

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABOU BEKR BELKAID –TLEMCEM–
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie



Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie :

Synthèse et activités biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences biologique

Option : Biochimie appliquée

Thème :

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité
antioxydante des différents extraits bruts et d'alcaloïdes des
graines de *Vitex agnus castus***

Présenté par :

M^{elle} HACHI Imane & M^{elle} SEFIOUN Roumaïssa

Soutenu le 20 -06-2024 devant les membres de jury :

Présidente :	BENARIBA Nabila	pr	Univ. Tlemcen
Encadreur :	AZZI Rachid	Pr	Univ. Tlemcen
Examinatrice :	ABBOU Fayza	MAB	Univ. Tlemcen
Examinatrice :	ADJDIR Sarra	MAB	Univ. Tlemcen

Année Universitaire : 2023/2024

REMERCIEMENT

En premier lieu, nous tenons à remercier « **Allah** », pour nous avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadrant Monsieur **AZZI Rachid**, professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, université Abou BekrBelkaid -Tlemcen, qui nous a dirigé dans ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, ses commentaires, sa bienveillance, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire. Ce fut un immense plaisir de travailler avec vous Professeur.

Nos vifs remerciements également aux membres de jury :

MmeBENARIBA Nabila,Professeur au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, université Abou BekrBelkaid -Tlemcen,pour l'honneur qu'elle nous faite en acceptant de présider le jury de notre mémoire et de le rehausser par sa grande expertise.

Mme ADJDIRSara, Maître assistante de classe B au Département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen, Nos sincères considérations et remerciements pour ses précieux conseils, sa gentillesse, sa bienveillance et avoir accepté d'examiner notre travail.

Mlle Abbou Fayza, Maître assistante de classe B au Département de Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, université Abou BekrBelkaid -Tlemcen pour ses précieux conseils, qui nous a aidé à réaliser la pratique de ce travail, et pour avoir accepté d'être membres de ce jury.

Dédicace

Avec l'aide de **Dieu** tout puissant, qui m'a tracé le Chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail qui je dédie à :

Ama mère et mon père, La raison de mon bonheur dans ma vie merci pour leurs soutiens durant le long chemin de mes études, qui ont toujours été là pour moi, et qui ont beaucoup sacrifié pour que j'atteins ce niveau, j'espère qu'ils sont fiers de leur fille et Je tiens à vous remercier pour votre amour, votre compréhension et votre soutien qui a illuminé mon parcours. (Que Dieu te garde pour moi)

*À mes chères frères Zakaria et Ayoub, je vous remercie pour vos efforts, votre présence et votre compréhension à mes côtés tout au long chemin de mes études. Surtout **ZAKI**, je n'ai pas trouvé assez de mots pour te remercier, je me contenterai de que Dieu te garde comme frère et me soutienne dans ma vie.*

*A ma famille **HACHI**, merci pour votre soutien et j'espère que vous êtes satisfait de votre fille*

A Ma grand mère ,Merci pour chaque conseil que vous m'avez donné et chaque sourire qui m'a rendu plus fort. Tu es décédé, mais tu n'as jamais quitté mon cœur, J'aurais aimé que tu sois avec moi aujourd'hui et que tu sois fier de ta fille.

(Que Dieu te bénisse)

A ma deuxième famille Taghli, Merci pour votre soutien, de m'avoir donné tant d'amour

A mes copines ,Ilhem,IkramZ,Sara ,ikramA ,Amina,Ismahen,Merieme, Nesrine

Merci pour vos soutiens, vos confiances, et vos conseils précieux qui m'ont aidé dans les moments difficiles.

Ma cher binôme, Romaissa Je vous remercie pour votre aide précieuse pour votre soutien moral, ta patience et ta compréhension tout au long de ce projet. Merci beaucoup.



Imane

Dédicace

Avec gratitude et humilité, je remercie mon Dieu Tout-Puissant, dont la guidance divine a illuminé chaque étape de ce parcours, Je dédie ce travail à :

*Mes chers parents **Djamel et Halima** ,pour leur soutien indéfectible tout au long de mes études. Ils ont toujours été là pour moi et ont beaucoup sacrifié pour que j'atteigne ce niveau. J'espère qu'ils sont fiers de leur fille et que Dieu les bénisse pour moi.*

*À ma chère sœur **Marwa**.*

*À mon cher frère **Rabah** .*

*À mes meilleures copines **Ikram et Yamina** qui ont partagé avec moi des beaux moments et souvenirs durant toutes les années scolaires de primaire à l'université.*

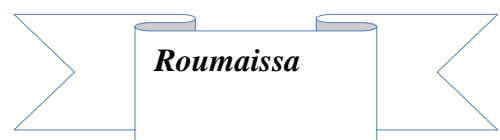
*A mes copines **Meriem, Nesrine***

*À ma chère binôme **Imane** , pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

À mes chers professeurs qui m'ont enseigné tout au long de mon parcours universitaire.

À toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce

Travail.



الملخص

كف مريم (*Vitex agnus castus*) نبات طبي من عائلة الريبيناكيا، معروف في الجزائر ويستخدم على نطاق واسع لخصائصه العلاجية.

تعتمد هذه الدراسة على الاختبارات الكيميائية النباتية، وتقدير المركبات الفينولية وتقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الخام المائية الميثانولية التي تم تحضيرها بواسطة النقع والغلي، بالإضافة إلى مستخلص الأكلويدات الذي تم تحضيره من بذور نبتة كف مريم.

كشفت نتائج الفحص الكيميائي النباتي للمستخلصات الخام المائية الميثانولية عن وجود الأكلويدات، العفص، الفلافونويدات، التربينويدات، والكينونات الحرة وغياب المركبات المختزلة، الأنثراكينونات، الصابونين، والكومارينات. كما أظهرت تقديرات المركبات الفينولية وجود الفلافونويدات والبوليفينولات في كلى المستخلصين الخامين المدروسين (الغلي والنقع)، حيث سجل المستخلص المحضر بالغلي أعلى نسبة من إجمالي البوليفينولات بقيمة 0.34 ± 252.79 ميكروغرام مكافئ حمض الجاليك/ملغ من المستخلص الجاف، بينما أظهر المستخلص الخام المحضر بالنقع أعلى نسبة من الفلافونويدات بقيمة 0.017 ± 36.76 ميكروغرام مكافئ حمض الجاليك/ملغ من المستخلص الجاف .

بالإضافة إلى ذلك، أظهر المستخلص المائي الميثانولي المحضر بالغلي نشاطاً مضاداً للأكسدة جيداً مقارنة بالمستخلصات الأخرى المدروسة، حيث كانت قيمة IC_{50} له (تركيز نصفي مثبط) 1.77 ملغ/مل لاختبار تثبيط الجذور الحرة DPPH ، وقيمة EC_{50} له (تركيز نصفي مفعول) 0.61 ملغ/مل لاختبار القدرة الاختزالية للحديد (FRAP). لكن هذه النتائج تظل ضعيفة مقارنة بحمض الأسكوربيك المستخدم كمعيار، والذي أظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة قوياً بقيمة IC_{50} 0.118 ملغ/مل (تركيز نصفي مثبط) وقيمة EC_{50} 0.066 ملغ/مل (تركيز نصفي مفعول).

من ناحية أخرى، سجل مستخلص الأكلويدات نشاطاً مضاداً للأكسدة ضعيفاً جداً، إذ لم تتجاوز نسبة تثبيط الجذور الحرة DPPH %40 عند تركيز 32 ملغ/مل.

الكلمات المفتاحية: كف مريم، الفحص الكيميائي النباتي، الأكلويدات، المستخلصات الخام، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، FRAP.

Résumé

Vitex agnus castus est une plante médicinale, de la famille des Verbénacées, connue en Algérie sous le nom de Kef Meriem. Elle est largement utilisée pour ses propriétés thérapeutiques.

Ce travail est basé sur les tests phytochimiques, le dosage des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts hydrométhanoliques préparés par macération et décoction et d'extrait d'alcaloïdes préparé des graines de *vitex agnus castus*

Les résultats de criblage phytochimique des extraits bruts hydrométhanoliques ont révélé la présence des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des terpénoïdes, et des quinones libres et l'absence des composés réducteurs, des anthraquinones, des saponines et des coumarines

Les dosages des composés phénoliques ont montré la présence des flavonoïdes et des polyphénols dans les deux extraits bruts étudiés (décoction et macération). L'extrait préparé par décoction a enregistré la teneur la plus élevée en polyphénols totaux avec une valeur de $252,79 \pm 0,34 \mu\text{g Eq AG/ mg ES}$. Tandis que, l'extrait brut préparé par macération a montré la teneur la plus élevée en flavonoïdes avec une valeur de $36,76 \pm 0,017 \mu\text{g Eq AG/ mg ES}$.

Par ailleurs, l'extrait hydrométhanolique préparé par décoction a présenté une bonne activité antioxydante, par rapport aux autres extraits étudiés, avec une CI_{50} de l'ordre de $1,77 \text{ mg/ml}$, pour le test du piégeage du radical libre DPPH, et une EC_{50} de l'ordre de $0,61 \text{ mg/ml}$, pour le test du pouvoir réducteur de fer (FRAP). Ces résultats restent faibles par rapport à ceux de l'acide ascorbique, utilisé comme standard, qui a montré une forte activité antioxydante avec une CI_{50} de l'ordre de $0,118 \text{ mg/ml}$ et une EC_{50} de l'ordre de $0,066 \text{ mg/ml}$.

Par contre, l'extrait d'alcaloïdes a enregistré une très faible activité antioxydante. Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH n'a pas dépassé 40% à une concentration de 32 mg/ml .

Mots clés : *Vitex agnus castus*, criblage phytochimique, alcaloïdes, extraits bruts, activité antioxydante, DPPH, FRAP.

Abstract

Vitex agnus castus is a medicinal plant from the Verbenaceae family, known in Algeria as Kef Meriem. It is widely used for its therapeutic properties. This work is based on phytochemical tests, the quantification of phenolic compounds, and the evaluation of the antioxidant activity of raw hydromethanolic extracts prepared by maceration and decoction, and an alkaloid extract prepared from the seeds of *Vitex agnus castus*.

The results of phytochemical screening of the raw hydromethanolic extracts revealed the presence of alkaloids, tannins, flavonoids, terpenoids, and free quinones, while showing the absence of reducing compounds, anthraquinones, saponins, and coumarins.

The quantification of phenolic compounds indicated the presence of flavonoids and polyphenols in both studied raw extracts (decoction and maceration). The extract prepared by decoction recorded the highest content of total polyphenols with a value of $252.79 \pm 0.34 \mu\text{g GAE/mg DE}$. On the other hand, the raw extract prepared by maceration showed the highest flavonoid content with a value of $36.76 \pm 0.017 \mu\text{g GAE/mg DE}$.

Furthermore, the hydromethanolic extract prepared by decoction demonstrated good antioxidant activity compared to the other studied extracts, with an IC₅₀ of around 1.77 mg/ml for the DPPH free radical scavenging test, and an EC₅₀ of around 0.61 mg/ml for the ferric reducing antioxidant power (FRAP) test. However, these results are weak compared to those of ascorbic acid, used as a standard, which showed strong antioxidant activity with an IC₅₀ of around 0.118 mg/ml and an EC₅₀ of around 0.066 mg/ml.

Conversely, the alkaloid extract recorded very low antioxidant activity. The inhibition percentage of the DPPH free radical did not exceed 40% at a concentration of 32 mg/ml.

Keywords: *Vitex agnus castus*, phytochemical screening, alkaloids, raw extracts, antioxidant activity, DPPH, FRAP.

Liste des figures

Figure 1: Différente partie <i>Vitex agnus castus</i>	4
Figure 2: Structure des différents types d'alcaloïdes	11
Figure 3: appareil d'extraction Soxhlet classique	12
Figure 4: Partie aérienne de <i>Vitex agnus castus</i>	15
Figure 5: Droite d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux....	26
Figure 6: Droite d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	26
Figure 7: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en présence de l'acide ascorbique.....	28
Figure 8: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut EBM (macération) de la plante <i>Vitex agnus castus</i>	28
Figure 9: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut EBD (décoction) de la plante <i>Vitex agnus castus</i>	29
Figure 10: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique des alcaloïdes des graines de <i>Vitex agnus castus</i>	29
Figure 11: Pouvoir réducteur du fer en présence de l'acide ascorbique.....	31
Figure 12: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait brut EBD (décoction) des graines de <i>Vitex agnus castus</i>	31
Figure 13: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait brut EBM (macération) des graines de <i>Vitex agnus castus</i>	32
Figure 14: Pouvoir réducteur du fer de l'extrait méthanolique des alcaloïdes des graines de <i>Vitex agnus castus</i>	32



Liste des tableaux

Tableau 01: Structure moléculaire des composants moléculaire majeurs les plus pertinents de <i>Vitex agnus castus</i>	6
Tableau 02: :Caractéristiques de différents extraits préparés des graines de <i>Vitex agnuscastus</i>	24
Tableau 03: :Résultats de l'examen phytochimique des extraits bruts hydrométhanolique préparés des graines de <i>Vitex agnus castus</i>	25
Tableau 04: :Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les différents extraits des graines de <i>Vitex agnus castus</i>	27
Tableau 05: :Les valeurs CI50 des différents extraits des graines de <i>Vitex agnus castus</i>	30
Tableau 06: Les valeurs EC50 des différents extraits des graines de <i>Vitex agnus castus</i>	33

Table des matières

Introduction	1
---------------------------	----------

CHAPITRE 01: *Vitex agnus castus*

1. les plantes médicinales	5
2. les métabolites secondaires des végétaux.....	5
3. Description de la plante étudiée : <i>Vitex agnuscastus</i>.....	5
3.1.noms vernaculaire	5
3.2. répartition géographique	6
3.3. Description botanique	6
3.4. Classification	7
3.5. Utilisation traditionnelles.....	7
3.6. Composition photochimique.....	7
3.7.Activités biologiques.....	10

CHAPITRE 02 : Généralités sur les alcaloïdes

1. Définition	12
2. localisation	12
3. propriétés physico chimique	12
4.la solubilité.....	13
5. classification	13
6. méthodes d'extraction.....	14
6.1. Extraction des alcaloïdes par solvant organique polaire	14
6.2. Extraction par l'eau acidifiée.....	16
6.3. Extraction par solvant organique apolaire	16
7. détection de la présence alcaloïdes	16
8. toxicité des alcaloïdes.....	16
9. rôle écologique	17

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	19
2. préparation des extraits	19
2.1. Extrait brute hydrométhanolique	19
2.1.1. macération	19
2.1.2.décoction	20
2.2. Extraction des alcaloïdes.....	20
2.3. le rendement des extraits	21
3.screening photochimique	21
3.1. les composées azotes	23
3.2. les composées phénoliques	23
3.3. les composées terpéniques	23
3.4.les composées réducteurs	23
4.dosage des composées phénoliques	23
4.1.Dosage des polyphenols totaux	23
4.2. Dosage des flavonoïdes	24
5.évaluation de pouvoir antioxydant extraits de la plante	25
5.1 test de piégeage de radicale DPPH.....	25
5.2 test de pouvoir réducteur de fer FRAP.....	26
6.analyse statistique	27

Résultats et interprétation

1. Rendements	29
2. criblage phytochimique	29
3. dosage des composées phénoliques	30
4. recherche de l'activités antioxydante	32
4.1.piégeage de radicale DPPH.....	33
4.2.pouvoir de réducteur de fer	36

Discussion	35
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographiques.....,,.....	40

Liste des abréviations

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

CUPRAC: Cupric ion reducing antioxidant capacity.

DPPH: 2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle.

EB : Extrait brute.

EBD:extrait brut préparé par décoction

EBM : extrait brut préparé par macération

EC₅₀ : Concentration efficace.

Fe 2+ : Fer ferreux.

Fe 3+ : Fer ferrique.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

I (%) : Pourcentage d'inhibition.

ND:non déterminé.

TCA : Acide trichloracétique.

V/V : Volume/Volume.

µg Eq AG/ mg ES : Microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait sec

µg Eq C/ mg ES : Microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait sec.

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont des drogues reconnus comme médicaments traditionnels utilisés depuis des siècles. Aujourd'hui, malgré les progrès de la chimie de synthèse, leurs utilisations sont devenues très importantes en raison de leurs efficacités dans diverses méthodes thérapeutiques. (Lazli et al., 2018).

Ces plantes possèdent des principes actifs, qui sont des molécules responsables d'une action thérapeutique (Limonier, 2018). Ils sont classés, généralement, en composés terpéniques, en composés phénoliques et en composés azotés(alcaloïdes).Ce sont des métabolites secondaires présents dans tout le règne végétal et connus par leurs activités biologiques telles que l'activité antioxydante, (Vermerius et Nicholson, 2006 ; Zillich et al., 2015).

Les alcaloïdes sont des composés organiques azotés d'origine naturelle, le plus souvent végétale, basiques, se présentent le plus souvent sous l'aspect de cristaux, insolubles dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques (Dih et Belguendouz, 2017). Ces composés sont utilisés comme « médicaments » dans le traitement certaines maladies aiguës, comme le cancer, l'hypertension, le diabète et l'hépatite, tant en médecine traditionnelle que moderne (Gidado et al.,2005).

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses maladies en tant que facteur déclenchant ou associé à des complications. Ces dernières années, l'attention s'est portée sur les activités biologiques des plantes médicinales, notamment leur activité antioxydante, en raison de leur rôle dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies cardiaques, le cancer, le diabète, l'hypertension et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (Meddout et al., 2013).

Vitex agnus castus est une plante médicinale qui pousse dans la région méditerranéenne, en Europe et en Asie (Ahangarpour et al., 2016). Elle appartient à la famille des Verbénacées, communément appelée gattilier (Yushchyshena et Tsurkan, 2014). Cette plante a été utilisée en médecine traditionnelle contre divers maladies (Neumann-Kuhnelt et al., 1993). De plus, plusieurs activités biologiques, notamment l'activité antioxydante, ont été étudiées pour cette plante (Ekundayo et al., 1990).

De notre part, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimiques, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts hydrométhanoliques préparés par macération et décoction et d'extrait d'alcaloïdes préparé des graines de *Vitex agnus castus*, récoltées dans la wilaya de Tlemcen.

Ce travail est basé sur :

Introduction

- La préparation des extraits bruts hydrométhanoliques par macération et décoction ;
- L'extraction des alcaloïdes ;
- Le criblage phytochimique des graines de *Vitex agnus castus*.
- Le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes totaux).

L'évaluation de l'activité antioxydant (piégeage du radical DPPH[•] : 2,2-diphényl-1-picrylhydrozyl) et antioxydante (pouvoir réduction du Fer : FRAP), des extraits bruts hydrométhanoliques et d'extrait d'alcaloïdes des graines de *Vitex agnus castus* .

Nous envisageons dans cette étude deux parties :

Dans la première partie, nous présentons une synthèse bibliographique qui regroupe deux chapitres dont le premier présente une description détaillée de la plante étudiée *Vitex agnus castus*, et le deuxième est regroupe des généralités sur les alcaloïdes

La deuxième partie, partie expérimentale, est répartie en deux chapitres : le premier décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail et le deuxième, regroupe les résultats obtenus et la discussion

Synthèse bibliographique

Chapitre I

La plante étudiée

Vitex agnus castus

1. Les plantes médicinales

« Une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est médicinal. C'est-à-dire qu'elle est présentée via ces propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (Moreau, 2003).

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. Ainsi, même malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (Tabuti et al., 2003).

2. Les métabolites secondaires des végétaux

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont classés en quatre grandes catégories : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies (Hartmann, 2007), et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité.

Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires ; ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques (Epifano et al., 2007).

1. Description de la plante étudiée : *Vitex agnus castus*

1.1. Noms vernaculaires

Vitex agnus castus est une espèce qui appartient à la famille des Verbénacées, connus sous les noms communs : gattilier et de poivre des moines en français, Chasteberry en anglais et كف مريم en arabes (Ono et al., 2011).

1.2. Répartition géographique

Vitex agnus castus se trouve généralement dans les environnements situés en Asie centrale, dans la région méditerranéenne et en Europe du Sud (Ono et al. 2011 ; Rani et Sharma, 2013).

Chapitre 01

1.3. Description botanique

C'est un petit arbre à feuilles caduques ou un grand arbuste qui peut atteindre en moyenne 1,5m à 2 m de haut. Le diamètre des feuilles est de 7,6 à 10 cm et les feuilles ressemblent à des doigts contenant 5 à 7 folioles en forme de doigts (**Figure1**).

Les fleurs sont en grappes, violette à bleue à violet foncé, parfumées, fleurissent de l'été jusqu'au début de l'automne, et les fruits sont des mûres violettes qui portent quatre graines semblables au poivre noir (**Figure 1**) (Rani et Sharma,2013 ; Ono et al., 2011).

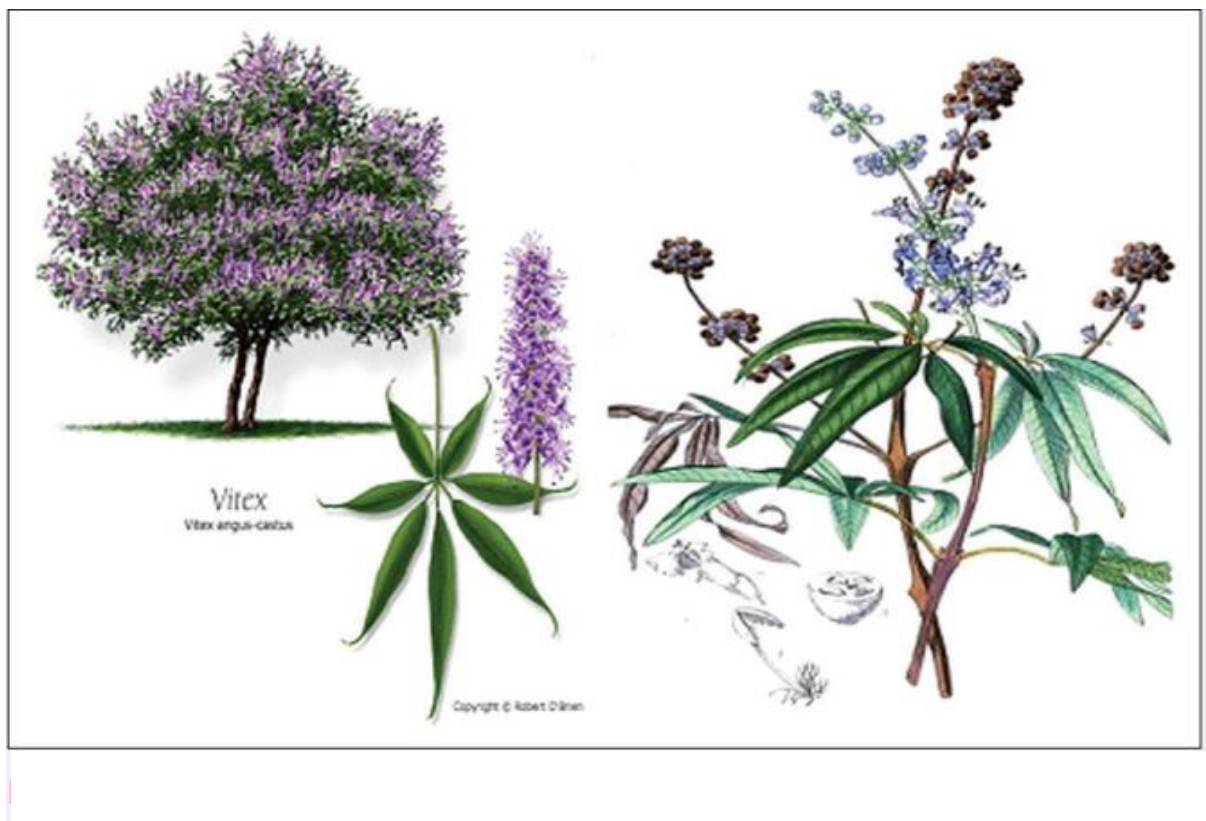


Figure 1 : Description botanique des différentes parties de *Vitex agnus castus*

1.4. Classification

L'arbre Gattilier peut être classé selon la classification de Cronquist (1981) :

Chapitre 01

Règne	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Ordre	: Lamiales
Famille	: Verbenaceae
Sous-famille	: Nepetoideae
Genre :	: <i>Vitex</i>
Espèce	: <i>agnus-castus</i>
Nom scientifique	: <i>Vitex agnus-castus</i>

1.5. Utilisations traditionnelles

En médecine traditionnelle, les feuilles et les fruits de *Vitex agnus castus* sont utilisés dans les aliments, comme arômes et épices, et les baies comme substitut au poivre (Amin, 1991 ; Li et al., 2023).

Les fruits de cette plante sont utilisés depuis plus de 2 500 ans en Égypte ancienne, la Grèce, l'Iran et Rome pour traiter divers problèmes gynécologiques. Ils ont également été utilisés pour leurs activités de réduction de la libido (Roemheld-Hamm et Gattilier, 2005). Ils sont recommandés comme remède hormonal pour soulager les troubles menstruels et comme antiépileptique, carminatif, énergisant, sédatif, anticonvulsivant, tranquillisant et pour traiter les troubles digestifs (Amin, 1991 ; Khalilzadeh et al., 2015).

L'arbre *Vitex agnus castus* est également appelé « agneau chaste », en raison de la diminution du désir sexuel après avoir bu une boisson, produit à partir des graines de cette plante (Girman et al., 2003).

1.6. Composition phytochimique

Les fruits de *Vitex agnus castus* possèdent une large gamme de molécules chimiques, notamment des huiles essentielles, des flavonoïdes, des glycosides iridoïdes, des diterpénoïdes tels que l'agnuside, des isoflavonoïdes et des composés phénoliques (Mancho et Edwards, 2005; Ono et al., 2008; Li et al., 2013 ; Pouvoirs et Setzer, 2015).

Les principaux composants actifs de cette plante sont les flavonoïdes, qui sont représentés par l'acasticine, l'apigénine, la vitexine, l'isovitexine, la lutéoline, l'orientine, l'isorientine, la santine, 6"-la caféoylisorientine et sa méthyl 5-O-déméthyltangerétine (**Tableau1**) (Girman et al., 2003).

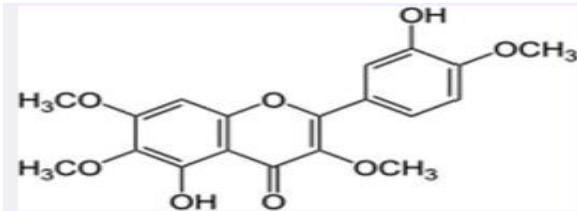
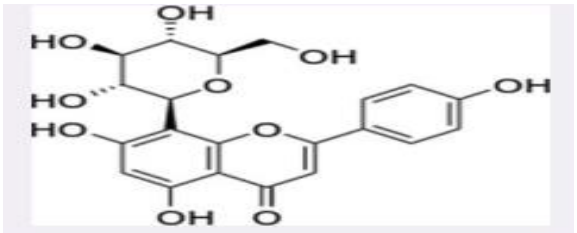
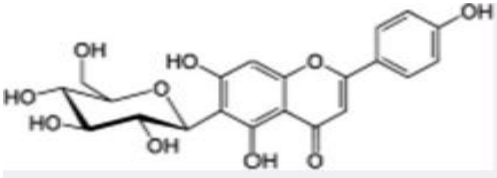
Chapitre 01

Le 8-14-labdadiène-6,7,13-triol-6,7-diacétate, les viteagnusines A-J, le viteagnuside A et les vitexlactames A–C font partie des ingrédients diterpénoïdes de la plante. De plus, l'isoflavonoïdevitexcarpane. De plus, les composés phénoliques agnucastosite C, agnuside, acide *p*-hydroxybenzoïque, ester de glucose de l'acide *p*-hydroxybenzoïque (**Tableau1**) (Li et al., 2013 ; Pouvoirs et Setzer, 2015), et l'acide linoléique ont été isolés et identifiés dans les fruits (Ono et al., 2011).

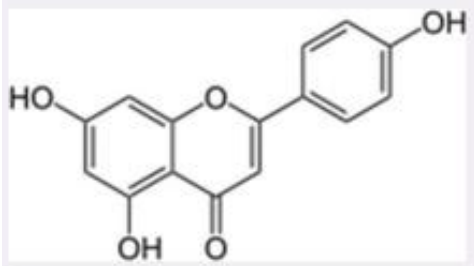
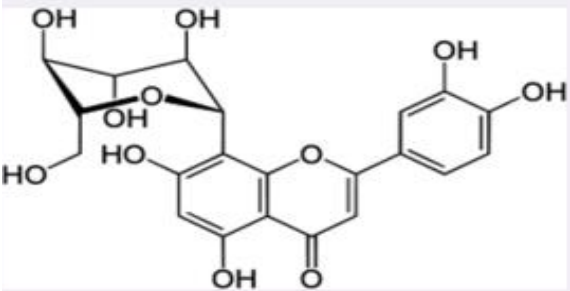
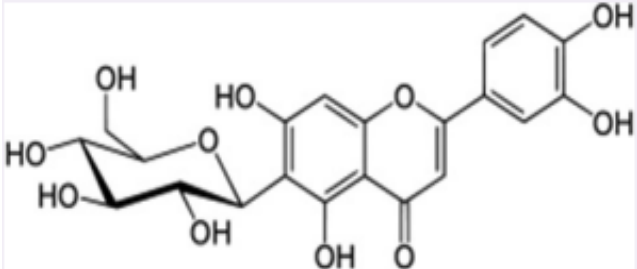
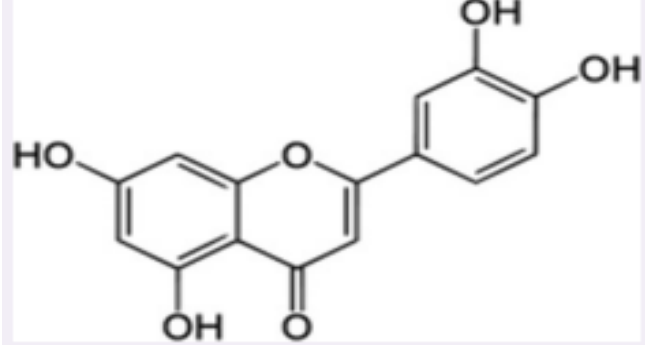
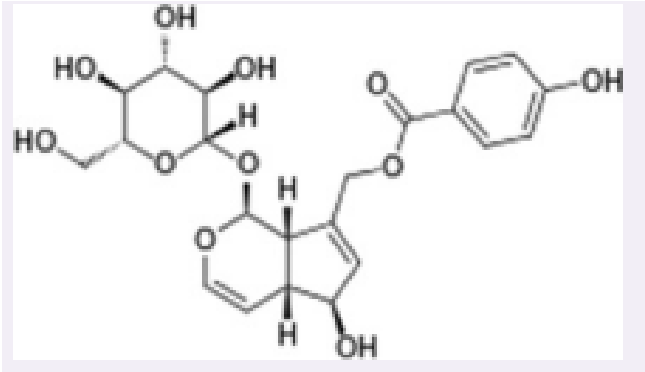
Les constituants d'huiles essentielles du *V. agnuscastus* les plus importants sont : le 1,8-cinéole, le sabinène, l' α -pinène, l'acétate d'aterpinyle et le (Z)- β -farnésène (Webster et al., 2011).

Les constituants de référence utilisés pour la standardisation de la préparation naturelle de *Vitex agnus castus* sont l'agnuside, l'aucubine, la casticine et la vitexilactone(**Tableau1**)(Webster et al., 2011 ; Mari et al., 2012).

Tableau 1 : Structure des composants phytochimiques majeurs les plus pertinents de *Vitex agnus castus*.

Nom Composé	Structure chimique
Casticine	
Vitexine	
Isovitexine	

Chapitre 01

Apigénine	 <p>The chemical structure of Apigenin is a flavone. It consists of a chromone core (a benzene ring fused to a pyrone ring) with a 4-hydroxyphenyl group attached to the 7-position of the pyrone ring. The chromone core has hydroxyl groups at the 5 and 6 positions and a carbonyl group at the 4-position.</p>
Orientine	 <p>The chemical structure of Orientin is a flavone glycoside. It features the apigenin core with a 4-hydroxyphenyl group at the 7-position. The 3-position of the chromone core is glycosylated with a glucose molecule in its pyranose form.</p>
Isoorientine	 <p>The chemical structure of Isoorientin is a flavone glycoside. It features the apigenin core with a 3,4-dihydroxyphenyl group at the 7-position. The 3-position of the chromone core is glycosylated with a glucose molecule in its pyranose form.</p>
Lutéoline	 <p>The chemical structure of Luteolin is a flavone. It consists of a chromone core with hydroxyl groups at the 5 and 6 positions and a carbonyl group at the 4-position. It has a 3,4-dihydroxyphenyl group attached to the 7-position of the pyrone ring.</p>
Agnuside	 <p>The chemical structure of Agnuside is a complex flavone glycoside. It features a chromone core with a 4-hydroxyphenyl group at the 7-position. The 3-position of the chromone core is glycosylated with a glucose molecule. The glucose is further substituted with a galactose molecule at the 2-position and a rhamnose molecule at the 6-position. The rhamnose is substituted with a 4-hydroxyphenyl group at the 1-position.</p>

1.7. Activités biologiques

➤ Propriétés gynécologiques

Les principales utilisations traditionnelles du fruit *Vitex* concernent les problèmes gynécologiques et hormonaux tels que le syndrome prémenstruel (SPM), les troubles postménopausiques et la libidomodulation.

Les préparations à base de fruits sont utilisées comme agents anti-inflammatoires.

Symptômes de baisse de libido, de dysménorrhée et de ménopause, de syndrome prémenstruel et d'acné, pour traiter l'infertilité et arrêter la lactation (Halaska et al., 1999; Webster, 2008 ; AMR, 2009).

➤ Propriétés anti tumorales

Le fruit *Vitex* présente des propriétés antitumorales. Les préparations à base de *Vitex agnus castus*, *V. trifolia* et *V. rotundifolia* induisent l'apoptose dans les lignées de cellules tumorales (Xu, et al., 2012).

➤ Propriétés antioxydants

Les fruits de *Vitex* se distinguent par leur forte capacité antioxydante. Les extraits méthanol-acétone-eau de trois espèces de *Vitex* (*V. doniana*, *V. keniensis* et *V. fischeri*) du Kenya ont été étudiés pour leur activité antioxydante à travers différentes méthodes (DPPH, FRAP et piégeage du NO), Les résultats ont montré que les fruits mûrs présentaient une activité antioxydante plus élevée que les fruits verts, comparable à celle des standards utilisés tels que la vitamine C, la rutine et l'acide gallique (Ochieng et Nanwa, 2010).

Chapitre II
Généralités Sur Les
Alcaloïdes

1. Définition

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIX^{ème} siècle. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910. Un alcaloïde est un composé organique naturel (généralement d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome. Il possède une structure moléculaire complexe plus ou moins basique et présente des propriétés physiologiques importantes même à faible dose (Bruneton, 1999 ; Zenk et Juenger, 2007).

Considérant un ensemble captivant de produits naturels, ils forment l'un des plus vastes groupes de métabolites secondaires, comprenant environ 10 000 à 12 000 structures différentes (Roberts et Wink, 1999 ; Stöckigt et al., 2002).

2. Localisation

Pour une plante donnée, la teneur en alcaloïdes peut être très inégale selon les organes, certains pouvant en être dépourvus. Les alcaloïdes sont retrouvés sous formes solubles, sels (citrate, malate, tartrate, méconate, isobutyrate, benzoate) ou sous forme complexée avec des tanins.

Les alcaloïdes sont présents dans les parties florales, les fruits ou les graines de nombreuses plantes, et ils sont concentrés dans les vacuoles (Krief, 2003).

Souvent localisés ou fabriqués dans les tissus périphériques, ils comprennent les écorces (tiges ou racines) et les téguments (graines). Les alcaloïdes sont généralement synthétisés dans les tissus en pleine croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Ensuite, ils s'installent dans d'autres endroits et, lors de ces transferts, ils peuvent être modifiés.

3. Propriétés physicochimiques

Généralement les alcaloïdes sont connus par les propriétés physicochimiques :

- Le poids moléculaire des alcaloïdes varie de 100 à 900 dalton
- Sont le plus souvent des solides cristallisables.
- Rarement colorés.
- Certains sont des liquides à température ambiante (généralement des alcaloïdes non oxygénés) (Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999).
- Ce sont des composés complexes avec des formules différentes.

- Les alcaloïdes se précipitent sous l'action de certains réactifs appelés « les réactifs généraux des alcaloïdes » et forme :
 - ✓ Précipité blanc jaunâtre avec le réactif de Valser-Mayer.
 - ✓ Précipité rouge orangé avec le réactif de Dragendorff.
 - ✓ Précipitent aussi à la présence de l'acide picrique et les tanins (Jean, 2009).

4. La solubilité

Les alcaloïdes sont des composés à caractères basiques, leur basicité est très variable. Dépend de la disponibilité du doublet de l'azote existant. Ainsi, leur solubilité est fortement influencée par la présence des groupements liés à l'atome d'azote, les groupements électro attracteurs adjacents à l'atome d'azote diminuent la basicité, tandis que ceux électrodonneurs augmente la basicité.

Cette basicité peut aussi être un facteur d'instabilité de ces molécules. Sous l'état de base ou en solution, elles sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène.

Leur solubilité est affectée par le niveau de pH (plus le pH est acide plus la solubilité augmente). Ils forment des sels avec les acides (organiques et minéraux), sont généralement insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (alcools, chloroforme, acétone, etc.), alors que leurs sels ont des caractères de solubilité inverses (Jaber, 2017 ; Ramanathan et al., 2015).

5. Classification

Les alcaloïdes peuvent être divisés en trois classes : **les alcaloïdes vrais**, **les proto-alcaloïdes** et **les pseudo-alcaloïdes**.

➤ **Les alcaloïdes vrais** : existent dans les plantes soit sous forme libre soit sous forme de sels, soit comme N-Oxyde (Badiaga, 2011), Ayant pour origine biosynthétique un acide aminé où l'azote est inclus dans un hétérocycle, ils sont dotés d'une activité pharmacologique significative (Jean, 1996) (**Figure 2(a)**).

➤ **Proto alcaloïdes** : sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle basique, élaborés *in vivo* à partir d'acide aminé, Ils dérivent aussi d'acides aminés. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont solubles dans l'eau (Badiaga, 2011) (**Figure 2(b)**).

➤ **Les pseudo-alcaloïdes :** ont les mêmes caractéristiques que les vrais alcaloïdes, seulement ils ne sont pas dérivés d'acides aminés (Bruneton, 1999). Les alcaloïdes stéroïdes et les purines sont les représentants principaux de cette classe d'alcaloïdes (Cyril, 2001). (Figure 2(c)).

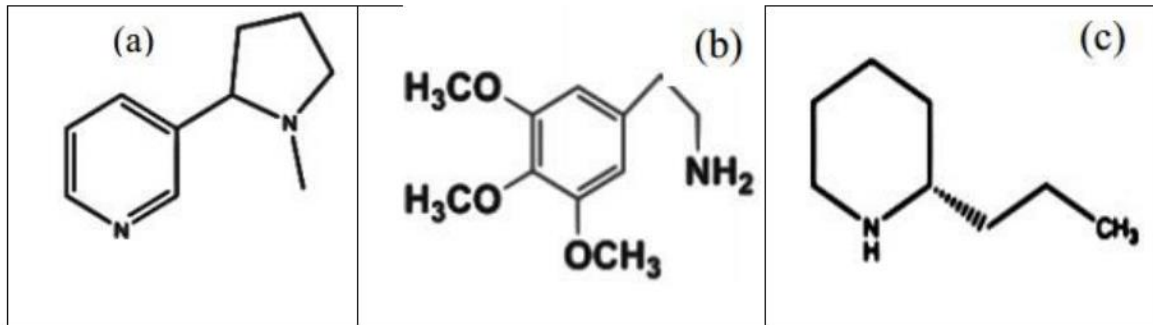


Figure 2 : Structure des différents types d'alcaloïdes ; Nicotine (a) ; Mescaline (b) ; Coniine (c) (Medjeberet al., 2017).

6. Méthodes d'extraction

Il existe trois types généraux d'extraction des alcaloïdes :

- ✓ Extraction par solvant organique apolaire.
- ✓ Extraction par solvant organique polaire.
- ✓ Extraction par l'eau acidifiée.

6.1. Extractions des alcaloïdes par solvant organique polaire

C'est une méthode d'extraction par épuisement caractérisée par l'utilisation d'un extracteur soxhlet :

➤ Facteurs influençant l'extraction

Selon Amor (2008), plusieurs facteurs peuvent influencer les performances et le rendement de l'extraction :

- ✓ Taille des particules ;
- ✓ La nature du solvant ;
- ✓ La température ;
- ✓ Temps d'extraction ;
- ✓ Degré d'agitation.

➤ Procédé d'extractions par l'appareil Soxhlet

Le Soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide (figure3).

- Parmi les avantages du Soxhlet est que l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Cette méthode ne nécessite pas de filtration après extraction. Le Soxhlet est indépendant de la matrice végétale.
- Les inconvénients les plus significatifs de cette méthode, par comparaison avec les autres techniques conventionnelles sont :
 - la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental.
 - Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles (Grigonis et al., 2005).

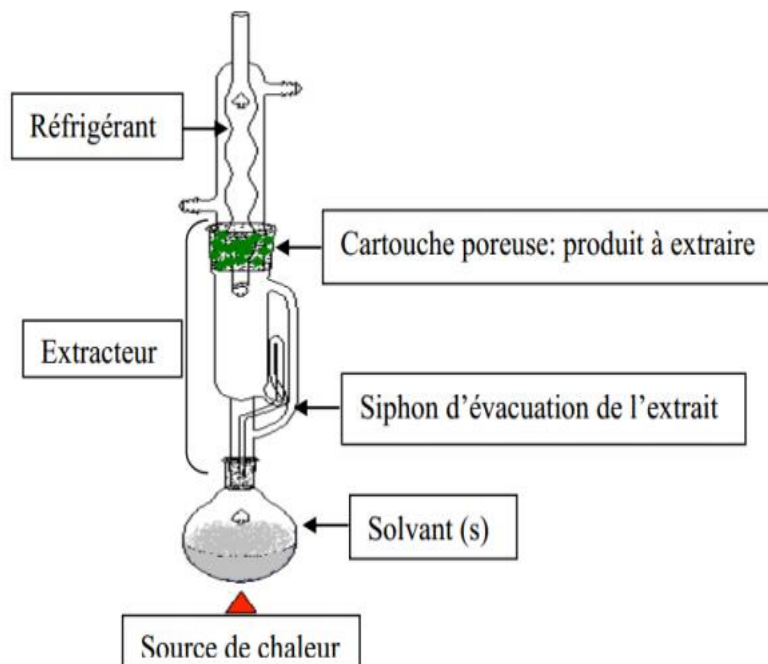


Figure 3 : Appareil d'extraction Soxhlet classique (Hamidi,2013)

6.2. Extraction par l'eau acidifiée

C'est une extraction réalisée à l'aide d'eau acidifiée et d'un acide organique apolaire. La plante pulvérisée subit une macération sous agitation (ou à l'aide d'un bain ultrasons), par l'eau acidifiée (H₂SO₄), suivie d'une filtration (Jaber, 2017).

6.3. Extraction par solvant organique apolaire

Cette technique conventionnelle est réalisée forcément en milieu alcalin, qui peut s'effectuer par une simple macération à froid.

➤ Facteurs influençant sur l'extraction

Elle peut être influencée par plusieurs facteurs tels que:

- ✓ la nature du solvant.
- ✓ le soluté.
- ✓ le pH

7. Détection de la présence alcaloïdes

Il s'agit d'une étape préliminaire pour confirmer la présence de ces molécules dans l'échantillon analysé.

En pratique, deux réactifs sont les plus couramment utilisés :

- Le réactif de Mayer se compose de l'iodure de potassium, chlorure mercurique et l'eau distillée. Ce réactif donne un précipité blanc en présence des alcaloïdes
- Le réactif de Wagner se compose d'Iodure de potassium, Iode et l'eau distillée. Ce réactif donne un précipité brun en présence des alcaloïdes(Jean, 2010).

8. Toxicité des alcaloïdes

Les alcaloïdes font partie des composés les plus toxiques connus de la nature. Ils peuvent avoir des effets néfastes sur le métabolisme des humains, des animaux, des plantes et des insectes (Kar, 2007).

L'empoisonnement aux alcaloïdes peut résulter d'une exposition par les voies respiratoires, cutanée, digestive ou sanguine. (Matsuura et Fett-Neto, 2015).

9. Rôle écologique

Aniszewski (2015) explique que les alcaloïdes sont impliqués dans l'adaptation des organismes à leur milieu de vie, ces substances ne sont pas toxiques lorsqu'elles sont stockées, mais elles deviennent toxiques si la valeur du pH de la cellule change. Les réponses des animaux aux alcaloïdes varient considérablement ; certains les tolèrent, d'autres sont empoisonnés.

Les alcaloïdes agissent comme des poisons ou des répulsifs vis-à-vis les prédateurs, parasites et concurrents. On peut citer à titre exemples :

- ✓ La nicotine et la ryanodine ont des propriétés insecticides.
- ✓ Les alcaloïdes stéroïdiens de la pomme de terre ont un effet répulsif sur les coléoptères

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Notre Travail a été réalisé, entre le mois de février 2024 et le mois d'avril 2024, au sein de laboratoire de recherche « Antibiotiques, antifongiques, physico - chimie, synthèse et activité biologique », département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

Ce travail est basé sur les tests phytochimique, le dosage des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'alcaloïdes et des extraits bruts hydrométhanoliques préparés des graines de *Vitex agnus castus*.

1. Matériel végétal

Notre étude est réalisée sur les graines de *Vitex agnus castus*, elles sont récupérées auprès d'un herboriste et séchées pendant quelques semaines dans un endroit sec, aérée et à l'abri de la lumière. Elles sont, ensuite, broyées et conservée soigneusement dans des flacons en verre(Figure 4).



Figure 04 :Partie aérienne de *Vitex agnus castus* (Photo personnelle).

2. Préparation des extraits

2.1. Extrait brut hydrométhanolique (EB)

Deux extraits bruts hydrométhanolique des graines de *Vitex agnus castus* ont été préparés par une extraction solide/liquide selon deux méthodes :

2.1.1. La macération.

- 10 g de la matière végétale broyée est mis dans un erlenmeyer avec 150 ml du mélange eau/méthanol (80/20 : v/v) ;
- le mélange est agité à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 15 minutes à température ambiante ;

Matériel et méthodes

- Le mélange est laissé macéré à une température ambiante pendant 48 h à l'abri de lumière ;
- Après macération, la filtration est réalisée sur un papier filtre ;
- Le méthanol est évaporé à l'aide d'un Rotavapor à 60°C ;

Après évaporation, 10ml de l'extrait brut est récupéré dans un tube à vis afin de réaliser les tests phytochimiques, le reste est séché dans une étuve à 35°C.

L'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération (EBM) est conservé dans un tube Eppendorf pour des analyses phytochimiques et biologiques.

2.1.2. Décoction (sous reflux)

- 10g de la matière végétale broyée est introduite dans un ballon rodé, avec 150 ml du mélange eau/méthanol (80/20 ; v/v), surmonté d'un réfrigérant ;
- Le mélange est porté à une décoction sous reflux pendant 45 min
- L'extrait obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre
- Le méthanol est évaporé à l'aide d'un Rotavapor à 60°C

Après évaporation, 10ml de l'extrait brut est récupéré dans un tube à vis afin de réaliser les tests phytochimiques, le reste est séché dans une étuve à 35°C.

L'extrait brut hydrométhanolique préparé par Décoction (EBD) est conservé dans un tube Eppendorf pour des analyses phytochimiques et biologiques.

2.2. Extraction des alcaloïdes

❖ Principe

L'extraction est basée sur la différence de solubilités des alcaloïdes en milieu acide et en milieu alcalin d'une part et dans les solvants organiques polaires et non polaires d'autre part.

❖ Extraction en milieu acide

Cette extraction est faite selon la méthode de Harborne, 1998 :

- Macération sous agitation, pendant 24 heures, de 90 g de graines de *Vitex agnus* broyées en présence de 250 ml de HCl 2% et 110 ml d'acétate d'éthyle ;
- Filtration du mélange et récupération du filtrat ;
- Addition du NH₄OH 10% à la phase acide jusqu'à ce que le pH soit ajusté à 10 ;

Matériel et méthodes

- Filtration du mélange et récupération du filtrat ;
- Extraction liquide – liquide du filtrat (4 fois) avec d'acétate d'éthyle jusqu'à épuisement total des alcaloïdes de la phase aqueuse ;
- Elimination des traces d'eau qui peuvent refermer le solvant organique décanté par l'addition de Na₂SO₄ ;
- Filtration ;

Concentration de la phase organique à sec à l'aide d'un Rotavapor à une température inférieure à 40°C afin d'éviter la dénaturation des alcaloïdes.

L'extrait d'alcaloïdes est conservé dans un tube Eppendorf pour des analyses phytochimiques et biologiques.

2.3. Calcul du rendement des extraits

Le rendement d'extraction de chaque extrait préparé est calculé en rapport entre le poids de l'extrait sec et le poids de la plante en poudre utilisée.

Le rendement en pourcentage de la plante en extrait sec a été calculé par la formule :

$$\mathbf{R\ (\%) = Ps / Pp \times 100}$$

- ✓ **R** : rendement de l'extraction en pourcentage ;
- ✓ **Ps** : Poids de l'extrait sec en gramme ;
- ✓ **Pp** : poids de la poudre en gramme.

3. Le criblage phytochimique

Le criblage phytochimique représente l'ensemble des techniques qualitatives permettant la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent de détecter la présence des substances chimiques. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais les principaux sont les composés phénoliques polyphénols totaux (y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins, les coumarines, Les quinones libres, ...), les alcaloïdes, les saponines, les stéroïdes et les composés réducteurs ... etc (**Lendvai et al., 2002**).

Dans notre travail, nous avons effectué des tests phytochimiques sur les extraits des graines de la plante étudiée, basés sur des réactions de coloration, de précipitation et d'observation sous lumière ultra-violette.

Matériel et méthodes

Cette analyse été réalisée selon les techniques décrites par **Bruneton, (1999)** et **Harbone (1998)**.

3.1. Les composés azotés

❖ Les alcaloïdes

Dans deux tubes à essai, introduire 0,5 ml de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl (1%) et ajouter 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube et 0,5ml de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes.

3.2. Les composés phénoliques

❖ Les tanins

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,25 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%). Le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

❖ Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes.

❖ Les quinones libres

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 0,1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH à 1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

❖ Anthraquinones

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à analyser et ajouter 1ml de NH₄OH (10%) puis agiter. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

❖ Les coumarines : Fluorescence UV

Dans deux tubes à essai, introduire 1ml de l'extrait à analyser, prendre le premier comme témoin et ajouter à l'autre 0,1 ml de NH₄OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

3.3. Les composés terpéniques

❖ Les saponines : Test de mousse

Dans un tube à essai, introduire 10 ml de l'extrait à analyser, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur supérieure à 1 cm de mousse persistante indique la présence de saponines.

❖ Terpénoïdes

Test de Slakowski: Dans un tube à essai, introduire 1 ml de l'extrait à analyser, ajouter 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

3.4. Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling (0,5 ml réactif A et 0,5 ml réactif B) à 1 ml d'extrait à analyser et incuber l'ensemble 08 min dans un bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

4. Dosage des composés phénoliques

4.1. Dosage des polyphénols totaux :

❖ Principe

Pour déterminer les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits bruts hydrométhanoliques (EBM et EBD), nous avons suivi la méthode de dosage décrite par **Vermerius et Nicholson (2006)**. Le principe de la méthode repose sur la réaction colorée avec le réactif "Folin-Ciocalteu", qui est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Le réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'absorbance est mesurée à 760 nm.

❖ Mode opératoire

- Mélanger 0,1 ml d'extrait (1 mg/ml) avec 2 ml de solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2%) ;
- Agiter puis incuber pendant 5 minutes ;
- Ajouter 0,1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu 1N ;

Matériel et méthodes

- Incuber le mélange obtenu pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité ;
- Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 760 nm contre un blanc ;

Les essais ont été réalisés en triplet.

❖ **Expression des résultats**

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (50 à 500 µg/ml) (**Figure 05**).

Les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg Eq AG/ mg ES).

4.2. Dosage des flavonoïdes

❖ **Principe**

Pour quantifier les flavonoïdes contenus dans les extraits bruts hydrométhanoliques (EBM et EBD) de la plante étudiée, nous avons réalisé une méthode de dosage colorimétrique selon le protocole décrit par **Zhishen et al., (1999)**. Le principe de cette méthode se repose sur l'oxydation des flavonoïdes en milieu alcalin par le nitrite de sodium (NaNO_2) et le chlorure d'aluminium (AlCl_3) en composant un complexe de couleur rose absorbant à 510 nm.

❖ **Mode opératoire**

- Mélanger 250 µl de chaque extrait (1 mg/ml) avec 1 ml d'eau distillée et 75µl de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15% ;
- Après 6 minutes d'incubation à température ambiante, additionner 75µl du réactif chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10% ;
- Après 6 minutes, ajouter 1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (4%), puis compléter le volume final à 2,5 ml d'eau distillée ;
- Agiter le mélange, puis incuber à l'obscurité pendant 30 minutes ;
- À l'aide d'un spectrophotomètre, Mesurer l'absorbance à 510 nm contre un blanc ;

Dans les mêmes conditions opératoires une gamme d'étalonnage est réalisée avec la catéchine à différentes concentrations de 50 à 500 µg /ml (**Figure 06**).

Les essais sont répétés 3 fois.

Matériel et méthodes

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq C/mg ES}$)

5. Evaluation du pouvoir antioxydant extraits de la plante

Il existe de nombreux tests permettant de mesurer l'efficacité des antioxydants. Pour évaluer l'effet des extraits de la plante étudiée, nous avons utilisé deux méthodes :

5.1. Test du piégeage du radical DPPH

❖ Principe

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydracyl) est généralement le plus couramment utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant en raison de stabilité sous forme de radicaux libres et la facilité d'analyse.

Le DPPH est pratiquement, le radical libre le plus stable, en solution (méthanol ou éthanol). Il se caractérise par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515nm. En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle (forme d'hydrazine). Ce passage à la deuxième forme est suivi d'une diminution de l'absorbance qui peut être exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH, une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydant (Lee et al., 2003).

❖ Mode opératoire

- 50 μl des solutions d'extrait à différentes concentrations (1 à 32 mg/ml) ont été ajoutés à 1950 μl DPPH (2,5 mg fraîchement préparé dans du 100ml méthanol) ;
- Pour chaque concentration, un blanc est préparé contenant 50 μl de chaque concentration d'extrait et 1950 μl du méthanol ;
- Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 μl du méthanol avec 1950 μl de la solution méthanolique de DPPH ;
- La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante ;

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

En parallèle, L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience. Il est testé à différentes concentrations et dans les mêmes conditions expérimentales.

Matériel et méthodes

➤ **Calcul des pourcentages d'inhibition**

$$I (\%) = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{éch}}) / A_{\text{cont}}] \times 100$$

- ✓ I (%) : Pourcentage d'inhibition.
- ✓ A_{cont} : Absorbance du contrôle négatif.
- ✓ $A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon testé

➤ **Calcul des CI_{50}**

Le CI_{50} est définie comme étant la concentration de l'antioxydant (l'extrait ou composé) nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du DPPH

Il est déterminé à partir des équations des courbes de régression logarithmiques de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits étudiés. Il permet de déterminer l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible en CI_{50} .

5.2. Test de pouvoir réducteur de fer (Ferric Reducing Antioxidant Power ; FRAP)

❖ **Principe**

L'activité réductrice des extraits est déterminée à l'aide de réactions redox entre les extraits et les ions des métaux de transition, notamment le fer.

Le ferricyanure de potassium fournit des ions fer (Fe^{3+}), qui sont réduits en ions fer (Fe^{2+}) par les antioxydants présents dans les extraits de plantes.

La méthode est utilisée pour calculer le pouvoir réducteur.

❖ **Mode opératoire**

Le protocole est réalisé selon la technique décrite par **karagözler et al., (2008)** :

- Mélanger 100 μ l de l'extrait à différentes concentrations avec 250 μ l d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 250 μ l d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1%) ;
- Incuber l'ensemble à 50°C pendant 20 minutes dans l'étuve ;
- Laisser le mélange refroidi ;
- Ajouter 250 μ l de l'acide trichloracétique TCA (10%) ;
- Combiner 500 μ l de surnageant avec 500 μ l d'eau distillée et 100 μ l d'une solution aqueuse de chlorure de fer $FeCl_3$ (0,1%) ;

Matériel et méthodes

- Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc, préparé en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée ;

Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, dont l'absorbance chacun a été mesurée dans les mêmes conditions que les extraits dans différentes concentrations (0,01 à 0,4 mg/ml)

❖ Expression des résultats d'EC₅₀

L'EC₅₀ est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait qui donne une réponse demi-maximale.

A partir des équations de régression linéaire des graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits de la plante étudiée (EBD, EBM et alcaloïdes), nous avons calculé l'EC₅₀ qui permet de déterminer l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible.

6. Analyses statistiques

Dans le but d'obtenir des résultats fiables pour les différents échantillons collectés, il est important de tenir compte les analyses statistiques suivantes :

6.1. Moyenne

$$\bar{X} = \frac{(X_1 + X_2 + \dots + X_n)}{(n)} = \frac{1 \sum X_j}{n}$$

6.2. Ecart type

$$S = \sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2 / n - 1]}$$

Résultats et interprétations

Résultats et interprétations

1. Rendements et caractéristiques des extraits obtenus

L'extraction méthanol-eau (80/20, v/v) par décoction (sous reflux), par macération (48 h) et extraction d'alcaloïdes des graines de *Vitex agnus castus* nous a permis de récupérer trois extraits différents : deux extraits bruts eau-méthanol (EBD et EDM), et un extrait des alcaloïdes.

Les caractéristiques et le rendement de chaque extrait obtenu de la plante étudiée sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Rendement et caractéristiques de différents extraits préparés des grains de *Vitex agnus castus*

	EBD	EBM	Extrait d'alcaloïdes
Rendement (%)	6,08	5,07	0,02
Aspect	Caramélisé	Caramélisé	Visqueux
Couleur	Marron foncé	Marron foncé	Marron foncé
Solubilité	Eau distillée	Eau distillée	Méthanol

EBD : Extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération

Les extraits bruts préparés par décoction et macération (EBD et EBM) ont présenté des rendements d'ordre de 6,08% et 5,07%, respectivement. Ils sont récupérés sous forme caramélisé de couleur marron foncé.

Tandis que, l'extrait d'alcaloïdes est récupéré sous forme visqueux de couleur marron foncé, avec un rendement très faible d'ordre de 0,06%.

Le test de solubilité nous a permis de noter que les deux extraits bruts (EBD et EBM) sont solubles dans l'eau distillée. Par contre, l'extrait est peu soluble dans l'eau distillée et très soluble dans le méthanol.

2. Criblage phytochimiques

Les tests qualitatifs phytochimiques effectués sur les différents extraits bruts hydrométhanolique des graines de *Vitex agnus castus* ont permis de détecter l'absence ou la présence de différents métabolites secondaires indiquées dans le **tableau03**.

Résultats et interprétations

Tableau 03 : Résultats de l'examen phytochimique des extraits bruts hydrométhanolique préparés des graines *Vitex agnus castus*.

Métabolites Secondaires	Réactifs	EBD	EBM
Alcaloïdes	Mayer	+	+
Alcaloïdes	Wagner	+	+
Tanins	FeCl ₃	+	+
Flavonoïdes	HCl et Mg ²⁺	+	+
Quinones libres	NaOH	+	+
Anthraquinones	NH ₄ OH	-	-
Saponines	Test de mousse	-	-
Terpénoïdes	Test de Slakowski	+	+
Composés réducteur	Liqueur de Fehling	-	-
Les coumarines	Fluorescence UV	-	-

EBD : Extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; - : Négatif, + : positif.

D'après les résultats obtenus des tests phytochimiques qui ont été effectués sur les extraits préparés de *Vitex agnus*, nous avons noté la présence des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des terpénoïdes, et des quinones libres dans les deux extraits bruts eau-méthanol (EBD et EBM).

Par contre, les essais réalisés sur les composés réducteurs, les anthraquinones, les saponines et les coumarines ont donné des résultats négatifs pour les deux extraits, ce qui indique leurs absences totales

3. Dosage des composés phénoliques

Les dosages des composés phénoliques des extraits bruts eau-méthanol préparés des graines de *Vitex agnus castus* ont été réalisés par des méthodes spectrophotométriques.

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage d'acide gallique ($y=1,288x$, $R^2=0,997$) (**Figure 08**). La teneur a été exprimée en microgrammes équivalent acide gallique ($\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$).

Résultats et interprétations

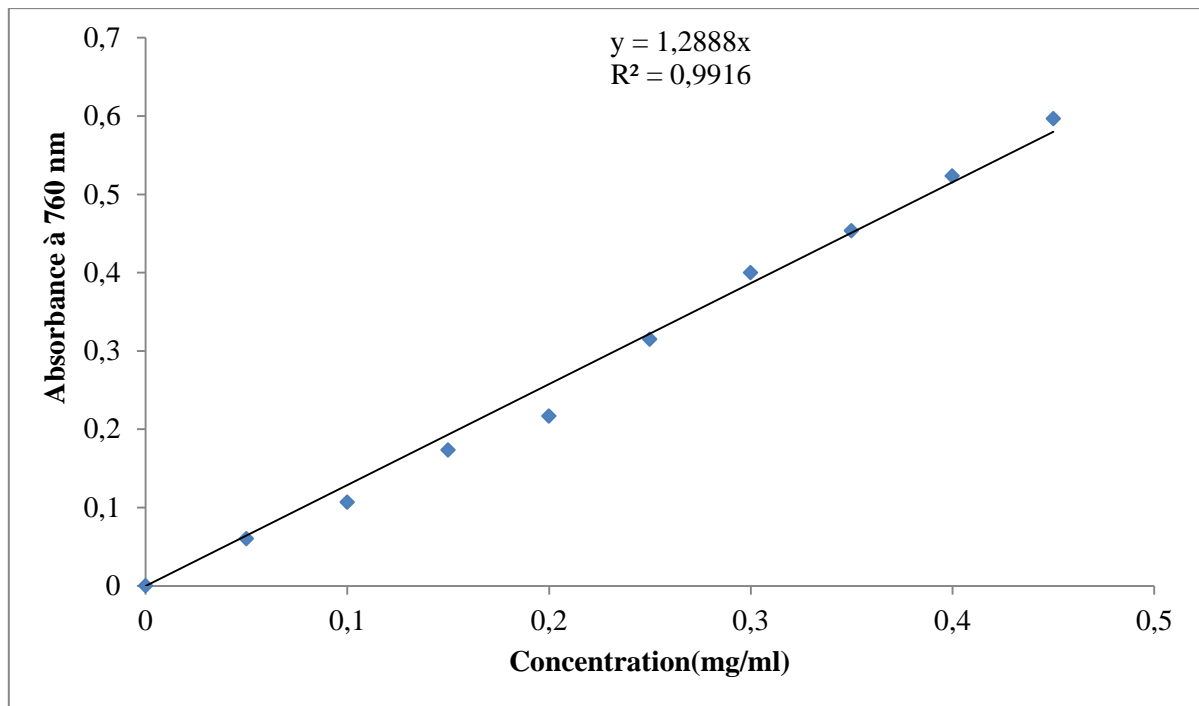


Figure 05: Droite d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

La teneur en flavonoïdes totaux a été estimée par la méthode chlorure d'aluminium (AlCl_3) en milieu alcalin à partir de l'équation de la droite d'étalonnage, en utilisant la catéchine comme standard ($y=2,7205x$, $R^2=0,9977$) (Figure). La teneur a été exprimée en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq C/ mg ES}$).

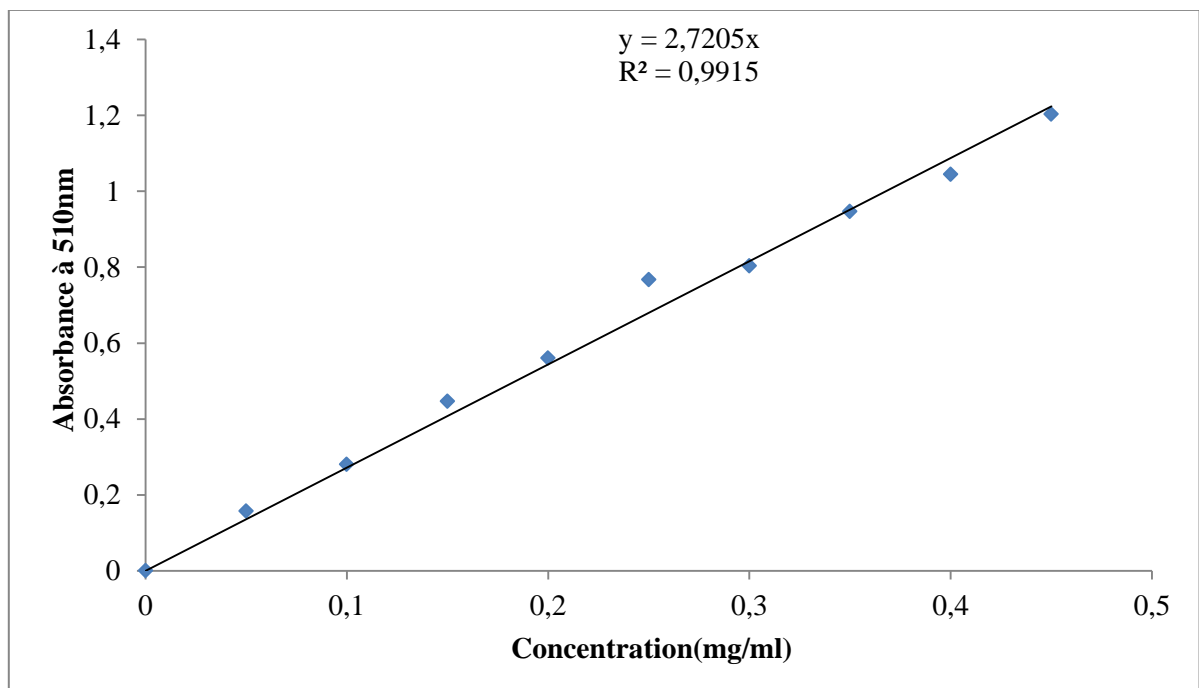


Figure 06: Droite d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Résultats et interprétations

Le **tableau 04** représente en moyenne, les teneurs en composés phénoliques dans les extraits bruts eau-méthanol préparé par décoction ou macération (EBD, EBM).

Tableau 04: Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les différents extraits des graines de *Vitex agnus castus*.

Extraits	Polyphénols totaux ($\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$) \pm Ecart type	Flavonoïdes ($\mu\text{g Eq C/ mg ES}$) \pm Ecart type
EBD	252,79 \pm 0,34	33,08 \pm 0,036
EBM	51,21 \pm 0,012	36,76 \pm 0,017

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que les différents extraits préparés à partir des graines de *Vitex agnus castus* ont renfermé des quantités en composés phénoliques variables.

Nous avons enregistré les teneurs les plus élevées en polyphénols pour l'extrait bruts préparés par décoction (EBD) par rapport à l'extrait préparé par macération (EBM), avec des teneurs de l'ordre de 252,79 $\mu\text{g EAG/mg ES}$ et 51,21 $\mu\text{g EAG/mg ES}$, respectivement.

Par ailleurs, nous avons noté la teneur la plus élevée en flavonoïdes pour l'extrait brut préparé par macération (EBM), avec une teneur de l'ordre de 36,76 $\mu\text{g EC/mg ES}$, suivi par l'extrait brut préparé par décoction (EBD), avec une teneur de l'ordre 33,08 $\mu\text{g EC/mg ES}$.

4. Recherche de l'activité antioxydante

Dans cette partie, nous avons testé l'effet antioxydant des extraits bruts eau-méthanol (EBD et EBM), et extrait d'alcaloïdes, préparés des graines de *Vitex agnus castus* par deux méthodes : méthode de piégeage du radical (DPPH) et la méthode du pouvoir réducteur de fer (FRAP)

4.1. Piégeage du radical (DPPH)

Les résultats de l'activité antioxydant, vis-à-vis le radical libre DPPH, du standard d'acide ascorbique, et des extraits préparés des graines de *Vitex agnus castus* sont exprimés par le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de chaque extrait et représentés dans les figures ci-dessous :

Résultats et interprétations

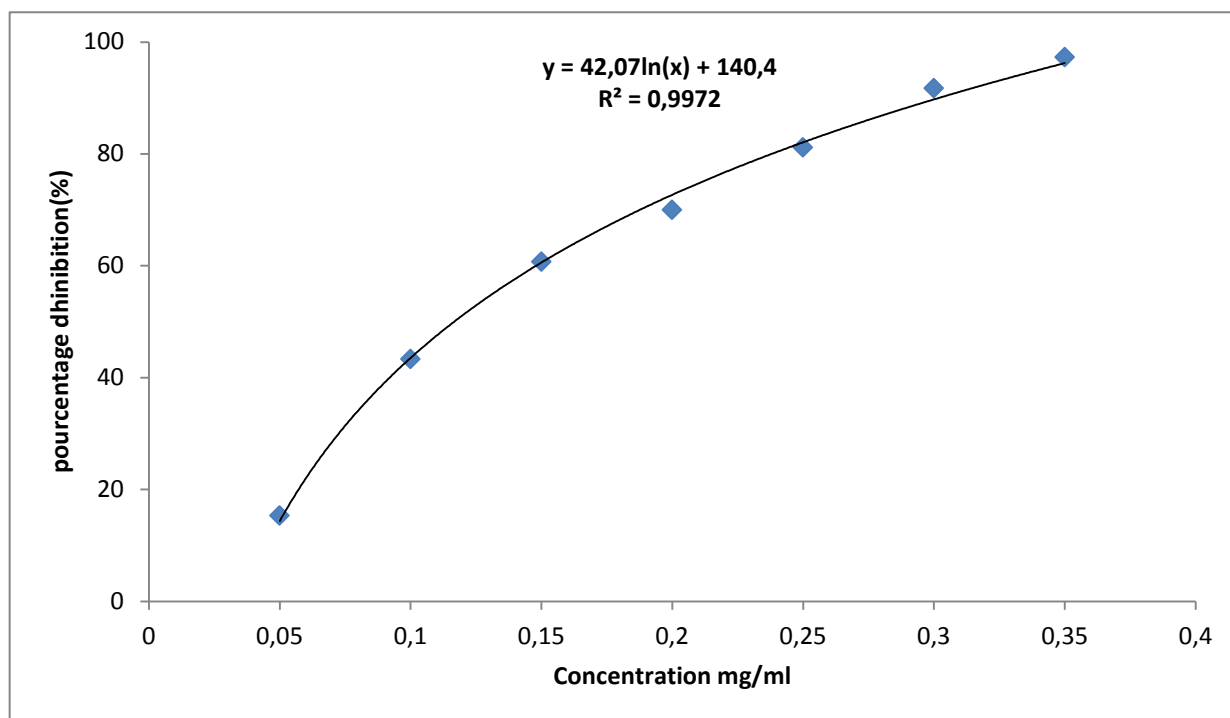


Figure07: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en présence de l'acide ascorbique,

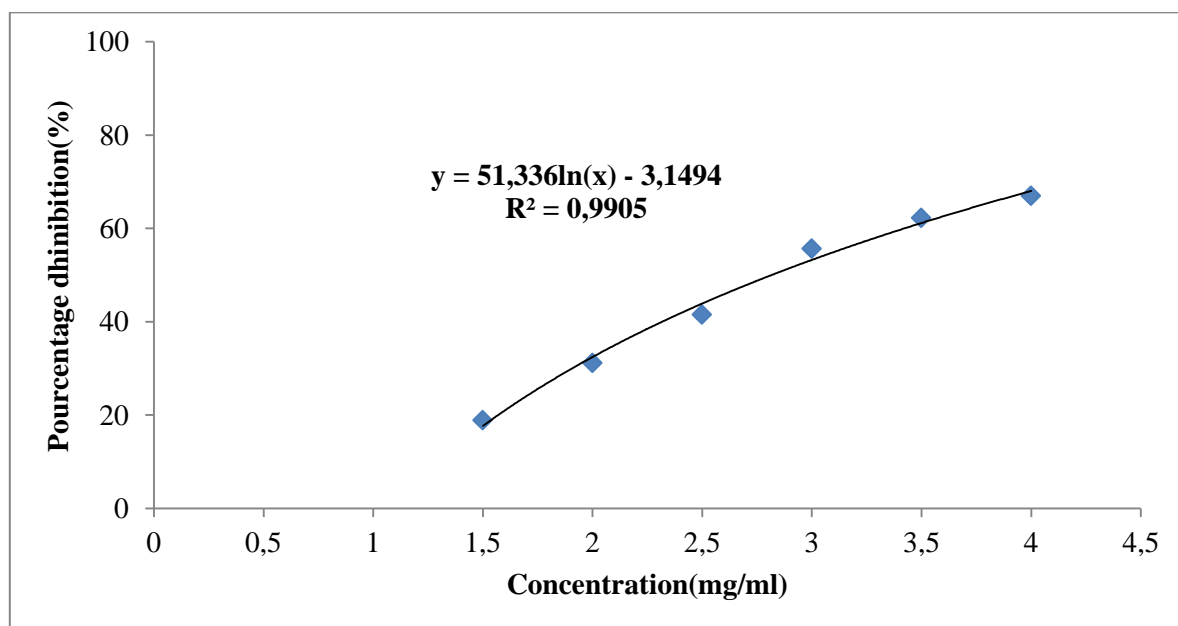


Figure 08: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut préparé par macération (EBM) des graines de *Vitex agnus castus*

Résultats et interprétations

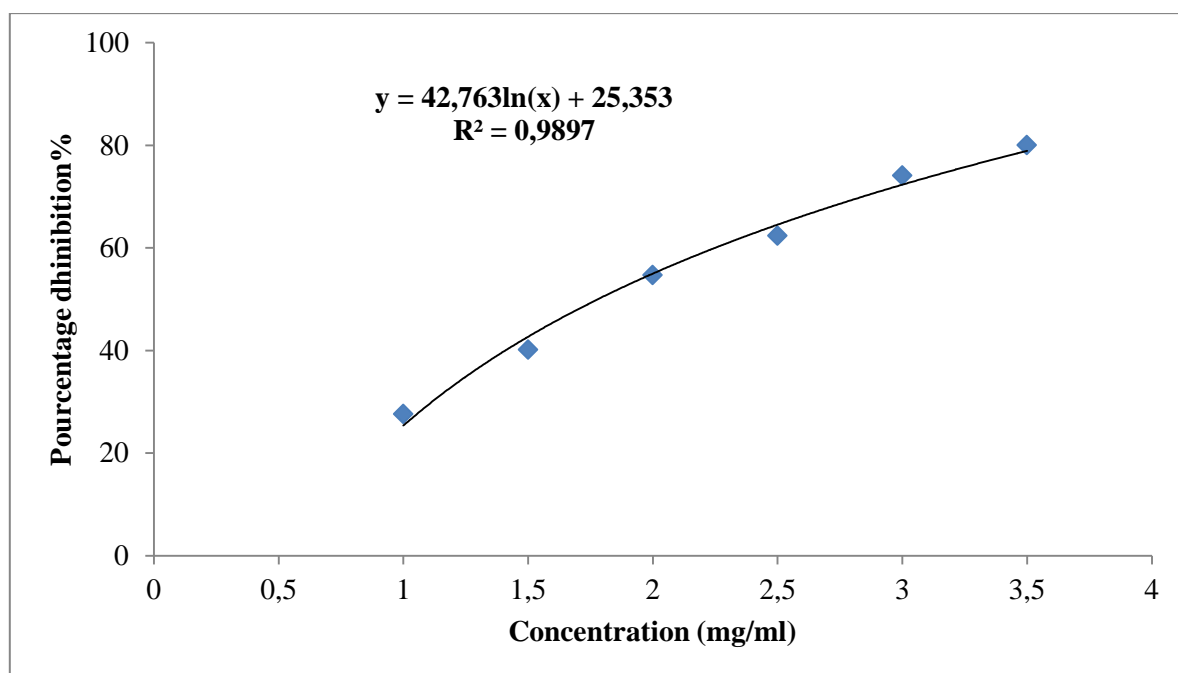


Figure 09: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut préparé par décoction (EBD) des graines de *Vitex agnus castus*

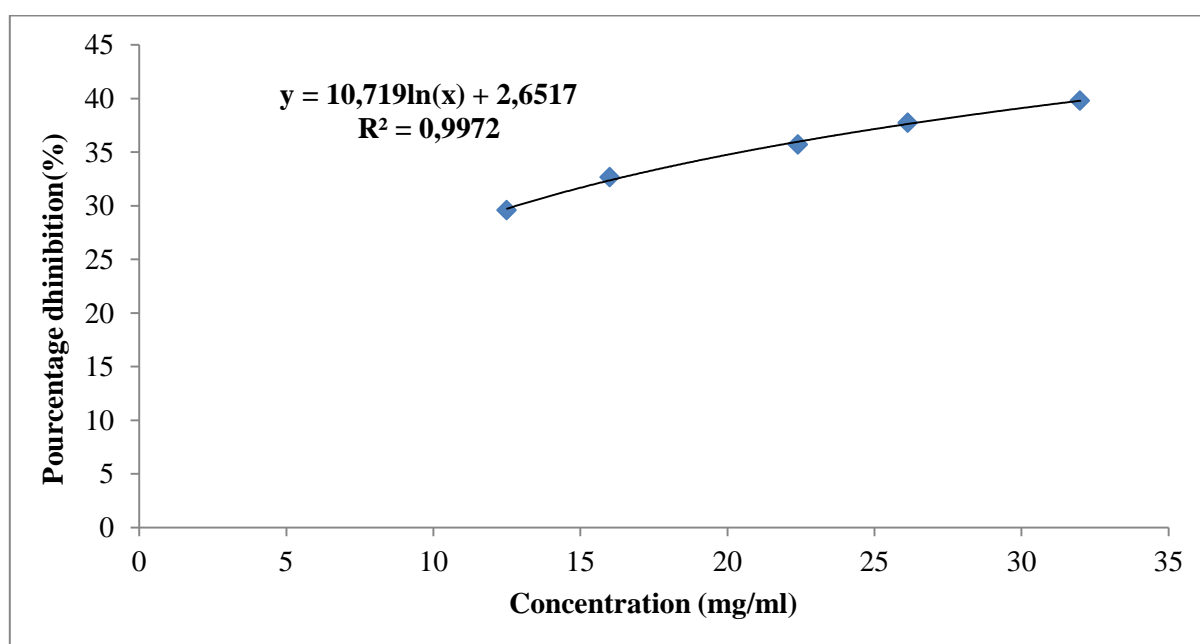


Figure 10: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait d'alcaloïdes des graines de *Vitex agnus castus*.

À partir des équations des courbes de régression logarithmique obtenues, nous avons déterminé les CI_{50} (concentrations qui inhibent 50% du radical libre DPPH) de chaque extrait étudié de *Vitex agnus castus* et de la référence acide ascorbique.

Résultats et interprétations

Le tableau suivant regroupe les différents résultats :

Tableau 05: Les valeurs CI_{50} des différents extraits des graines de *Vitex agnus castus*.

Extrait	CI_{50} (mg/ml)
Acide ascorbique	0,118
EBM	2,81
EBD	1,77
Extrait d'alcaloïdes	N.D

EBD : Extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction ; **EBM** : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération ; N.D : non déterminé.

À partir des résultats regroupés dans le tableau ci-dessus, nous avons révélé que l'extrait brut préparé par décoction a présenté une forte activité antioxydant avec une CI_{50} de l'ordre de 1,77mg/ml, suivis par l'extrait brut préparé par macération avec une CI_{50} de l'ordre de 2,81mg/ml. Par ailleurs, ces deux extraits ont montré un effet antioxydant relativement faible par rapport aux références utilisées : l'acide ascorbique ($CI_{50}=0,118$ mg/ml).

Par contre, l'extrait d'alcaloïdes des graines de *Vitex agnus castusa* enregistré une très faible activité antiradicalaire, vis-à-vis le radical libre DPPH, où le pourcentage d'inhibition n'a pas dépassé 40% à une concentration de 32 mg/ml.

4.2. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Les résultats obtenus du pouvoir réducteur de fer des différents extraits des graines de *Vitex agnus castus* et le standard utilisé sont représentés dans les figures suivantes :

Résultats et interprétations

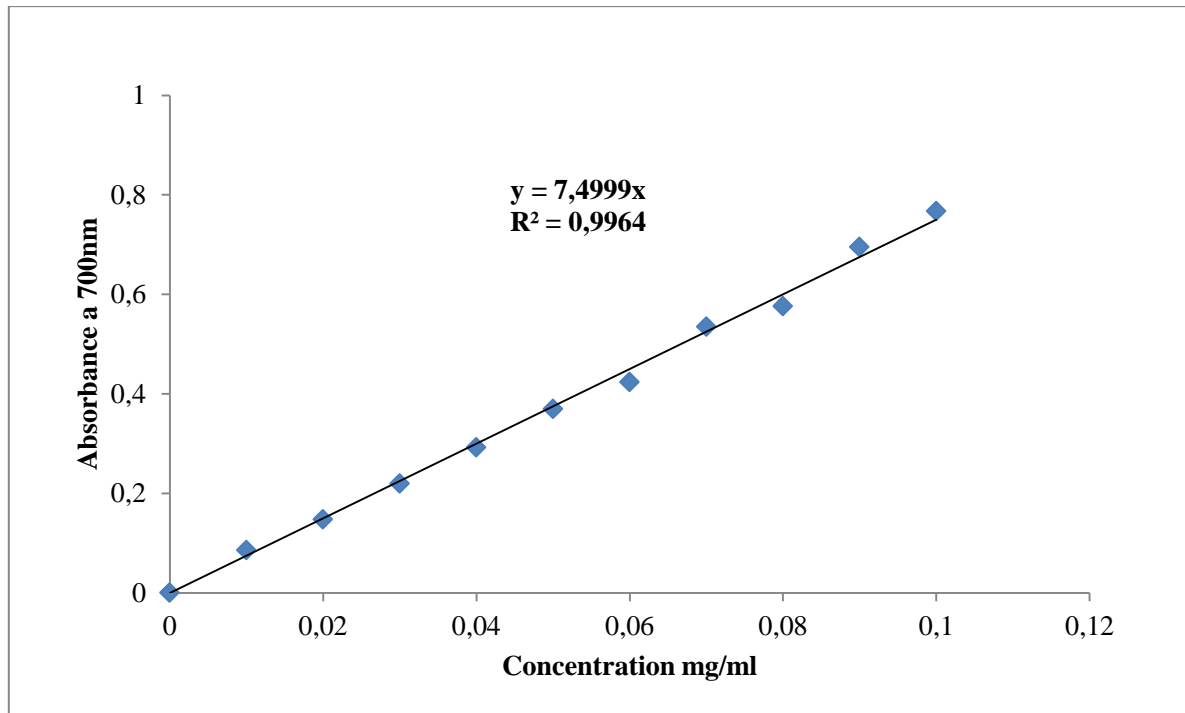


Figure 11: Pouvoir réducteur du fer en présence des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

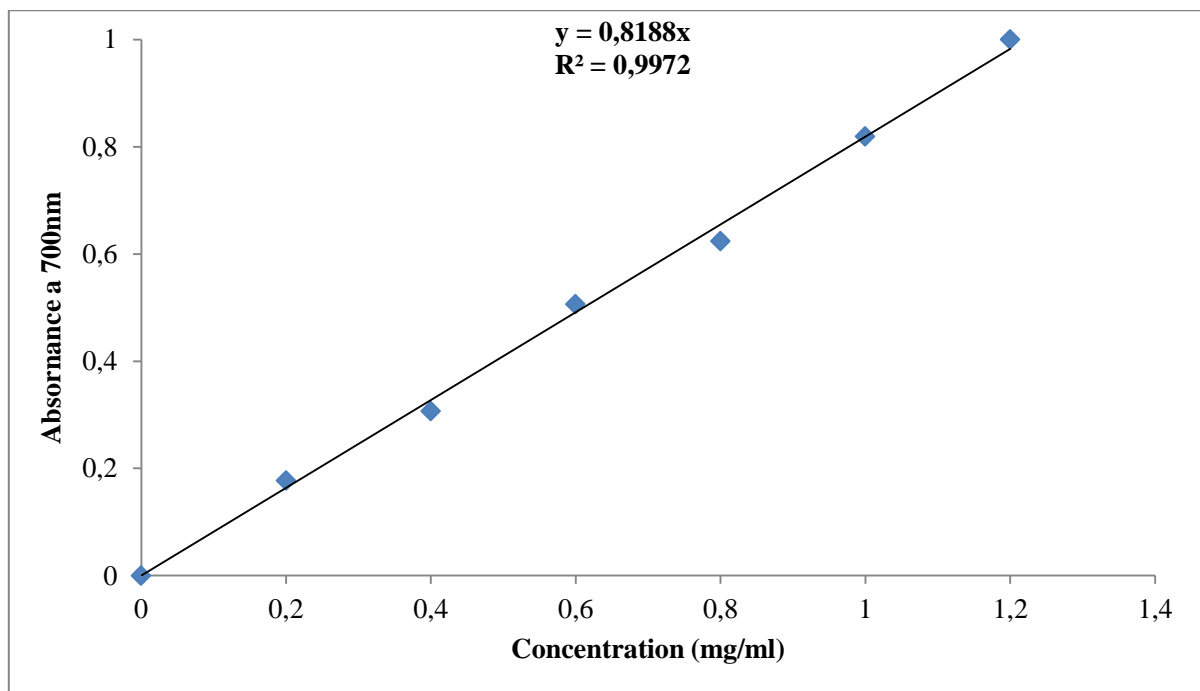


Figure 12: Pouvoir réducteur du fer des différentes concentrations de l'extrait brut préparé par décoction (EBD) des graines de *Vitex agnus castus*.

Résultats et interprétations

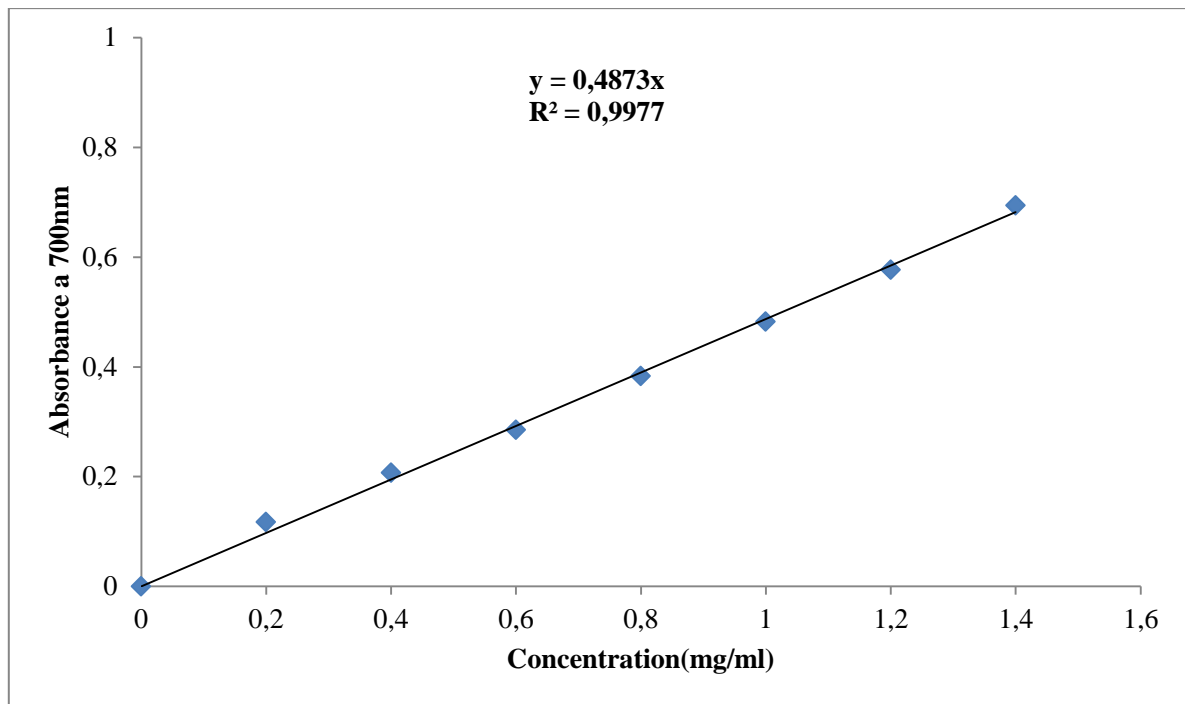


Figure 13: Pouvoir réducteur du fer des différentes concentrations de l'extrait brut préparé par macération (EBM) des graines de *Vitex agnus castus*

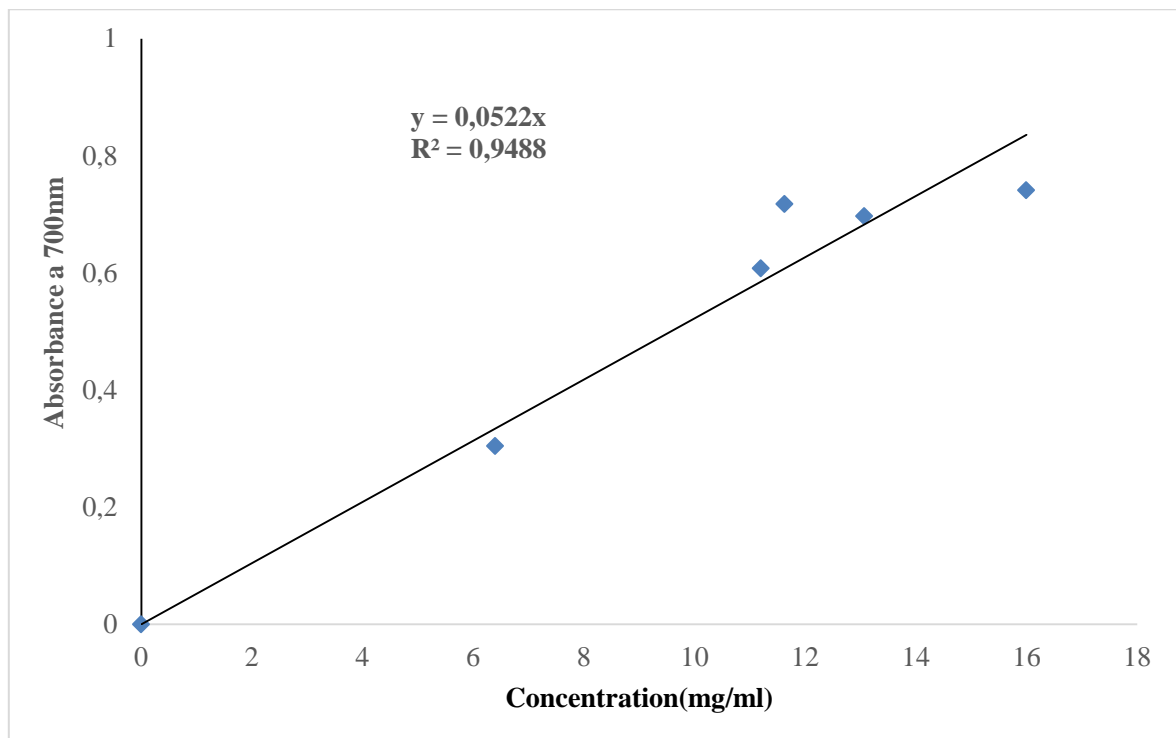


Figure14 : Pouvoir réducteur du fer des différentes concentrations d'extrait d'alcoïdes des graines de *Vitex agnus castus*

A partir des équations de régression linéaire des courbes d'absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits étudiés, nous avons déterminé les EC_{50} (concentration

Résultats et interprétations

efficace de l'extrait qui donne une réponse demi-maximale) de chaque extrait de *Vitex agnuscastus* et du standard acide ascorbique.

Le tableau suivant regroupe les différents résultats :

Tableau 06: Les valeurs EC₅₀ des différents extraits de des graines de *Vitex agnus castus*.

Extrait	EC₅₀ (mg/ml)
Acide ascorbique	0,066
EBD	0,61
EBM	1,02
Extrait d'alcaloïdes	9,57

Selon les résultats enregistrés, nous avons obtenu une meilleure activité antioxydante pour L'extrait préparé par décoction avec un EC₅₀de l'ordre de 0,61mg/ml, suivis par l'extrait de macération avec uneEC₅₀=1,02mg/ml. Par ailleurs, nous avons noté une faible activité antioxydantede l'extrait d'alcaloïdes avec un EC₅₀ de l'ordre de 9,57mg/ml.

Cette activité reste relativement faible par rapport aux standards utilisés comme contrôle positif : acide ascorbique (EC₅₀=0,066mg/ml).

Discussion

Discussion

L'utilisation des plantes médicinales est devenue plus populaire en Algérie en raison de leurs bienfaits pour la santé. Les molécules isolées des plantes sont certainement intéressantes à utiliser comme thérapies alternatives ou comme modèles pour la synthèse de nouvelles substances (Houghton., 2000).

Le terme « antioxydant » inclus toutes les substances biologiquement actives qui protègent les systèmes biologiques contre les processus et réactions potentiellement nocifs qui provoquent une oxydation excessive.

De nombreuses maladies cardiovasculaires, maladies neurodégénératives et autres maladies chroniques peuvent être évitées (Khelifi et Sid, 2021).

D'après les résultats enregistrés, nous avons obtenu deux extraits présentant un aspect caramélisé de couleur marron foncé et un extrait d'un aspect visqueux de la même couleur que les autres extraits.

Le calcul des rendements d'extractions nous a permis d'enregistrer des pourcentages variables d'ordre de 6,08%,5,05%et 0,02% pour les extraits bruts (EBM et EBD) e tl'extrait d'alcaloïdes, respectivement.

Aous et al.,(2013), ont enregistré des rendements d'ordre 13,7% et 12,1% pour les extraits méthanolique et éthanolique préparés par macération des fruits de *Vitex agnuscastus*

Dans une autre étude réalisée par Fatima et al., (2021) les extraits obtenus par Soxhlet ont présenté un rendement de 6,3% pour l'extrait méthanolique , 7,2% pour l'extrait éthanolique, 2,04% pour l'extrait d'acétate d'éthyle et 24% pour l'extrait aqueux.

Les rendements d'extraction sont généralement variables selon le type du solvant utilisé, la température, les conditions de manipulation et la méthode d'extraction.

Les résultats de criblage phytochimique ont souligné la présence des alcaloïdes, des tannins, des flavonoïdes, des saponines, quinones libres et des terpénoïdes, dans les deux extraits bruts eau-méthanol (EBM et EBD), et l'absence des composés réducteurs et des anthraquinones et les coumarines.

Ces résultats, dont la majorité sont en accord avec ceux rapporter dans travaux suivants avec quelques différences qui peuvent être dû au type de solvant utilisé ou même à la localisation géographique :

Soufiane et al.,(2024),ont indiqué la présence des alcaloïdes, les flavones, terpénoïdes Stérols et l'absence des flavonoïdes et les tanins.

Discussion

Khaled Nabih Rashed (2013), ont indiqué la présence des alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes et l'absence des coumarines et les saponines

Le dosage des composés phénoliques, nous a permis de constater que la teneur la plus élevée en polyphénols totaux sont enregistrées pour l'extrait méthanolique préparé par décoction suivi par l'extrait méthanolique préparé par macération avec des valeurs de l'ordre de 252,79 et 51,21 $\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$ respectivement.

Par ailleurs, les teneurs la plus élevées en flavonoïdes a été enregistrées pour l'extrait préparé par macération avec une teneur de 36,76 $\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$ suivis par l'extrait préparé par décoction avec une teneur de 33,08 $\mu\text{g Eq AG/ mg ES}$.

Plusieurs travaux ont souligné la richesse de *Vitex agnus castus* en composés phénoliques, nous citons les travaux suivants :

Fatima et al.,(2021) qui ont enregistré des teneurs en polyphénols totaux dans des extraits préparés avec différents solvants, d'ordre de $62,66 \pm 2,5 \text{ mg EAG/G ES}$ pour l'extrait éthanolique, $50,46 \pm 1,2 \text{ mg EAG/G ES}$ pour l'extrait aqueux, $46,66 \pm 2,6 \text{ mg EAG/G ES}$ pour l'extrait méthanolique et $21,50 \pm 1,8 \text{ mg EAG/G ES}$ pour l'extrait d'acétate d'éthyle. Les mêmes extraits ont noté des teneurs en flavonoïdes totaux qui sont de $58,16 \pm 1,3 \text{ mg EQ/g ES}$ pour l'extrait éthanolique, $31,7 \pm 0,7 \text{ mg EQ/g ES}$ pour l'extrait méthanolique, $16,07 \pm 0,81 \text{ mg EQ/g ES}$ pour l'extrait aqueux et $12,08 \pm 1,1 \text{ mg EQ/g ES}$ pour l'extrait acétate d'éthyle. Cette étude est réalisée sur les fruits de *Vitex agnus castus*, en utilisant le Soxhlet.

Soufiane et al.,(2024) ont enregistré des teneurs en polyphénols totaux dans des extraits préparés avec différents solvants, d'ordre de $126,84 \pm 1,24 \text{ mg EAG/G ES}$ pour l'extrait aqueux, $121,64 \pm 2,10 \text{ mg EAG/G ES}$ pour l'extrait méthanolique et $117,26 \pm 0,18 \text{ mg EAG/G ES}$ pour l'extrait éthanolique. Les mêmes extraits ont noté des teneurs en flavonoïdes totaux de l'ordre de $33,65 \pm 1,04 \text{ mg EQ/g ES}$ pour l'extrait méthanolique, $25,775 \pm 0,84 \text{ mg EQ/g ES}$ pour l'extrait éthanolique et $14,93 \pm 0,14 \text{ mg EQ/g ES}$ pour l'extrait aqueux. Cette étude est réalisée sur les graines de *Vitex agnus castus* extraites par macération.

Esra et al.,(2010) ont enregistré les teneurs totales en flavonoïdes et phénoliques respectivement de l'ordre de $27,45 \pm 1,36 \text{ mg de QE}$ et de $48,05 \pm 1,02 \text{ mg}$. Cette étude est réalisée sur l'extrait méthanolique préparé par macération des feuilles de *Vitex agnus castus*.

Discussion

La différence entre les résultats précédents de dosage peut être expliquée par des différents solvants extracteurs choisis, par les différentes méthodes d'extraction utilisées, la partie de la plante utilisée (les feuilles, les fruits, les racines....) et par le type de standard (quercétine, rutine et acide gallique).

L'extrait préparées par décoction et macération ont présenté l'activité antioxydant (piégeage du radical du DPPH) la plus puissante avec des valeurs des CI_{50} d'ordre de 1,77 mg/ml et 2,81mg/ml, respectivement suivie par l'extrait d'alcaloïdes avec une CI_{50} 82,86 mg/ml. Cette activité reste faible par rapport à celle du standard (l'acide ascorbique) utilisé qui a noté une CI_{50} de 0,11 mg/ml.

Parmi les travaux qui ont recherché l'activité antioxydant (piégeage du radical du DPPH) des extraits préparés de *Vitex agnus castus.*, nous citons :

Fatima et al., (2021), ont montré que l'extrait éthanolique des fruit de *Vitex agnus castus* est le plus actif avec une $CI_{50} = 0,36 \pm 0,07$ mg/ml, par rapport aux autres extraits testés aqueux, méthanolique et acétate d'éthyle, qui ont noté des CI_{50} de l'ordre de $0,52 \pm 0,02$, $0,71 \pm 0,33$ et $2,04 \pm 0,21$ mg/ml, respectivement.

Özlem et Tülay (2013), ont montré une forte activité antioxydant des graines de *Vitex agnus castus* avec des valeurs des CI_{50} d'ordre de $83,47 \pm 0,01$ μ g/ml pour l'extrait méthanolique et $85,33 \pm 0,01$ μ g/ml pour l'extrait aqueux (décoction) et $87,60 \pm 0,05$ μ g/ml pour l'extrait aqueux (infusion).

Soufiane et al., (2024), ont montré que l'extrait aqueux des graines de *Vitex agnus castus* ($CI_{50} = 78,94$ μ g/ml) est plus puissant que extrait méthanolique et extrait éthanolique avec des IC_{50} de $204,16$ μ g/ml et $207,89 \pm 0,67$ μ g/ml respectivement.

L'extrait préparées par décoction et macération ont présenté l'activité antioxydante la plus puissante avec des valeurs des EC_{50} d'ordre de 0,61 mg/ml et 1,02mg/ml, respectivement suivie par les extrait alcaloïdes avec une $CI_{50} = 9,57$ mg/ml. Cette activité reste faible par rapport à celle de l'acide ascorbique a noté une EC_{50} la plus efficace de l'ordre de 0,066mg/ml.

Parmi les études qui ont recherché le pouvoir antioxydant (FRAP) des extraits de *Vitex agnus castus.*, nous citons :

Discussion

Soufiane et al., (2024) qui ont enregistré des EC50 de l'ordre de $203,27 \pm 0,17$; $211,98 \pm 0,74$ et $307,10 \pm 1,15$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux, éthanolique et méthanolique des graines de *Vitex agnus castus* respectivement.

Fatima et al.,(2021) qui ont montré que l'extrait aqueux des fruits de *Vitex agnus castus* est plus actif ($\text{EC}_{50}=3,54 \pm 0,22$) par rapport les extraits éthanolique ($\text{EC}_{50}=3,29 \pm 0,41$), acétate d'éthyle ($\text{EC}_{50}=3,14 \pm 0,21$) et méthanolique ($\text{EC}_{50}=2,98 \pm 0,2$).

À travers les résultats obtenus, nous avons noté que l'activité antioxydante est corrélée relativement avec le taux de composé phénolique dans les différents extraits, l'extrait méthanolique préparé par décoction a présente la teneur la plus élevée en polyphénols et possède le pouvoir antioxydant le plus fort.

Dans notre étude, nous n'avons pas enregistré une activité antioxydante des alcaloïdes extraits des graines *Vitex agnus castus*. Nous avons noté une très faible activité antiradicalaire, vis-à-vis le radical libre DPPH, où le pourcentage d'inhibition n'a pas dépassé 40% à une concentration de 32 mg/ml. Contrairement à la littérature, où il y a des études qui ont confirmé l'activité antioxydante des alcaloïdes, nous citons les travaux de :

Mezour et al.,(2014) qui ont noté que les alcaloïdes de *Berberis vulgaris L.* présentent une activité antioxydante intéressante avec un CI_{50} de l'ordre de 2,80 mg/ml.

Bentabet et al.,(2014), ont montré une meilleure activité antioxydante de l'extrait des alcaloïdes de *Fredolia aretioides* avec un CI_{50} de l'ordre de $0,54 \pm 0,794$.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans le présent travail, nous sommes intéressés sur l'étude des propriétés phytochimiques, le dosage des composés phénoliques des extraits hydrométhanoliques préparés par décoction et macération et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts et d'alcaloïdes préparés des graines de *vitex agnus castus*.

Les tests phytochimiques effectués sur les extraits bruts hydrométhanolique préparé ont révélé la présence d'alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des terpénoïdes, et des quinones libres et l'absence des composés réducteurs, des anthraquinones, des saponines et des coumarines.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes totaux par la méthode de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) a montré que l'extrait brut préparé par décoction est le plus riche en polyphénols totaux avec une teneur de 252,79 μ g Eq AG/ mg ES, et l'extrait brut préparé par macération et le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 36,76 μ g Eq AG/ mg ES.

L'étude de l'activité antioxydante réalisée par le test du piégeage du radical libre DPPH et le test du pouvoir réducteur de fer (FRAP), a montré une meilleure activité antioxydante des extraits bruts hydrométhanoliques, par rapport à celle d'extrait d'alcaloïdes de la même plante. L'extrait hydrométhanolique préparé par décoction a présenté une CI_{50} de 1,77mg/ml et une EC_{50} de 0,61mg/ml. Ces résultats restent faibles par rapport au standard utilisé (acide ascorbique), ($CI_{50} = 0,1178$ mg/ml et $EC_{50} = 0,066$ mg/ml).

Le travail mené dans ce mémoire mérite d'être complété, en proposant les perspectives suivantes :

1. Améliorer le rendement d'extraction et la purification des composés phénoliques par utilisation d'autres solvants organiques ;
2. Séparer, identifier et caractériser les composés phénoliques par des techniques spectrométriques et chromatographiques : RMN, Spectrométrie de masse, HPLC, ...etc et étudier le dosage d'autres métabolites secondaires ;
3. Extraire et identifier les alcaloïdes par d'autres méthodes d'extractions ;
4. Mesurer l'activité antioxydante par différentes méthodes : ORAC (Oxygen Radical Absorbance), TRAP (Total-Radical trapping Antioxidant Parameter assay), CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity), et rechercher d'autres activités biologiques de *Vitex agnus castus* (antimicrobienne, anti-inflammatoire, ...etc) ;
5. Etudier *in vivo* l'effet antioxydant de *Vitex agnus castus*.

Références bibliographiques

A

Arokiyaraj, S., Perinbam, K., Agastian, P., & Kumar, R. M. (2009). Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Vitex agnus-castus*. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 3(2).DOI: <https://doi.org/10.22377/ijgp.v3i2.76>.

Aniszewski, T. (2015). *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications: 2nd Edition* Elsevier. ISBN: 9780444594334;

Al Saka, F., Daghestani, M., & Karabet, F. (2017). Composition and Antioxidant Activity of *Vitex agnus castus* L. and *Rosmarinus Officinalis* L. *Leaves Essential Oils Cultivated in Syria. SM Anal Bioanal Tech*, 2, 1010.

Amor, B. 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). Thèse des Génie des procédés. Université de La Rochelle (France).

Amin G. (1991) *Plantes médicinales populaires d'Iran*. Téhéran : Publications de la recherche iranienne. Institut des Plantes Médicinales ;

B

Benamar, N., & Tansaout, S. (2022). Evaluation de l'effet biocide de l'extrait aqueux, de la poudre et de l'huile essentielle des feuilles du gattilier «*Vitex agnus castus* L.» de la région d'Adrar sur les adultes du petit capucin des grains du blé tendre «*Rhizopertha dominica*.» (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali.

Bara, F. (2020). Caractérisation physicochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait aqueux des noyaux de dattes de la variété «Degla-Baïda» (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.

Boudjellal, K. (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).

Bruneton J., 1999. *Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. Technique et documentation*. Lavoisier 3^{ème} édition.

C

Chaa, S., & Ziane, C. F. Z. (2019). Etude de la phytochimie et des activités antibactériennes et antifongiques de l'huile de quelques plantes médicinales d'Algérie. Master en science biologique option biochimie. Univ Ain T'émouchent.

Cronquist, A., 1981, *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*.

D

Drioua, S., Azalmad, H., El-Guourrami, O., Ameggouz, M., Benkhoulil, F. Z., Assouguem, A., ... & Doukkali, A. (2024). Phytochemical screening and antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. *Open Chemistry*, 22(1), 20230190.

E

El Kamari, F., Ousaaïd, D., Taroq, A., El Atki, Y., Aouam, I., Lyoussi, B., & Abdellaoui, A. (2021). Bioactive ingredients of different extracts of *Vitex agnus-castus* L. Fruits from Morocco and their antioxidant potential. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 14(2), 267-270.

G

Girman A, Lee R, Kligler B. (2003) Une approche de médecine intégrative du syndrome prémenstruel. *Am J Obstet Gynecol* ; 188 : S56-65.

Gidado A et al. (2005). *latifolia* leaves extracts on blood glucose levels of normal and alloxan-induced diabetic rats. *Am J Biol*. 4: 91-3.

H

Halaska, M., Beles, P., Gorkow, C. et Sieder, C. (1999). Traitement de la mastalgie cyclique avec une solution contenant un *Vitex agnus castus* extrait : résultats d'une étude en double aveugle contrôlée par placebo. *Sein*, 8: 175-181.

Hamidi, A. (2013). Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Mémoire de Magister en Chimie Organique. Université Kasdi Merbah . Ouargla. 86 p.

Harborne JB., 1998. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of Plants analysis. Third Edition. pp : 203-214.

J

Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.): Lavoisier

Jaber, A. (2017). Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications. Thèse *Chimie analytique*. Université d'Angers.

K

Karagözler, A. A., Erdag, B., Emek, Y. G., & Uygum, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111: 400-407.

Khalilzadeh E, Vafaei Saiah G, Hasannejad H, Ghaderi A, Ghaderi S, Hamidian G, et al. (2015) Effets antinociceptifs, toxicité aiguë et composition chimique des *Vitex agnus-castus* huile essentielle. *Avicenne J Phytomed* ; 5 : 218-30.

Kaur, C. et Kapoor, HC (2001). Antioxydants dans les fruits et légumes – les la santé du millénaire. *Int. J. Food Sci. Technologie*, 36: 703-725.

Références bibliographiques

Khokra, SL, Prakash, O., Jain, S., Aneja, KR et Dhingra, Y. (2008). Essential Oil Composition and Antibacterial Studies of *Vitex negundo* Linn. Extracts. *Indian J Pharm Sci*, 70(4):522-526 ;

Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. *Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS*.

Kar, A. (2007). Terpenoids. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. New Age International (P) Limited, 215-328.

L

Lendvaib , Zelles T ., ROZSA B , Vizies. 2002. Vinca alkaloid exchanges morphological dynamics of dentric neocortical Layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin*, 59 (4): 257-260.

Li S, Qiu S, Yao P, Sun H, Fong HH, Zhang H ,et al. (2013). Composés issus des fruits de la plante médicinale européenne populaire *Vitex agnus-castus* en chimioprévention via NADP (H) : induction de la quinone oxydoréductase de type 1. *Evid Based Complement Alternat Med* ; 2013 : 432829. DOI: 10.1155/2013/432829.

Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. et Lee C. Y. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem*, 51: 7292-7295.

M

Mancho P, Edwards QT. (2005) Gattilier pour le syndrome prémenstruel. Une thérapie en évolution aux Etats-Unis. *Adv Nurse Pract* ; 13 : 43-4, 46.

Mari A, Montoro P, D'Urso G, Macchia M, Pizza C, (2015) Piacente S, et coll. Profilage métabolique de *Vitex agnus castus* feuilles, fruits et pousses : Analyse par LC/ESI/(QqQ) MS et (HR) LC/ESI/ (Orbitrap)/MS n. *J Pharm Biomed Anal*;102:215-21.

Mari A, Montoro P, Pizza C, Piacente S. (2012) Détermination par spectrométrie de masse tandem par chromatographie liquide de marqueurs chimiques et analyse des composants principaux de *Vitex agnus-castus* L. Fruits (Verbénacées) et compléments alimentaires dérivés. *J Pharm Biomed Anal*;70: 224-30.

Medjeber M., Smail-Saadoun N. Et Saidi F. (2017). Activité antimicrobienne de deux espèces d'aspergillus : mycoendophytes foliaires de *Limoniastrum feei* (girard) batt. D'Oued Aghlal (Bechar, Algérie). *Agrobiologia*, 8(1) : 871-878.

Mezouar, D., Lahfa, F. B., Djaziri, R., & Boucherit-Otmani, Z. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante de *Berberis vulgaris* L. *Phytothérapie*, 12(5), 297-301.

Matsuura, H. N., & Fett-Neto, A. G. (2015). Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. *Plant toxins*, 1-15. DOI: 10.1007/978-94-007-6728-7_2-1.

O

Ono M, Eguchi K, Konoshita M, Furusawa C, Sakamoto J, Yasuda S, et al. (2011) Un nouveau glucoside diterpénoïde et deux nouveaux diterpénoïdes issus du fruit de *Vitex agnus-castus*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) ; 59 : 392-6.

Ono M, Yamasaki T, Konoshita M, Ikeda T, Okawa M, Kinjo J, et al.. (2008) Cinq nouveaux diterpénoïdes, viteagnusines A – E, issus du fruit de *Vitex agnus-castus*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) ; 56:1621-4.

Ochieng, CO et Nanwa, BO (2010). Composition approximative, teneur phénolique et les activités antioxydantes de trois prunes noires (*Vitex* sp.) fruits : résultats préliminaires. *J. Technologie alimentaire.*,8: 118-125.

Ouattara YJ et al. (2002). Activité hépatoprotectrice de plantes de la pharmacopée africaine vis-à-vis d'un hépatopathie expérimentale provoquée chez la souris NMRI *Rev Sci Tech Sci Santé.* 25.

P

Pouvoirs CN, Setzer WN (2015). Une étude d'amarrage moléculaire des imitations phytochimiques des œstrogènes provenant de compléments alimentaires à base de plantes. *Dans Silico Pharmacol*; 3:4.

R

Rani A, Sharma A. (2013) Le genre *Vitex* : Une revue. *Pharmacogn Rev*; 7:188-98.

Roemheld-Hamm B. (2005) *Gattilier*. *Am Fam Physician* ; 72 : 821-4.

Roberts, MF., & Wink, M. (1999). Alkaloids - Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Book Reviews / Phytochemistry*, 52, 1177 – 1180.

Ramanathan, S., Parthasarathy, S., Murugaiyah, V., Magosso, E., Tan, S. C., & Mansor, S. M. (2015). Understanding the physicochemical properties of mitragynine, a principal alkaloid of *Mitragyna speciosa*, for preclinical evaluation. *Molecules*, 20(3), 4915- 4927.

S

Shakir, A. A., & Awad, Z. J. (2013). Phytochemical Study of Flavonoid" Casticin" Present in the Fruits of *Vitex agnus-castus* L. Cultivated in Iraq. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1): 104-109.

Sultan Aslantürk, Ö., & Aşkın Çelik, T. (2013). Antioxidant activity and anticancer effect of *Vitex agnus-castus* L.(Verbenaceae) seed extracts on MCF-7 breast cancer cells. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 66(3), 257-267.

V

Vermerris W, Nicholson R. 2006. Phenolic Compound Biochemistry. Edition Springer

W

Webster DE, He Y, Chen SN, Pauli GF, Farnsworth NR, Wang ZJ, et al.(2011). Mécanismes opioïdériques sous-tendant les actions de *Vitex agnus-castus* L. *Biochem Pharmacol*; 81:170-7.

Références bibliographiques

Webster, DE (2008). Études botaniques, chimiques, génétiques et pharmacologiques de *Vitex agnus-castus*. Pro Quête. Ann Arbor, Michigan.

X

Xu, J., Zhang, Q., Zhao, L., Wang, Y., Xue, L., Han, T., Zheng, C. et Qin, L. (2012). Détermination quantitative et étude pharmacocinétique de la casticine dans le plasma de rat par chromatographie liquide-spectrométrie de masse. *J. Pharm. Bioméde. Anal.*,61: 242-246.