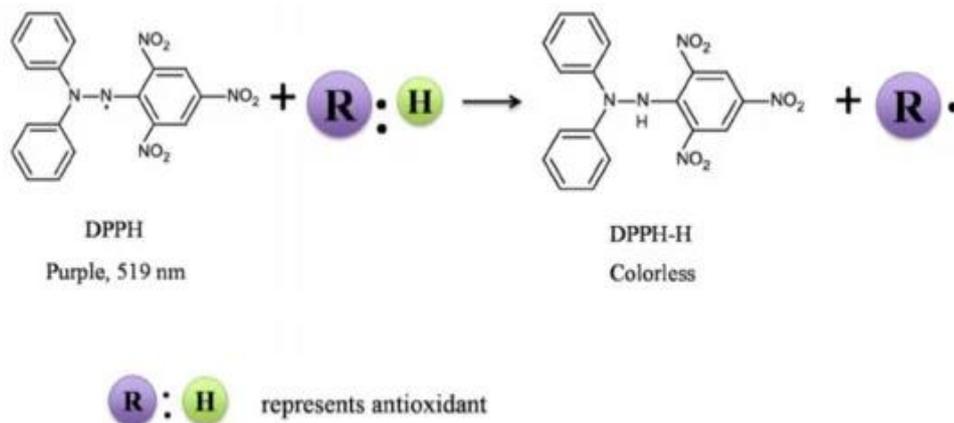


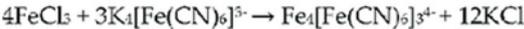
Figure n°15 : Modifications de l'activité de suppression des radicaux DPPH (Abeyrathne *et al.*, 2021).

8.6. Test de réducteur de fer (FRAP) : Ferric Reducing Antioxidant Power

Le test FRAP repose sur le principe selon lequel les substances ayant un potentiel de réduction réagissent avec le ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) pour former du ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}). Ce dernier réagit ensuite avec le chlorure ferrique pour former un complexe ferrique-ferreux (fig. n°16), il présente une absorption maximale à 700 nm (Aye *et al.*, 2018).

Chapitre 3 : Stress oxydatif

Chemical reaction:



Mechanism of reaction:

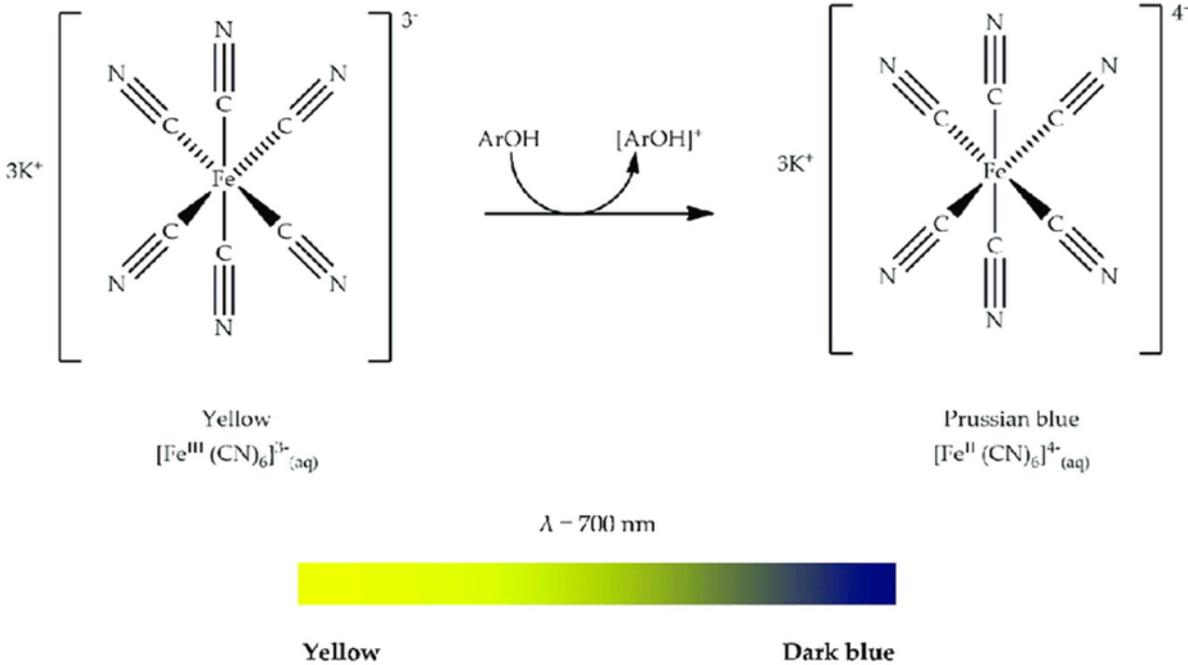


Figure n°16 : Mécanisme de réaction du ferricyanure de potassium (Bibi Sadeer et al., 2020).

PARTIE 2 :
PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1 :
Matériel et Méthodes

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de recherche «Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique ».

L'objectif de ce travail est, d'une part quantifier les taux de composés phénoliques présents dans les différents extraits de *V. castus*, d'autre part évaluer leur activité antioxydante, en utilisant deux méthodes distinctes, à savoir le piégeage du radical libre DDPH•(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et la réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

1. Matériel végétal

1.1. Préparation du matériel végétal

L'échantillon a été acheté auprès d'un marchand d'épices, par la suite la plante a été broyée à l'aide d'un mortier, qui est ensuite utilisée pour préparer les extraits.

1.2. Extraction du matériel végétal

Trois extraits ont été préparés par la méthode de décoction :

- Extrait aqueux (10 g de matière végétale + 200 ml d'eau distillée).
- Extrait eau/éthanol (10 g de matière végétale + 200 ml d'un mélange eau/éthanol 30/70 : v/v).
- Extrait eau/acétone (10 g de matière végétale + 200 ml d'une mélange eau/acétone 30/70 : v/v).

L'extraction de la matière végétale est réalisée selon la méthode suivantes (fig. n°17). :

✓ 10 g de la plante de *V. castus* sont mis séparément en contact avec 200 ml de l'eau distillée et d'une solution aqueuse de méthanol et de acétone (30/70: v/v).

✓ Les trois mélanges sont portés à une extraction sous reflux pendant 45 min.

✓ Après refroidissement, les mélanges obtenus sont filtrés.

✓ Les filtrats sont évaporés à sec à l'aide d'un rotavapeur à 40°C.

✓ Les extraits secs récupérés sont conservés jusqu'à leur utilisation.

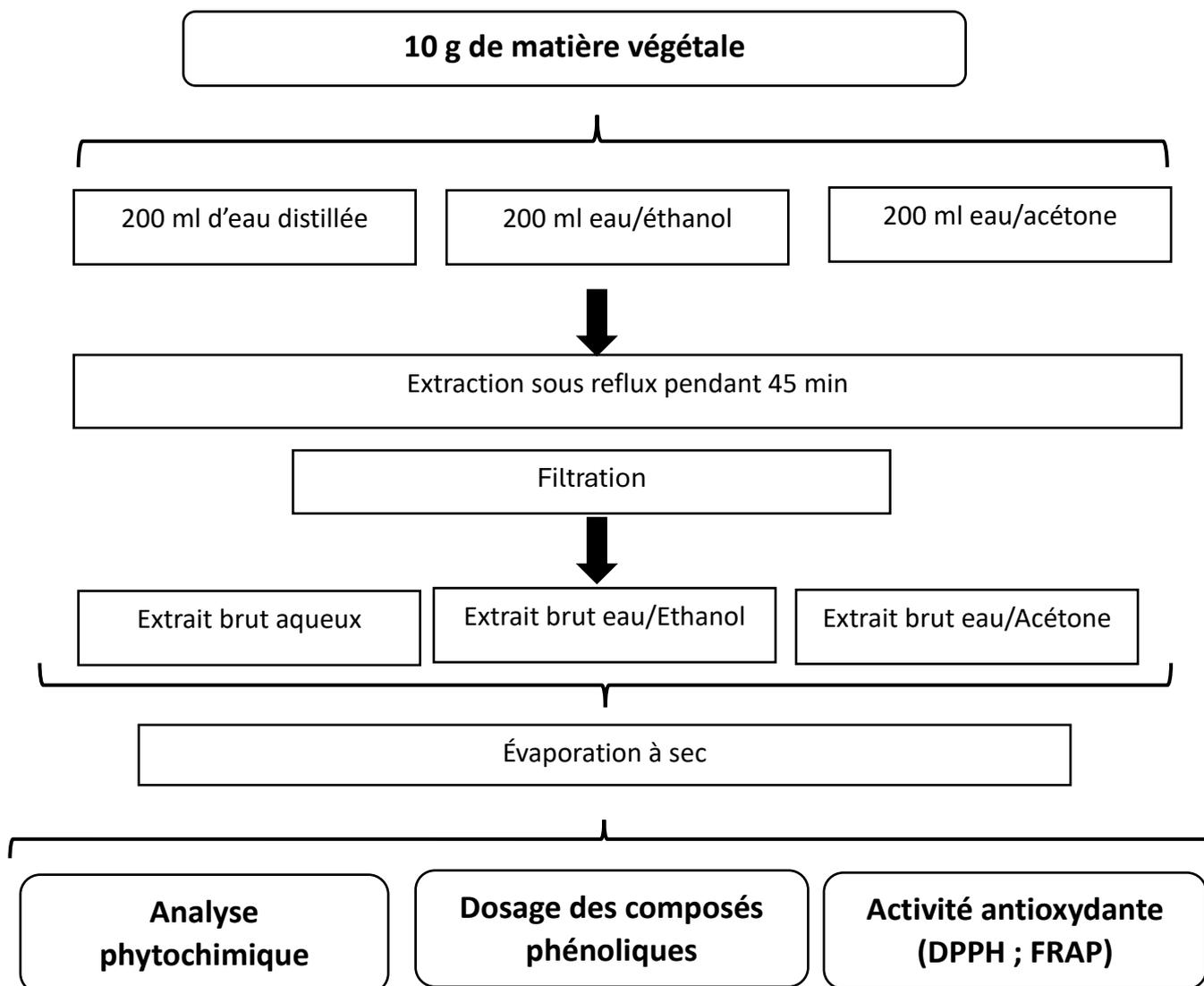


Figure n° 17 : Protocole expérimental réalisé sur *V. castus*

1.3. Calculs des rendements d'extraction

La quantité d'extraits secs obtenus à partir de la matière végétale exprime le rendement d'extraction calculé selon la formule :

$$\text{Rdt (\%)} = [(m1 - m2) / m3] \times 100$$

Rdt : Rendement.

m1 : Poids du ballon rempli d'extrait (g).

m2 : Poids du ballon vide (g).

m3 : Poids de la matière végétale (g).

2. Analyses phytochimiques

2.1 Les tanins

Pour mettre en évidence les tanins 1 ml de chaque extrait a été mélangé avec une solution aqueuse de FeCl_3 (1%). Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 minutes. La présence de tanins est signalée par l'apparition d'une couleur bleu foncé, ou verdâtre (**Karumi, 2004**).

2.2. Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été recherchés en ajoutant pour chaque volume d'extrait 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCL) puis quelques copeaux de magnésium, L'apparition d'une couleur rouge, orange ou rose indique la présence des flavonoïdes (**Karumi, 2004**).

2.3. Les quinones libres

Dans un tube à essai, 0,1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%) a été ajouté à 1 ml de chaque extrait analysé. La présence de quinones libre est signalée par l'apparition d'une couleur Jaune, rouge ou violet (**Oloyede, 2005**).

2.4. Les anthraquinones

Les anthraquinones ont été mises en évidence en ajoutant 1 ml de NH_4OH (10%). Après agitation, l'apparition d'une couleur violet, indiquée leur présence (**Oloyede, 2005**).

2.5. Les terpénoïdes

Le test de Slakowski a été utilisé pour rechercher les terpénoïdes en ajoutant 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré à 1 ml d'extrait. La présence de terpénoïdes est indiquée par la présence de deux phases et une couleur marron à l'interface (**Khan et al., 2011**).

2.6. Les saponines

Les saponines ont été recherchés par le test de mouse, après agitation de 10 ml de chaque extrait, une mousse persistance pendant 20 min confirme la présence des saponines (**N'guessan et al., 2009**).

2.7. Les alcaloïdes

Des réactions de précipitation ont été effectuées avec le réactif de Mayer et Wagner pour effectuer ces tests. Le premier tube contenant 0,5 ml d'extrait était rempli de 0,5 ml de réactif de Mayer, tandis que le deuxième tube contenait 0,5 ml de réactif de Wagner, l'émergence d'un précipité blanc et marron témoigne de la présence des alcaloïdes (**Majob et al., 2003**).

2.8. Les composés réducteurs

Ils sont détectés en introduisant 1 ml d'extrait dans un tube à essai, puis en ajoutant 2 ml de liqueur de Fehling (1 ml de réactif A et 1 ml de réactif B). Par la suite, le tout était placé dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes, l'émergence d'un précipité rouge brique témoigne de la présence de composés réducteurs (**Edeoga et al., 2005**).

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Dosage des polyphénols totaux

3.1.1 Principe

La méthode de Folin-Ciocalteu est utilisée pour la quantification des polyphénols totaux. Cette technique implique l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu, un mélange d'acide phosphotungstique $H_3[P(W_3O_{10})_4]$ et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) qui est initialement de couleur jaune. Les composés phénoliques présents dans l'échantillon sont oxydés par le réactif, conduisant à la formation d'un complexe bleu de molybdène-tungstène qui présente une absorption maximale à 700 nm (**Vermerris et Nicholson, 2007**).

3.1.2 Mode opératoire

Le dosage des polyphénols totaux consiste à mélanger 100 μ l de chaque extrait brut avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% et puis incuber le mélange pendant 5 minutes. Ensuite ajouter 100 μ l de réactif de Folin- Ciocalteu (1N) sont additionnés au mélange et procéder à une deuxième incubation à température ambiante pendant 5 min. la densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm en comparaison avec un blanc.

La gamme d'étalonnage de l'acide gallique a été préparée dans les mêmes conditions opératoires à des concentrations variées (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 mg/ml).

3.2. Dosage des flavonoïdes

3.2.1. Principe

La méthode spectrophotométrique utilise le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) pour former un complexe jaune avec les flavonoïdes. De plus, l'hydroxyde de sodium (NaOH) est employé pour créer un complexe rose avec les flavonoïdes, ce dernier absorbe dans le spectre visible à 510 nm (Ardestani et Yazdanparast, 2007).

3.2.2. Mode opératoire

Dans des tubes, ajouter 2 ml d'eau distillée à 500 μl de chaque extrait, puis ajouter 150 μl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15%. Par la suite, les tubes ont été incubés pendant 6 minutes à température ambiante. Après la période d'incubation, ajouter 150 μl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à une teneur de 10%. Effectuer une seconde incubation de 6 min à une température ambiante, puis ajouter 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4%. La quantité totale est réduite à 5 ml d'eau distillée.

La densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 510 nm en comparaison avec un blanc.

Une courbe d'étalonnage de la catéchine a été effectuée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 mg/ml).

3.3. Dosage des tanins

3.3.1. Principe

La quantité de tanins condensés a été estimée par la méthode de la vanilline. Les tanins condensés se dépolymérisent dans un environnement acide et en réagissant avec la vanilline se transforment en anthocyanidols de couleur rouge mesurables par spectrophotomètre à 550 nm (Sun *et al.*, 1998).

3.3.2. Mode opératoire

50 μl de chaque extrait à analyser ont été ajoutés à 1500 μl d'une solution méthanolique de vanilline (4%). Une fois agité, un volume de 750 μL d' HCl concentré a été ajouté. Ensuite, on laissait le mélange réagir à température ambiante pendant 20 minutes. Différentes mesures d'étalonnage de la catéchine ont été effectuées.

Une gamme de la catéchine a été réalisée à différentes concentrations (0,8 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 mg/ml). La densité optique a été réalisée par l'utilisation d'un spectrophotomètre à 550 nm contre un blanc.

3.4. Expression des résultats

Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés, sont calculées selon la formule suivante :

$$T = a \cdot f / b$$

T : Teneur

a : Concentration à partir de la courbe d'étalonnage respective ;

f : Facteur de dilution ;

b : Concentration initiale de l'extrait

4. Evaluation de l'activité antioxydante

4.1. Piégeage du radical libre DPPH°

4.1.1. Principe

Ce radical confère à la solution une couleur violacée qui absorbe aux environs de 515 nm. Un agent antioxydant réduit les radicaux DPPH, ce qui provoque une décoloration de la solution en la transformant en jaune, ce qui entraîne une diminution de l'absorbance (**Atoui *et al.*, 2005**).

4.1.2. Mode opératoire

Mélanger 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH° (0,025 mg/ml) avec 50 µl de différentes concentrations d'extraits. En même temps, des tubes blancs sont préparés en mélangeant 50 µl de chaque concentration d'extrait avec 1950 µl de méthanol. Pour préparer le témoin négatif en ajoutant 50 µl de méthanol à 1950 µl de DPPH°.

Les séries de tubes ont été incubées à température ambiante à l'abri de la lumière pendant une durée de 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 515 nm contre les tubes blancs à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans les mêmes conditions expérimentales, on a également utilisé l'acide ascorbique, le BHA et le BHT comme contrôles positifs. Les doses de BHA ont été maintenues à (0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 mg/ml) et de BHT (0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 mg/ml). Alors que l'acide ascorbique est utilisé dans les concentrations de (0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,1 ; 0,2).

4.1.3. Les pourcentages d'inhibition

Les résultats du test DPPH• sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé à partir

de la formule suivante :

$$\% I = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

% I: Pourcentage d'inhibition.

AC : Absorbance du contrôle.

AE: Absorbance de l'échantillon.

4.1.4. Calcul des IC₅₀

La valeur de l'IC₅₀ correspond à la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% la concentration initiale de DPPH•. Cette valeur est utilisée comme un paramètre pour caractériser l'activité de piégeage des radicaux libres. Les valeurs d'IC₅₀ sont obtenues par analyse graphique des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testés, à travers des régressions logarithmiques ou linéaires (Gulcin, 2020).

4.2. Réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

4.2.1. Principe

Cette méthode est utilisée pour évaluer la capacité des extraits à convertir l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). Cette diminution se manifeste par l'émergence d'une teinte verte qui absorbe à 700nm, dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur (Topçu *et al.*, 2007).

4.2.2. Mode opératoire

Dans des tubes à essai contenant 2,5 ml d'extrait à différentes concentrations, ajouter 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium à 10 %. Le mélange obtenu a été mis en incubation pendant 20 minutes à 50°C, en suit ajouter 2,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à une teneur de 10%. Une fois centrifugé pendant 10 minutes à une vitesse de 3000 rpm, un aliquote de 2,5 ml du surnageant a été mélanger avec 2,5 d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de FeCl₃ à 0,1%.

Les absorbances du milieu réactionnel ont été mesuré à une longueur d'onde de 700 nm contre un blanc en utilisant un spectrophotomètre. L'acide ascorbique, le BHA et le BHT sont utilisés comme contrôles positifs dans les mêmes conditions expérimentales à différentes concentrations (0,1; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1) mg/ml

4.2.2. Expression des résultats

Dans la méthode FRAP, une augmentation de l'absorbance témoigne d'une augmentation du pouvoir réducteur du fer par les échantillons testés, tels que les extraits ou les contrôles positifs. Pour comparer ces échantillons, le paramètre utilisé est l'EC₅₀ (concentration efficace) qui représente la concentration de l'échantillon requise pour atteindre une absorbance de 0,5 sur les graphiques Absorbances=f (concentrations)] (Ferreira *et al.*, 2007 ; Tamuly *et al.*, 2014).

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

1. Calcul des rendements d'extraction

Les différents extraits issus de la plante *V. castus* présentent des rendements et des caractéristiques différentes, les résultats sont donnés dans le tableau n°04.

Tableau n°4 : Rendements et caractéristiques des différents extraits de V. castus

Extraits	Aqueux	Eau/éthanol	Eau/acétone
Rendements	8,9 %	1,76 %	1,95 %
Aspect	Pâte	Pâte	Pâte
Couleur	Marron foncé	Marron clair	Marron clair
Solubilité	Méthanol	Méthanol	Méthanol

D'après le tableau n°4, on remarque que l'extrait aqueux présente un rendement élevé (8,9%) par rapport aux autres extraits. Par ailleurs l'extrait eau/éthanol et eau/acétone donnent des rendements assez faibles et presque identiques (1,76 et 1,95 %, respectivement). d'autre part les trois extraits ont le même aspect de pâte et solubles dans le même solvant. Tandis que la couleur diffère entre l'extrait aqueux (marron foncé) et les deux autres extraits (marron clair).

2. Analyses phytochimiques

Les données expérimentales présentées dans le tableau n°5 révèlent la présence ou l'absence de divers groupes chimiques dans les extraits analysés de *V. castus*. Ces résultats sont qualifiés sur la base de la coloration, de la turbidité ou de, qui sont proportionnelles à la concentration des substances détectées.

Tableau n°5 : Les résultats du testes phytochimique des extraits de V. castus.

Extrait	Aqueux	Eau/éthanol	Eau/acétone
Tanins	-	-	+
Flavonoïdes	-	-	-
Quinones Libres	++	+	+
Antraquinones	-	-	-
Terpenoïdes	+	-	++
Saponosides	-	-	-
Alcaloïdes	-	-	-
Composés Réducteurs	-	-	-

++ : Forte présence ; + : présence ; - : absence

D'après les tests, les trois extraits renferment des quinones libres, tandis que les terpenoïdes sont présents dans l'extrait eau/acétone et aqueux, mais les tanins sont présents

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

seulement dans l'extrait eau/acétone et pour les autres composés (flavonoïdes, anthraquinones, saponosides, alcaloïdes et composés de réduction) sont complètement absents.

2. Teneur des composés phénoliques

Les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés des différents extraits sont calculées à partir des équations des régressions linéaires des courbes d'étalonnage représentées sur les figures n° 18, 19 et 20.

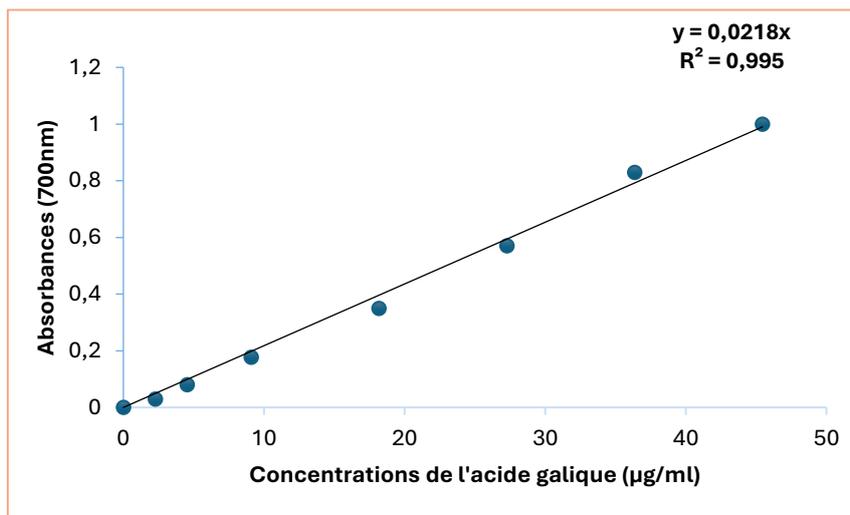


Figure n° 18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

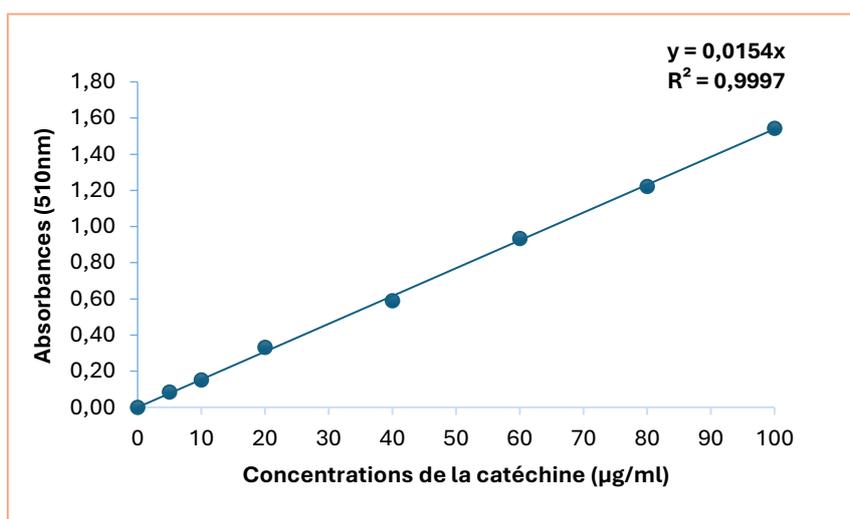


Figure n° 19 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

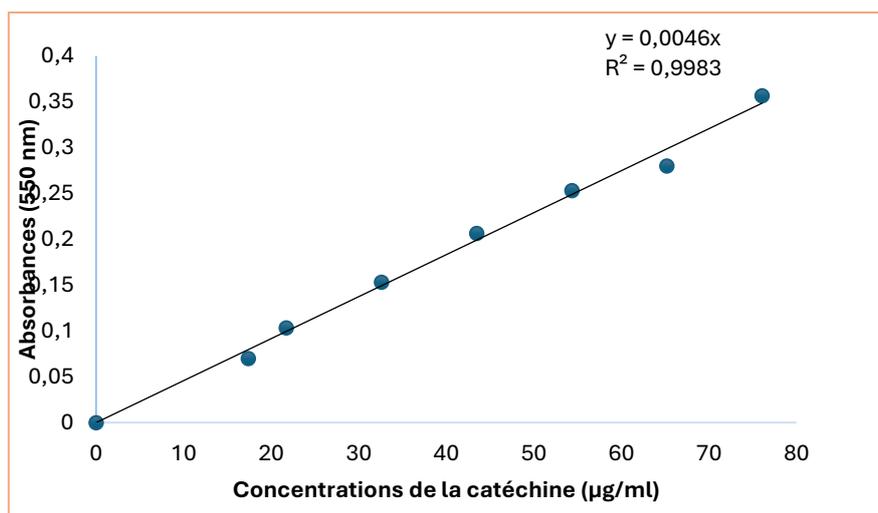


Figure n°20 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins

Les teneurs en composés phénoliques sont exprimées en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/gE) pour les polyphénols totaux et en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EQC/gE) pour les flavonoïdes et les tanins condensés, et elles sont données dans le tableau n°6.

Tableau n°6 : Teneurs en composés phénoliques dans les trois extraits de *V. castus*.

	Extrait aqueux	Extrait eau/Ethanol	Extrait eau/Acétone
Polyphénols totaux (mgEAG/gE)	26,90 ± 3,36	151,37 ± 0,00	50,45 ± 0,00
Flavonoïdes (mgEQC/gE)	12,99 ± 0,00	34,63 ± 2,16	30,33 ± 4,33
Tanins condensés (mgEQC/gE)	26,46 ± 0,00	48,75 ± 1,99	69,70 ± 0,00

Les résultats obtenus montrent que les différents solvants d'extraction utilisés présentent des différences dans leur capacité à extraire les composés phénoliques de *V. castus*.

La teneur la plus élevée en polyphénols totaux est obtenue par l'extrait eau/éthanol (151,37 ± 0,00 mg EAG/g E), la plus faible est enregistrée par l'extrait aqueux 26,90 ± 3,36 mg EAG/gE, et pour l'extrait eau/acétone la teneur est moyenne 50,45 ± 0,00 mg EAG/gE.

Le dosage de flavonoïdes montre que la teneur la plus élevée est celle de l'extrait eau/éthanol, il renferme 34,63 ± 2,16 mgEQC/gE, suivie de l'extrait eau/acétone qui contient

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

$30,33 \pm 4,33$ mgEQC/gE. Pour l'extrait aqueux il renferme une faible teneur en flavonoïde $12,99 \pm 0,00$ mgEQC/gE.

La teneur la plus élevée en tanins est celle de l'extrait eau/acétone, il renferme $69,70 \pm 0,00$ mgEQC/gE, suivie de l'extrait eau/éthanol ($48,75 \pm 1,99$ mgEQC/gE). Pour l'extrait aqueux une teneur de $26,46 \pm 0,00$ mgEQC/gE a été obtenue,

3. Evaluation de l'activité antioxydante

3.1. Piégeage du radical libre DPPH

Les figures n°21, 22 et 23 représentent graphiquement les pourcentages d'inhibition de l'extrait aqueux, eau/éthanol et eau/acétone de la plante *V. castus*, respectivement.

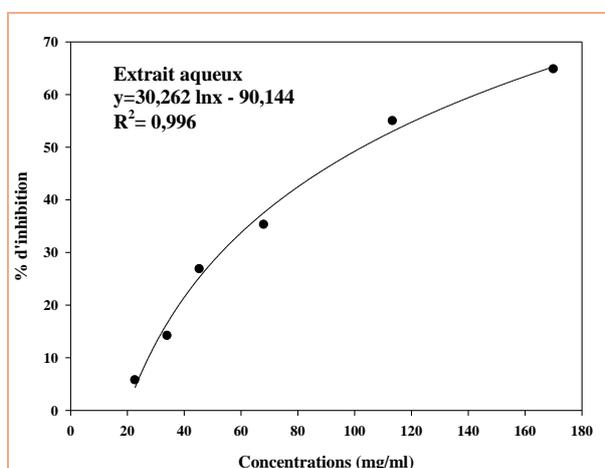


Figure n°21 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait aqueux

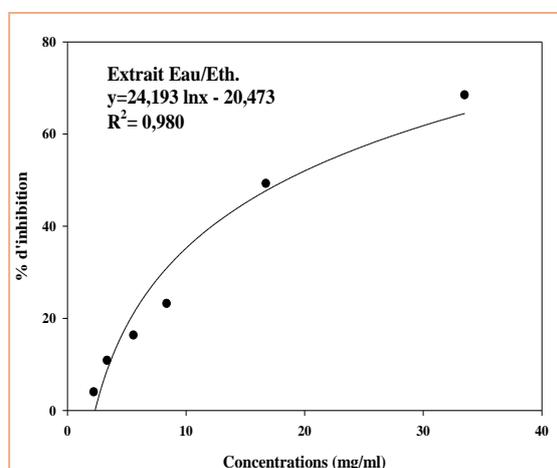


Figure n°22 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait eau /éthanol

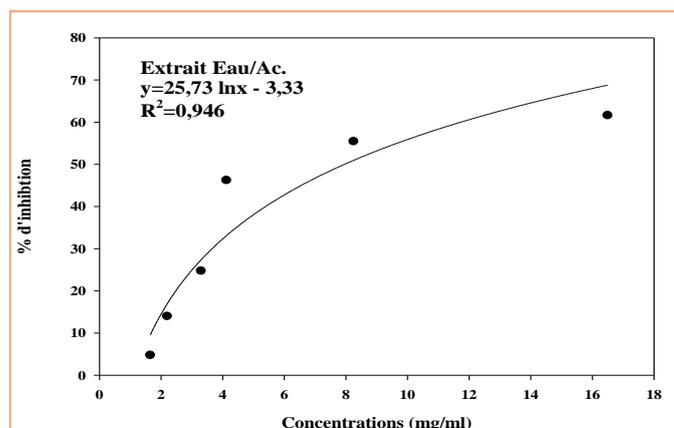


Figure n°23 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait eau/acétone

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

D'après la figure n°21, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par l'extrait aqueux augmente de manière logarithmique, avec une forte corrélation ($R^2 = 0,996$). À une concentration de 23 mg/ml l'inhibition est de l'ordre de 6%, atteignant 65% à une concentration de 170 mg/ml.

Selon les données de la figure n°22, l'extrait eau/éthanol et à une concentration de 2 mg/ml le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• est de 4%. Ce pourcentage augmente progressivement avec la concentration de l'extrait, atteignant 23% à une concentration supérieure à 8 mg/ml et 68% à 34 mg/ml à la fin de l'expérience.

D'après la figure n°23, les concentrations de l'extrait eau/acétone montrent des pourcentages d'inhibition significatifs avec une bonne corrélation ($R^2 = 0,946$). À une concentration de 2 mg/ml, le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 5%, augmentant à 55% à 8 mg/ml. À la concentration la plus élevée testée (17 mg/ml) le pourcentage d'inhibition atteint 62%, Cela représente une augmentation relative par rapport aux 68 % et 65 % observés respectivement pour les extraits eau/éthanol et aqueux, à des concentrations de 34 mg/ml et 170 mg/ml.

Les pourcentages d'inhibition des trois molécules de référence (acide ascorbique, BHA et BHT) contre le radical libre DPPH• sont illustrés sur la figure n°24, 25 et 26, présentant des régressions logarithmiques fortement corrélées ($R^2 > 0,98$).

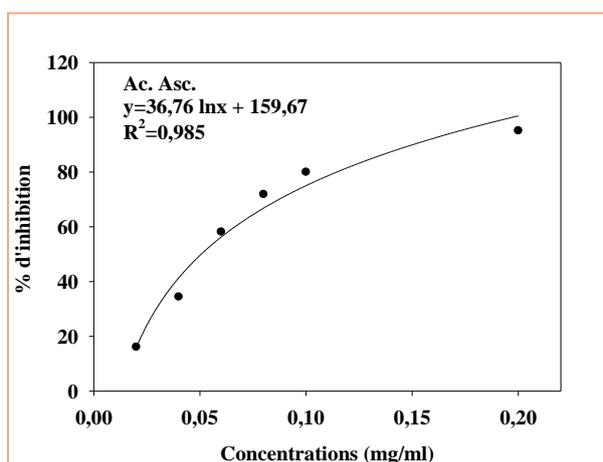


Figure n°24 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par l'acide ascorbique

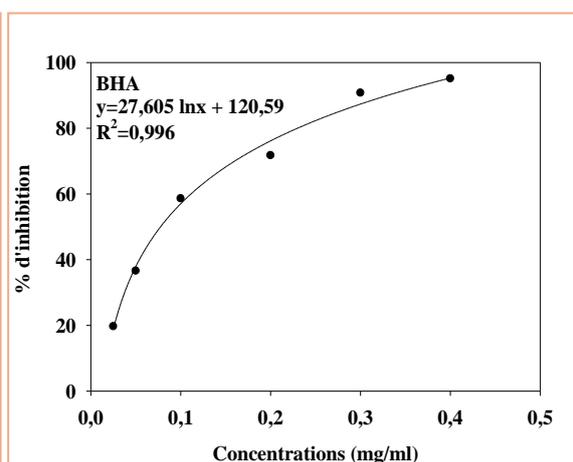


Figure n°25 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par le BHA

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

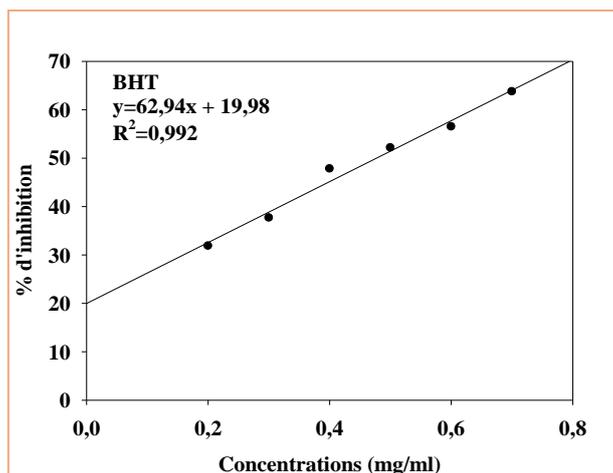


Figure n°26 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par le BHT

A la concentration (0,1 mg/mL), l'acide ascorbique présente un pourcentage d'inhibition très proches de 65%, et le BHA présente 50% alors que le BHT donne un pourcentage de 25%. Donc l'acide ascorbique affiche la plus grande activité antioxydante, caractérisée par les pourcentages d'inhibition les plus élevés, suivis par le BHA et le BHT.

Pour évaluer et comparer l'activité antioxydante des différents extraits avec celle des molécules de référence, les valeurs d'IC₅₀ sont déterminées en utilisant les équations de régression issues des graphiques de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des échantillons, comme indiqué dans le tableau n°7.

Tableau n°7 : Valeurs d'IC₅₀ des extraits et des molécules de référence (DPPH)

Extraits	IC ₅₀ (mg/ml)
Extrait aqueux	102,62
Extrait Eau/Ethanol	18,41
Extrait Eau/Acétone	7,95
Acide ascorbique	0,050
BHA	0,077
BHT	0,477

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

Plus la valeur de IC_{50} est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant. Parmi les trois extraits de *V. castus*, l'extrait eau/acétone représente l'extrait le plus actif avec une IC_{50} de 7,95 mg/ml suivi par l'extrait eau éthanol avec une IC_{50} de 18,41 mg/ml et finalement l'extrait aqueux qui présente une faible capacité antioxydante avec une IC_{50} de 102,62.

A des fins comparatives, trois antioxydants standards sont utilisés, l'acide ascorbique et le BHA et BHT, ils ont montré une activité antiradicalaire puissante avec des IC_{50} de l'ordre de 0,05 et 0,077 et 0,477 mg/ml, respectivement.

3.2. Pouvoir réducteur du fer (méthode de FRAP)

Les résultats relatifs au pouvoir réducteur des extraits de *V. castus* sont représentés sous forme de graphes de l'absorbance en fonction des concentrations des extraits : Absorbances = f (concentrations) (fig. n° 27, 28, 29).

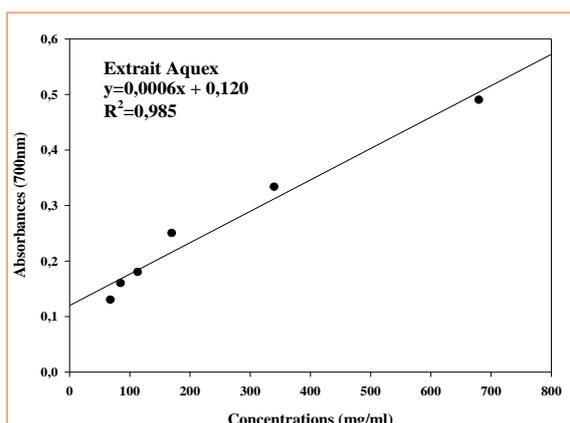


Figure n°27 Pouvoir réducteur du fer par l'extrait aqueux

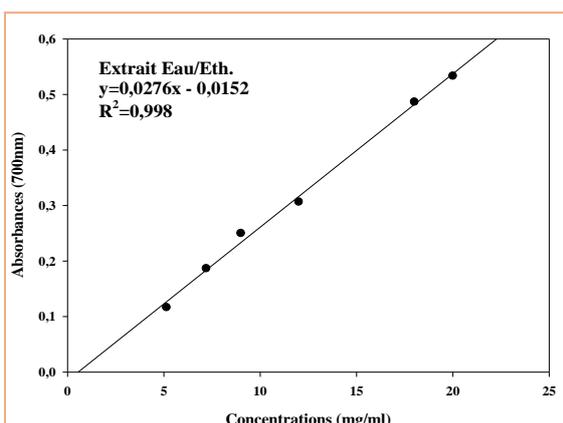


Figure n°28 Pouvoir réducteur du fer par l'extrait eau /éthanol

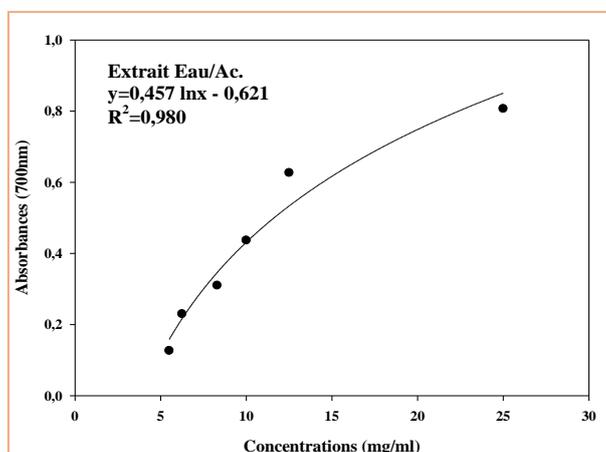


Figure n°29 : Pouvoir réducteur du fer par l'extrait eau/acétone

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

Des densités optiques relativement faibles par rapport aux autres extraits, sont données par l'extrait aqueux (fig. n°27), A une concentration de 68 mg/ml la densité optique obtenue est de 0,1 et qui passe à 0,2 puis 0,4 à une concentration de 113 mg/ml et 680 mg/ml, respectivement.

D'après la figure n°28, l'extrait eau/éthanol présente aussi des densités qui ne dépassent pas la valeur de 0,6, au début de l'expérience a concentration de 5mg/ml la densité ne dépasse pas 0,1 et à la fin a une concentration de 24 mg/ml obtenue une densité de 0,6.

Selon la figure n°29, on observe que les densités optiques de l'extrait eau/acétone et selon une régression logarithmique augmentent proportionnellement avec les concentrations de l'extrait. A une concentration de 8 mg/ml la densité obtenue est de 0,3 et qui passe à 0,6 puis 0,8 à une concentration de 12,5 et 25 mg/ml, respectivement.

D'après ces figures, nous constatons que l'extrait/acétone a présenté le pouvoir le plus élevé pour réduire le fer.

Les trois molécules de références (acide ascorbique, BHA et BHT) utilisées pour réduire le fer donnent les résultats représentés sur les n°30, 31 et 32.

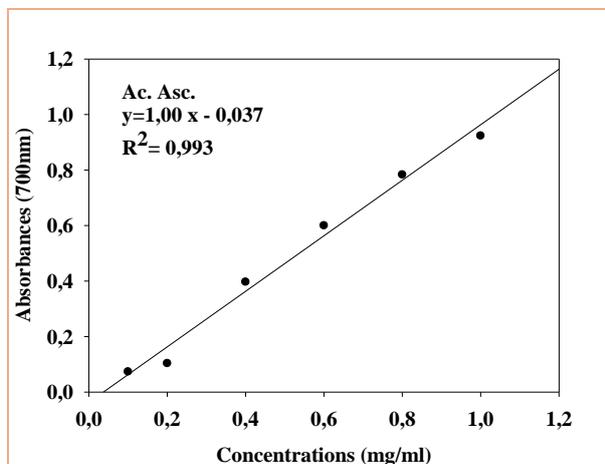


Figure n°30 : Pouvoir réducteur du fer par l'acide ascorbique

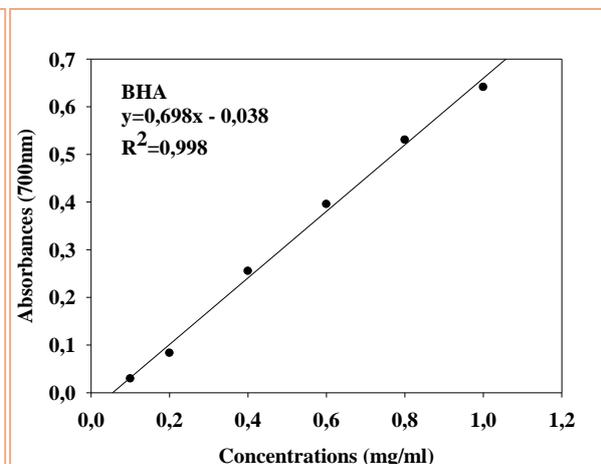


Figure n°31 : Pouvoir réducteur du fer par le BHA

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

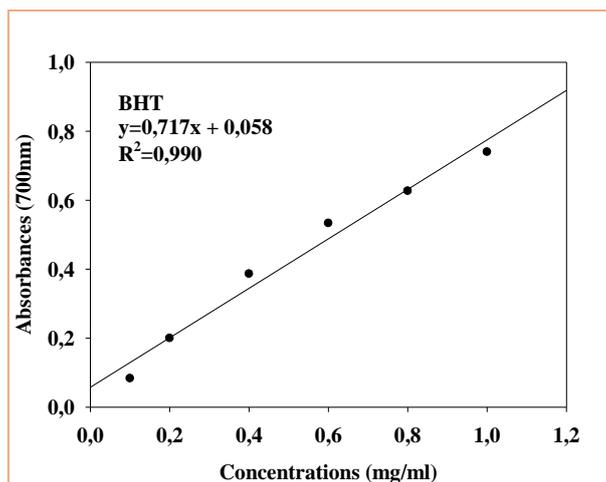


Figure n°32 : Pouvoir réducteur du fer par le BHT

Ces résultats indiquent que pour la concentration (1mg/ml) d'acide ascorbique, de BHA et de BHT, les absorbances enregistrées sont respectivement, 0,92 ; 0,64 et 0,74, ce qui indique que l'acide ascorbique a le pouvoir réducteur du fer le plus élevé suivi de BHT et BHA.

Les EC_{50} , qui représentent les concentrations efficaces pour atteindre une densité de 0,5 sont déterminées à partir des équations de régression figurant sur les graphiques du pouvoir réducteur du fer. Les valeurs calculées sont ensuite répertoriées dans le tableau n°8.

Tableau n°8 : Valeurs des EC_{50} des extraits et des molécules de référence (FRAP)

Extraits	EC_{50} (mg/ml)
Extrait aqueux	633,33
Extrait Eau/Ethanol	18,66
Extrait Eau/Acétone	11,62
Acide ascorbique	0,536
BHA	0,771
BHT	0,616

L'acide ascorbique, utilisé ici comme contrôle positif, a démontré une capacité de réduction élevée de 0,536 mg/ml, suivi de BHT (0,616 mg/ml), et de BHA (0,771 mg/ml).

D'après le tableau précédent, l'extrait aqueux, présente le plus faible pouvoir réducteur avec un EC_{50} de 633mg/ml, alors que l'extrait qui présente le plus fort pouvoir réducteur, est

Chapitre 2 : Résultats et interprétation

l'extrait d'eau/ acétone, dont l' $EC_{50}=11,62\text{mg/ml}$ et pour l'extrait d'eau/éthanol présente une EC_{50} de $18,66\text{mg/ml}$, par conséquence, ces trois capacités à réduire le fer sont nettement inférieurs à celle des molécules de références.

D'après les résultats obtenus dans cette étude on peut classer les extraits et les molécules de références comme suit :

Eau/acétone > eau/éthanol > Aqueux : Pour le DPPH et le FRAP :

Acide ascorbique > BHA > BHT : Pour le DPPH

Acide ascorbique > BHT > BHA : Pour le FRAP

DISCUSSION

L'objectif de notre étude est porté sur une étude phytochimique des extraits aqueux, eau/éthanol et eau/acétone de la plante *V. castus* et aussi sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits précédents par la méthode de piégeage du radical DPPH•, et la méthode FRAP.

Les tests effectués par **Berrani et al. (2015)**, sur *V. castus* ont confirmé la présence de tanins, de saponosides, d'o-hétérosides, de mucilages, de polyphénols, de quinones, d'alcaloïdes, de composés réducteurs, de flavonoïdes, de coumarines, de protéines, de caroténoïdes, de glycosides cardiaques, de composés cyanogénétiques, de stérols et de triterpènes.

Alors que notre étude phytochimique montre que les trois solvants renferment des quinones libres, tandis que les terpénoïdes sont présents dans l'extrait d'eau-acétone et aqueux, mais les tanins ne sont présents que dans l'extrait d'eau/acétone. Pour les autres composés (flavonoïdes, anthraquinones, saponosides, alcaloïdes et composés réducteurs), ils sont complètement absents.

D'après l'étude de **Kara (2018)**, l'analyse phytochimique du *V.cactus* a révélé la présence de glycosides, de flavonoïdes, de diterpénoïdes, de stéroïdes et d'huiles essentielles. Les phénols totaux ont été réalisés par la méthode Folin-Ciocalteu et la teneur phénolique était de 781,22 mg/ml d'équivalent acide gallique. L'étude GC-MS a également été réalisée et a montré la présence de composés phytochimiques comme l' α -toc (RT 2,5), le β -toc (4,8).

Les résultats de **Rashed (2013)**, ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle était le plus actif (88,46%) et que l'analyse phytochimique de cet extrait a révélé la présence de triterpènes, de flavonoïdes, de tanins, d'alcaloïdes et de glucides.

L'étude de **Drioua et al. (2024)**, montre que l'extrait aqueux présente la plus haute concentration en polyphénols, suivie de près par les extraits méthanoliques et éthanoliques. Ces polyphénols sont des contributeurs essentiels au potentiel antioxydant de ces extraits, contrairement à nos résultats qui démontrent que l'extraction hydroéthanolique est la plus riche en polyphénols ($151,37 \pm 0,00$ mg EAG/g), tandis que l'extrait aqueux est le plus faible ($26,90 \pm 3,36$ mg EAG/g). Les variations de la teneur totale en polyphénols mettent en évidence la composition diversifiée des composés bioactifs présents dans *V. castus*, selon la méthode d'extraction employée. Ces différences jouent un rôle dans la variation des niveaux de potentiel antioxydant observé lors des essais précédents.

DISCUSSION

La recherche de **Ben Amor (2008)**, Confirme que l'extraction des composés polyphénoliques est une étape essentielle pour valoriser les principes actifs. La macération par le mélange eau/méthanol est la meilleure technique pour identifier et caractériser les métabolites polyphénoliques, tels que les polyphénols totaux, les tanins condensés, les coumarines, les composés réducteurs et les alcaloïdes.

Les résultats de **Muanda (2010)**, indiquent que les extraits de *Vitex doniana* sont très riches en polyphénols et en anthocyanines, mais pauvres en alcaloïdes et en résines. Donc, le changement de genre de l'espèce affecte la présence ou l'absence des composés polyphénoliques.

La teneur en flavonoïdes de l'étude de **Drioua et al. (2024)**, démontre que les extraits méthanoliques et éthanoliques de *V. castus* contiennent une quantité substantielle de flavonoïdes, qui sont bien documentés pour leurs propriétés antioxydantes. L'extrait aqueux, bien que présentant une teneur plus faible en flavonoïdes, la variation de la teneur en flavonoïdes parmi les extraits souligne la composition diversifiée des composés bioactifs au sein de *V. castus*, selon la méthode d'extraction. Cette conclusion est cohérente avec l'ensemble des résultats obtenus dans notre étude, l'extrait du mélange eau/acétone et eau/éthanol sont plus riche en flavonoïdes contrairement de l'extrait aqueux.

Hajdú et al. (2007), suggère que *V. castus* possède un potentiel antioxydant et les composés phénoliques ont la capacité de neutraliser les radicaux libres nocifs et de réduire le stress oxydatif dans l'organisme.

Les composés phénoliques, en particulier les acides phénoliques et les flavonoïdes, jouent un rôle clé dans la capacité antioxydante de nombreuses plantes. La présence de ces composés phénoliques et flavonoïdes dans ces extraits indique leur potentiel d'atténuation du stress oxydatif (**Sarikurkcu et al., 2009**).

Les variations dans la quantité de polyphénols peuvent être dues à divers facteurs ainsi qu'à la diversité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux (**Khiya et al., 2021**).

Les études sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH menées par **Asdadi et al. (2015)**, révèlent que le pourcentage d'inhibition varie en fonction de la concentration de l'huile essentielle. Ces études ont démontré des valeurs des IC₅₀ de 0,5844 mg/mL pour le BHT et de

DISCUSSION

1,072 mg/mL pour l'huile essentielle des graines de *V. castus*, indiquant une activité antioxydante faible par rapport à nos résultats la valeur d'IC₅₀ pour le BHT est 0,477 mg/mL

L'étude menée par **Drioua et al. (2024)**, indique que les extraits méthanoliques et éthanoliques, bien qu'ils ne soient pas aussi puissants que la quercétine, affichent une activité antioxydante modérée, ce qui est prometteur pour leur utilisation potentielle comme antioxydants naturels. L'extrait aqueux, tout en présentant la plus forte activité antioxydante parmi les extraits testés, montre également un potentiel en tant que source d'antioxydants. Ces résultats soulignent la diversité des composés antioxydants présents dans *V. castus* à travers différentes méthodes d'extraction.

Sağlam et al. (2007), montre que la diversité des composés antioxydants présents dans les différentes parties de la plante souligne le potentiel du *V. castus* à fournir des effets antioxydants complets.

Mesaik et al. (2009), ont suggéré que les feuilles de *V. castus* contiennent également des constituants antioxydants précieux, élargissant ainsi les applications potentielles de la plante au-delà de ses fruits.

D'après **El Kamari et al. (2020)**, les fruits de Vitex possèdent un potentiel antioxydant remarquable qui peut renforcer leurs effets protecteurs. L'extrait méthanoïque a montré la meilleure activité antioxydante, mesurée par FRAP, avec une valeur IC₅₀ de $2,98 \pm 0,2$ mg/ml; la valeur la plus faible a été observée dans l'extrait d'acétate d'éthyle. L'activité antioxydante, mesurée par les tests TAC et DPPH, a été établie pour un extrait éthanolique avec respectivement, 400 ± 00 mg d'AAE/gES et $0,36 \pm 0,07$ mg/mL.

A partir du test de ABTS qui réalisé dans l'étude de **Kayalar et al. (2007)**, les extraits aqueux et éthanol de *V. castus* ont montré une activité antioxydante plus forte que les extraits d'hexane. Le solvant d'extraction et la méthode ont une influence significative sur l'estimation de l'activité antioxydante.

D'après l'étude de **Kavaz et al. (2022)**, les extraits éthanoliques de graines de *V. castus* ont été analysés pour leur teneur en composants phytochimiques par les méthodes LC/MS/MS, et leur activité antioxydante a été examinée par les méthodes DPPH, ABTS, Fe³⁺-Fe²⁺ et CUPRAC. Le principal composé phénolique était l'acide vanillique, suivi de la lutéoline, de l'acide fumarique, de la quercétine, de l'acide caféique, de l'acide 4-hydroxybenzoïque, de l'acide salicylique, du kaempférol, de la butéine, de l'acide ellagique, du resvératrol, de la

DISCUSSION

catéchine hydratée, de la phloridzine déshydratée et de la naringénine, respectivement. La valeur de suppression des radicaux libres DPPH de l'extrait éthanolique de graines de la plante était de 9,41 %, tandis que l'activité de suppression des radicaux libres ABTS a été déterminée à 12,66 %.

L'étude de **Habbab *et al.* (2016)**, montre que la plus faible activité de piégeage des radicaux a été démontrée par l'huile essentielle de graines.

Les propriétés antioxydantes des extraits ont été évaluées à l'aide de différents tests d'antioxydants, y compris la chélation ferrique, l'activité de récupération du peroxyde d'hydrogène et la réduction du cuivre capacité antioxydante. L'activité antioxydante la plus élevée était observé comme étant de $93,5 \pm 0,8$ % par l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène. La teneur totale en flavonoïdes et phénoliques de l'extrait méthanolique était de $27,45 \pm 1,36$ mg QE et de $48,05 \pm 1,02$ mgGAE par extrait sec, respectivement (**Maltaş *et al.*, 2010**).

D'après nos résultats l'activité antioxydante et non corrélée avec la teneur composés phénoliques. Cette observation suggère que les extraits aqueux ont une activité antioxydante plus faible en raison de leur capacité limitée à extraire une large gamme de composés bioactifs. Les mélanges de solvants, tels que l'eau/éthanol et l'eau/acétone, permettent d'extraire à la fois des composés polaires et apolaires, y compris des polyphénols et des flavonoïdes, qui sont souvent les principaux contributeurs à l'activité antioxydante. En outre, la synergie entre ces divers composés dans les extraits obtenus avec des solvants mixtes renforce encore cette activité (**Drioua *et al.*, 2024**)

En plus, il y a plusieurs facteurs qui peuvent influencer l'activité antioxydante et la présence ou l'absence de composés phénoliques. Parmi ces facteurs, on trouve la région et l'âge de la plante, ainsi que la méthode d'extraction et la partie de la plante. Bien sûr, les tests utilisés dans l'étude de l'activité antioxydante jouent également un rôle crucial, C'est pour cela qu'il y a une grande différence de résultats entre les études (**Ben Amor, 2008 ; Drioua *et al.*, 2024**).

Conclusion

CONCLUSION

Les plantes médicinales sont naturellement riches en une variété de composés utilisés depuis longtemps en médecine, ce qui explique leurs usages traditionnels. *V. castus* est largement utilisé en phytothérapie pour traiter les troubles hormonaux féminins, grâce à sa richesse en composés phénoliques.

L'analyse phytochimique et la quantification de ces composés ont révélé que l'extrait d'eau/acétone de *V. castus* est particulièrement riche en composés phénoliques tels que les quinones libres, les terpénoïdes et les tanins. Plus précisément, l'extrait d'eau/acétone présente la plus forte teneur en tanins ($69,70 \pm 0,00$ mg EQC/g d'extrait), tandis que les extraits d'eau/éthanol sont riches en flavonoïdes ($34,63 \pm 2,16$ mg EQC/mg d'extrait) et en polyphénols ($151,37 \pm 0,00$ mg EAG/g d'extrait).

En ce qui concerne l'activité antioxydante *in vitro*, l'extrait eau/acétone présente une forte activité antioxydante dans les deux tests d'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH• et FRAP) avec une IC₅₀ de 7,95 mg/ml et une EC₅₀ de 11,62 mg/mL.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que *V. castus* est une source importante de molécules bioactives ayant une activité antioxydante non corrélée avec la teneur en composés phénoliques.

Ce travail représente une partie de l'exploitation des plantes médicinales à activité antioxydante. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour compléter ce travail, notamment :

- ✓ L'utilisation de différentes méthodes et solvants d'extraction.
- ✓ La recherche des mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire à l'aide d'études *in vivo*.
- ✓ L'utilisation d'autres méthodes d'analyse chimique des extraits, telles que la l'HPLC ou la spectrométrie de masse, permettrait d'identifier et de quantifier précisément les différents composés bioactifs présents dans *V. castus*. Cela aiderait à mieux comprendre les contributions spécifiques de chaque classe de composés à l'activité antioxydante et à d'autres propriétés biologiques de l'extrait.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeyrathne, E. D. N. S., Nam, K., & Ahn, D. U. (2021). Analytical methods for lipid oxidation and antioxidant capacity in food systems. *Antioxidants*, 10(10), 1587. <https://doi.org/10.3390/antiox10101587>
- Agostini-Costa, T. S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2012). Secondary metabolites, chromatography and its applications. In D. Sasikumar (Ed.), *Chromatography and Its Applications*. InTech. <http://www.intechopen.com/books/chromatography-and-itsapplications/secondary-metabolites>
- Aissaoui, H. (2010). *Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de type flavonique d'une espèce de la famille des Verbénacées* (Doctoral dissertation). Université Mentouri Constantine.
- Ait Mouhoub, H., & Oubouzi, T. (2017). L'étude de l'activité anti-oxydante des extraits phénoliques d'un mélange de "Matricaria pubescens" et une variété de datte "Phoenix dactylifera L". *Mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme de master*. Université A. Mira, Bejaia, 21-32.
- Ait Yahia Louiza, Z., Hella, Z., & Djaouhara. (2014). Étude de l'effet d'un stress oxydatif et du système défensif enzymatique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) [Mémoire de master, Université Constantine 1, Département de Biologie et Écologie Végétale, Filière Sciences Biologiques].
- Allain, P. (1996). *Les médicaments*. ESTEM.
- Allais, D. (2008). Le gattilier. *Actualités Pharmaceutiques*, 47(479), 49-52.
- Allard, J., Royall, D., Kurian, R., Muggli, R., & Jeejeebhoy, K. (1994). Effects of β -carotene supplementation on lipid peroxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59, 884-890.
- Angelos, M. G., Kutala, V. K., Torres, C. A., He, G., Stoner, J. D., Mohammed, M., & Oerannan, K. (2005). Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290, 341-347.
- APG III. (2009). The Angiosperm Phylogeny Group. 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.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Ardestani, A., & Yazdanparast, R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104(1), 21-29.
- Asada, K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1419-1431.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Asdadi, A., Hamdouch, A., Oukacha, A., Moutaj, R., Gharby, S., Harhar, H., El Hadek, M., Chebli, B., & Idrissi Hassani, L. M. (2015). Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(4), e118-e127.
- Aye, S. W., Myint, W., & Zar Toe. (2018). Evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of Myanmar herbal plants. *ResearchGate*.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17489.38240>
- Bammi, J., & Douira, A. (2002). Les plantes médicinales dans la forêt de l'Achach (plateau central, Maroc). *Acta Botanica Malacitana*, 27, 131-145.
- Ben Amor, B. (2008). *Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: texturation par détente instantanée contrôlée DIC* (Doctoral dissertation). Université de la Rochelle.
- Bennefont-Rousselot, D., Therond, P., & Delattre, J. (2003). *Radicaux libres et antioxydants*. Flammarion Médecine-Sciences, 59-81.
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Berrani, A., Lrhorfi, L. A., Dahmani, F. Z., Fkhir, H., & Bengueddour, R. (2015). Criblage phytochimique de deux plantes médicinales: *Vitex agnus-castus* et *Anabasis articulata*. *ScienceLib Editions Mersenne*, 7(151201).
- 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.
- Bossokpi, I. P. L. (2002). *Étude des activités biologiques de Fagara xanthoxyloides LAM (Rutaceae)* (Doctoral dissertation). Bamako.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Technique et Documentation Lavoisier.
- Bruneton, J. (2008). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (3rd ed., pp. 1120). Lavoisier Technique & Documentation.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4th ed., 1288 p.). Éditions Tec & Doc.
- Castellarin, S. D., Bavaresco, L., Falginella, L., Gonçalves, M. I. V. Z., & Di Gaspero, G. (2012). Phenolics in grape berry and key antioxidants. In H. Geros, M. M. Chaves, & S. Delrot (Eds.), *The Biochemistry of the Grape Berry* (pp. 89-110). Bentham Science.
- Chhabra, G. S., & Kulkarni, K. S. (2011). *Vitex agnus-castus* – An overview. *Journal of Natural Remedies*, 11(2), 90-97.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cordell, G. A. (1999). *The alkaloids chemistry and biology* (Vol. 52, pp. 7-81). Academic Press.
- Coene, I. (2004). Les antioxydants et l'alimentation. *Nutrition Information Center NICE*, Symposium, 23 Octobre 2004, Bruxelles, Belgique. *Nutrinews*, 4.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press.
- Cyril, T. (2001). *Étude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de Catharanthus roseus en vue du développement d'un modèle cinétique* (Doctoral dissertation). Université de Montréal.
- Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Ed Yves Dacosta.
- Daniele, C., Pittler, J. T., & Ernst, M. H. (2005). *Vitex agnus-castus*. Sécurité des médicaments, 28(4), 319-332.
- Drioua, S., Azalmad, H., El-Guourrami, O., Ameggouz, M., Benkhoulili, F. Z., Assouguem, A., Kara, M., Ullah, R., Ali, E. A., Ercisli, S., Fidan, H., Benzeid, H., & Doukali, A. (2024). Phytochemical screening and antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. *Chemistry*.
- Edenharter, R., & Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of Chromatography A*, 967, 85-113.
- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5, 264-270.
- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106(2-3), 119-133.
- Erlund, I. (2004). Plantes médicinales et aromatique. *Nutrition Research*, 24, 851-874.
- El Kamari, F., Ousaaid, D., Tarog, A., El Atki, Y., Aouam, I., Lyoussi, B., & Abdellaoui, A. (2020). Bioactive ingredients of different extracts of *Vitex agnus-castus* L. fruits from Morocco and their antioxidant potential. *Jordan Journal of Biological Sciences*.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *Actualité Chimique*, 108-115.
- Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *L'actualité chimique*, 390-396.
- Ferreira, H., Flaus, A., & Owen-Hughes, T. (2007). Histone modifications influence the action of Snf2 family remodeling enzymes by different mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 374, 563-579.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes, and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119, 355-364.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: A review. *British Journal of Nutrition*, 88, 587–605.
- Fraga, C. J., & Oteiza, P. I. (2011). Dietary flavonoids: 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.
- Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M., & Orecchioni, A. M. (2001). *Le préparateur en pharmacie* (2nd ed.). TEC&DOC.
- Gilbert, B. L., & Norris, D. M. (1968). A chemical basis for bark beetle (*Scolytus*) distinction between host and non-host trees. *Journal of Insect Physiology*, 14, 1063-1068.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., & Palazón, J. (2013). Phenolic acids. In *Natural Products* (pp. 1951-1973). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_64
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Grieve, M. (1982). *A modern herbal* (2nd ed., Vol. 1). Dover Publications.
- Hajdú, Z., Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., Zupkó, I., et al. (2007). Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytotherapy Research*, 21, 391-394.
- Habbab, A., Sekkoum, K., Belboukhari, N., Cheriti, A., & Aboul-Enein, H. Y. (2016). Essential oil chemical composition of *Vitex agnus-castus* L. from Southern-West Algeria and its antimicrobial activity. *Current Bioactive Compounds*, 12(1), 51-60.
- Harborne, J.B., & Williams, C-A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992.
- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur, p 280.
- Isah, M. B., Tajuddeen, N., Umar, M. I., Alhafiz, Z. A., Mohammed, A., & Ibrahim, M. A. (2018). Terpenoids as Emerging Therapeutic Agents: Cellular Targets and Mechanisms of Action against Protozoan Parasites. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 59, pp. 227-250). Elsevier.
- Jansen, G. H. (1968). *Bibliotheca Botanica* (Vol. 128). Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- JACQUES, B., & ANDRE, R. (2004). *Biochimie métabolique*. Ed ellipses .Paris. pp: 217-219.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clary sage (*Salvia sclarea* L.) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8193-8199.
- Kara, Y. (2018). Determination of total phenolic contents and GC-MS study of *Vitex agnus-castus* Linn. (Chaste berry) grown in Pamukkale, Denizli. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 19(2), 933-938.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Karumi, Y., Onyeyili, P.A., & Ogugbuaja, V.O. (2004). Identification of active principes of balsamina (*Balsam apple*) leaf extract. *Journal of Medical Sciences*, 4, 179-182.
- Kamel, H. (1998). *Les alcaloïdes pyrrolizidiniques: structure, toxicité et activités biologiques*. Editions Universitaires Européennes.
- Kayalar, H., Pabuçcuoğlu, A., & Kivçak, B. (2007). Antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. extracts. *Phytotherapy Research*, 21(11), 1059-1060.
<https://doi.org/10.1002/ptr.2211>
- Khadhraoui, A., Ghazghazi, H., Amri, M., Aouadhi, C., Mokni, R., & Mahjoub, M. A. (2020). Phytochemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Vitex agnus-castus* L. essential oils. *South African Journal of Botany*, 135, 271-280.
- Khan, A. M., Qureshi, R. A., Ullah, F., Gilani, S. A., Nosheen, A., & Sahreen, S. (2011). Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 6017-6023.
- Khiya, Z., Oualcadi, Y., Gamar, A., Berrekhis, F., Zair, T., & EL Hilali, F. (2021). Correlation of Total Polyphenolic Content with Antioxidant Activity of Hydromethanolic Extract and Their Fractions of the *Salvia officinalis* Leaves from Different Regions of Morocco. *Journal of Chemistry*, 2021, 11 pages.
- Kristina, P., & Marika, L. (2003). Les antioxydants dans l'alimentation. *Biotechnologie Finlande*, 3, 738-1069.
- Kuru Üzüm-Uz, A.; Ströck, K.; Demirezer, L.Ö.; Zeek, A. (2003). Glycosides from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*, 63, 959-964.
- Lahsissène, H., Kahouadji, A., Tijane, M., & Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia*, 186, 1-27.
- Lutge, U., Kluge, M., & Bauer, G. (2002). *Botanique* (3ème édition). Technique et documentation. Lavoisier. Paris.
- Macheix, J. J. (1996). Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle. *Acta Botanica Gallica*, 143(6), 473-479.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., & Jimenez L. (2004). Polyphenols: food sources, and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Manallah, A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. (Master's thesis). Université Ferhat Abbas-Setif.
- Majob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., & Vahidipour, H. R. (2003). *Phytochemical screening of some species of Iranian plants*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 77-82.
- Marouf, A., & Reynaud, J. (2007). *La botanique de A à Z*. Ed Dunod. Paris.
- Massaux, C. (2012). Polyphénols: des alliés pour la santé. *Abeilles & Cie*, n°149, 1-4.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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*, 14, 49-60.
- Meda, N. T. R., Bangou, M., Bakasso, S., Millogo, R. J., & Nacoulma, O. G. (2013). Antioxidant activity of phenolic and flavonoid fractions of *Cleome Gynandra* and *Maerua angolensis* of Burkina Faso. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(02), 37.
- Mesaik MA, Azizuddin, Murad S, Khan KM, Tareen RB, Ahmed A, et al. (2009). Isolation and immunomodulatory properties of a flavonoid, casticin from *Vitex agnus-castus*. *Phytotherapy Research*, 23(11), 1516–20.
- Mohamed Ouali, D. (2016). *Travaux en cours* (Doctoral dissertation). Université Ferhat Abbas.
- Muanda, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques [Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz].
- Naboulsi, I., & Aboulmouhajir, A. (2018). Plants extracts and secondary metabolites, their extraction methods and use in agriculture for controlling crop stresses and improving productivity. *Academic Journal of Medicinal Plants*, 6(8), 223-240.
- Naik, J., & Pandey, A. (2019). Synthetic metabolism and its importance in agriculture. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 365-391).
- N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochemical of some Ivorian medicinal plants used in Krobou country (Agboville, Ivory Coast). *African Journal of Natural Sciences*, 6(1).
<https://doi.org/10.4314/scinat.v6i1.48575>
- Niroumand, M. C., Heydarpour, F., & Farzaei, M. H. (2018). Pharmacological and therapeutic effects of *Vitex agnus-castus* L.: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 12(23).
- Ohyama, K., Akaike, T., Hirobe, C., & Yamakawa, T. (2003). Cytotoxicity and apoptotic inducibility of *Vitex agnus-castus* fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(1), 10-18.
- Oloyede, O. I. (2005). Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4, 379-381.
- Paolini, V., Dorchies, Ph., & Hoste, H. (2003). Effect of condensed tannins and tannin-containing plants on gastrointestinal strongyles in sheep and goats. *Alternatives in Agriculture*, 17-19.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlarge N., Burillo J., & Codina C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled Mediterranean herb and aromatic plants.
- Pourrut B., Perchet G., Silvestre J., Cecchi M., Guiresse M., & Pinelli E. (2008). *Publishers*, p 115–136.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rahmatullah, M., Jahan, R., Azam, F. S., Hossan, S., Mollik, M. A. H., & Rahman, T. (2011). Folk medicinal uses of Verbenaceae family plants in Bangladesh. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(5S).
- Rashed, K. N. (2013). Antioxidant activity of different extracts of *Vitex agnus-castus* (L.) and phytochemical profile. *Research in Pharmacy*, 3(6), 01-05.
- Rani, A., & Sharma, A. (2013). *Le genre Vitex: un examen. Revue de Pharmacognosie*, 7(14), 188.
- Ruchika, J. N., & Pandey, A. (2018). Synthetic metabolism and its significance in agriculture. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Synthetic Biology, Cell Engineering and Bioprocessing Technologies*, 365.
- Roberts, M. F. (2013). *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Springer Science & Business Media.
- Sarac, N., Ugur, A., & Sen, B. (2015). In vitro antimutagenic activity of *Vitex agnus-castus* L. essential oils and ethanolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 63, 100-103.
- Sağlam, H., Pabuçcuoğlu, A., & Kivçak, B. (2007). Antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. extracts. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(11), 1059–1060.
- Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., & Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2479–2483.
- Sereme, A., Millogo-rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. (2008). Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaines*, 15, 41–49.
- Sena-Filho, J. G., Penderter, J., Maia, G. L., Tavares, J. F., Xavier, H. S., Sobra Da Silva, M., & Barbosa-Filho, J. M. (2008). Ecdystéroïdes des espèces *Vitex* : distribution et compilation de leurs données spectrales 13C-RMN. *Chimie et Biodiversité*, 5(5), 707-713.
- Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058–2070.
- Singh, U., Devaraj, S., & Jialal, I. (2005). Vitamin oxidative stress and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 25, 151–175.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4275.
- Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., & Zhang, Y. (2011). Evaluation of the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2689-2696.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sparg, G. S., Light, M. E., & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- Taibi, F. Z., & Bousbeh, M. (2022). Activités anti-oxydantes de *Salivea argentea*. [Mémoire de master, Université Moulay Tahar]. Faculté des Sciences, Département de Biologie.
- Tamuly, C., Hazarika, M., Bordoloi, M., Bhattacharyya, P. K., & Kar, R. (2014). Biosynthèse de nanoparticules d'Ag utilisant le pédicellamide et son activité photocatalytique : une approche respectueuse de l'environnement. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132, 687-691.
- 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*.
- Teixeira da Silva, J. A. (2004). Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*, 3, 706-720.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., & Statti, G. A. (2006). Biological and pharmacological activities of iridoids: Recent developments. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 399-420.
- Toogood, H. S., Mansell, D., Gardiner, J. M., & Scrutton, N. S. (2012). Enantioselective bioreduction of C–C double bonds. In *Comprehensive Chirality* (Vol. 7, pp. 231-258). Elsevier.
- Topcu, G., & Gören, A. C. (2007). Biological activity of diterpenoids isolated from Anatolian Lamiaceae plants. *Records of Natural Products*, 1(1), 1.
- Vansant, G. (2004). Radicaux libres et antioxydants : Principes de base. *Institut Danone*.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Wink, M. (2010). Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. In M. Wink (Ed.), *Annual Plant Reviews* (Vol. 39, pp. 21-49). Wiley-Blackwell.
- Yushchyshena, O., & Tsurkan, O. (2014). Phenolic compounds content in *Vitex agnus-castus* L. and *V. cannabifolia* Sieb. growing in Ukraine. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2(5), 36-40.
- Zahid, H., Rizwani, H., & Ishaq, S. (2016). Phytopharmacological review on *Vitex agnus-castus*: A potential medicinal plant. *Chinese Herbal Medicines*, 8(1), 24-29.
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735-769.
- <https://www.iqrashop.com/Chajarat-Mariam-Gattilier-Rose-de-Jericho-Kef-Meriem--Sante-Dietetique-p14144-.html>