

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU

Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques



Département de Biochimie –Microbiologie

MEMOIRE

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

Diplôme de Master 2

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Thème

Evaluation de quelques effets thérapeutiques des extraits de *Vitex agnus castus* L. de la région d'Adrar. Essai d'incorporation de l'extrait aglyconique des feuilles dans la formulation d'un gel douche

Réalisé par :

DOMRANE Thanina et ADLANI Yasmina

Devant les membres de jury :

M ^{me} Harchaoui-Bournine C	Maitre de conférence B (UMMTO)	Présidente
M ^{me} Mezaour N	Maitre assistante A (UMMTO)	Examinatrice
M ^{me} Mohamed Ouali D	Maitre assistante A (UMMTO)	Promotrice

Année universitaire 2018- 2019

REMERCIEMENTS

Le travail de recherche présenté dans ce mémoire a été réalisé ADLANI YASMINA et DOMRANE THANINA avec Madame MOHAMED OUALI au laboratoire (LRZA), Bab Ezzouar ainsi que le laboratoire de biologie végétale, (ENSA), El Harrach.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promotrice, M^{me} D.MOHAMED OUALI, Maitre Assistante A pour l'aide compétente qu'elle nous a apportée, pour sa patience, sa confiance, son encouragement, et son œil critique qui nous a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité de notre mémoire et d'enrichir nos connaissances, nous la remercions vivement.

Nos vifs remerciements vont à M^{me} C.HARCHAOUI-BOURNINE, Maitre de conférences B au département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques de l'UMMTO, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider ce jury.

Notre reconnaissance va également à M^{me} N.MEZAOUR, Maitre Assistante A au département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques de l'UMMTO, de faire partie du jury.

Nous exprimons notre gratitude à tous le personnel du laboratoire de Microbiologie (CHU de Tizi-Ouzou) à leurs têtes le Docteur SEKLAOUI, et Madame KOULALI (Surveillante médicale) de nous avoir accueilli afin de réaliser la partie microbiologique de notre mémoire.

Nos sincères remerciements à SARL ALWAHA INTERNATIONAL BOUMERDES, ainsi qu'au laboratoire de contrôle de la qualité et de conformité Esafaa AZOUZA pour la réalisation des essais cosmétiques.

Nous adressons nos remerciements au staff du laboratoire d'analyses médicales de BENI DOUALA, à leur tête le Docteur HANED de nous avoir permis d'effectuer l'activité anti-hémolytique.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui de près ou de loin ont apporté leur soutien moral et matériel plus particulièrement.

Dédicaces

Je tiens à remercier Dieu, tout puissant de m'avoir donné la force, le courage et la patience pour achever ce travail.

A mes parents ;

A mes frères;

A ma famille ;

Et a tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour la réussite de ce travail.

Merci

Y.ADLANI

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui m'est chers

A mon très cher père

Ce travail est dédié à mon père, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, a me donner l'aide et a me protéger, que ce travail lui procure santé, bonheur et longue vie

A ma très chère mère

Pour ces sacrifices et son amour infini, a celle qui m'a tout donnée sans rien en retour, qui n'as pas cessé de m'encourager et prier pour moi, puisse dieu le tout puissant te préservé et a t'accordé santé bonheur et longue vie.

A mon très cher mari

Ce travail est dédié a mon mari, qui m'a encourager, ma donner l'aide et soutien tout au long de ce travail, puisse dieu le préservé et lui accordé santé bonheur et longue vie.

A mes très chères sœurs Farida, Lynda

A ma très chère binôme Yasmina

Thanina

Résumé

Le présent travail a pour objectif d'évaluer quelques effets thérapeutiques des extraits de *Vitex agnus castus* L. de la région d'Adrar et également d'essayer d'incorporer l'extrait aglyconique des feuilles dans la formulation d'un gel douche. Le rendement en aglycones flavoniques exprimé en % est trois fois plus important au niveau des feuilles par rapport aux racines. L'activité anti microbienne des extraits (aqueux, anthocyaniques et aglyconiques) des feuilles et des racines de *vitex agnus castus* L a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Des deux souches bactériennes traitées aux différents extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles et racines de *vitex agnus castus* L, seule *staphylococcus aureus*, s'est montrée sensible a l'extrait anthocyanique des feuilles et de l'autre moyennement sensible à l'extrait anthocyanique des racines. Cependant, cette réaction des extraits testés sur *staphylococcus aureus*, est de loin dépassé par rapport a l'effet marqué par la vancomycine. À la concentration 40 mg/ml, les extrais aglyconiques des feuilles ont montré une légère zone d'inhibition chez les deux bactéries *S.aureus* et *E.coli* alors que à la concentration 20 mg / ml, nous observons une infime zone d'inhibition pour les mêmes souches bactériennes. Pour ce qui est de la souche fongique, *Aspergillus Niger*, s'est montrée résistante vis-à-vis de tous les extraits des feuilles et racines de *vitex agnus castus* L. L'activité anti-hémolytique des extraits obtenus à partir des feuilles de *vitex agnus castus* L a été évaluée par la méthode spectrophotométrique. L'extrait flavonique des feuilles de *Vitex agnus castus* L.a induit une hémolyse, celle-ci est proportionnelle à la concentration en aglycones flavoniques utilisée au cours du test. Les pourcentages d'hémolyse des extraits des feuilles sont jugées pas loin comparés au pourcentage d'hémolyse du témoin négatif. Les résultats d'analyse microbiologique du gel douche formulé avec les différents extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus* L comme conservateur naturel ainsi que ceux du gel douche avec conservateur synthétique sont conformes à la norme, qui est de l'ordre de 1000g/ml. Les résultats d'analyse physicochimique du gel douche avec les extraits des feuilles de *Vitex agnus castus* L. comme conservateur naturel ainsi que ceux du gel douche avec le conservateur synthétique ont révélé des valeurs du pH conforme à la norme fixée par le laboratoire (6.80-7.76). De même, les paramètres organoleptiques sont jugés identiques, avec une couleur jaune translucide, une odeur caractéristique et un aspect homogène malgré la variation de température.

Mots clés : *Vitex agnus castus* L, Adrar, activité antimicrobienne, activité anti hémolytique, produit cosmétique, composés phénoliques.

Abstract

The present work aims to evaluate some therapeutic effects of extracts of *Vitex agnus castus* L. from the region of Adrar and also to try to incorporate the aglyconic extract of the leaves in the formulation of a shower gel. The yield of flavonal aglycones expressed in% is three times greater at the leaf level than the roots. The antimicrobial activity of extracts (aqueous, anthocyanin, and aglyconic) of leaves and roots of *vitex agnus castus* L was evaluated by the disk diffusion method. Of the two bacterial strains treated with different aqueous extracts, anthocyanin and aglyconic leaves and roots of *vitex agnus castus* L, only staphylococcus aureus, was sensitive to the anthocyanin extract of the leaves and the other moderately sensitive to the extract anthocyanin of the roots. However, this reaction of the extracts tested on Staphylococcus aureus is far exceeded compared to the effect marked by vancomycin. At the 40 mg / ml concentration, the aglyconic extracts of the leaves showed a slight zone of inhibition in both S.aureus and E. coli bacteria while at the concentration of 20 mg / ml, we observed a minute zone of inhibition. for the same bacterial strains. The fungal strain, Aspergillus Niger, was resistant to all extracts of the leaves and roots of *vitex agnus castus* L. The anti-haemolytic activity of the extracts obtained from the leaves of *vitex agnus castus* L was evaluated by the spectrophotometric method. The flavonic extract of the leaves of *Vitex agnus castus* L.a induces hemolysis, which is proportional to the concentration of flavonic aglycones used during the test. The percentages of hemolysis of leaf extracts are not far off compared to the percentage of hemolysis of the negative control. The results of microbiological analysis of the shower gel formulated with the various aqueous, anthocyaninic and aglyconic extracts of *vitex agnus castus* L leaves as a natural preservative as well as those of the shower gel with synthetic preservative comply with the standard, which is of the order of 1000g / ml. The results of physicochemical analysis of the shower gel with extracts of the leaves of *Vitex agnus castus* as a natural preservative as well as those of the shower gel with the synthetic preservative revealed pH values in accordance with the standard set by the laboratory (6.80- 7.76). In the same way, the organoleptic parameters are judged identical, with a translucent yellow color, a characteristic odor and a homogeneous aspect despite the variation of temperature.

Key words: *Vitex agnus castus* L, Adrar, antimicrobial activity, anti-haemolytic activity, cosmetic product, phenolic compounds.

يهدف هذا العمل إلى تقييم بعض التأثيرات العلاجية لمستخلصات *Vitex agnus castus L* من منطقة أدرار وأيضاً محاولة دمج المستخلص اللاإرادي للأوراق في صياغة جل الاستحمام. إنتاجية أغليكونات الفلافون المعبر عنها بالمئة٪ أكبر ثلاثة مرات على مستوى الأوراق من الجذور. تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات من المستخلصات (المائية ، الأنتوسيانين ، الجلاكونيك) لأوراق وجذور *Vitex agnus castus L* بواسطة طريقة نشر القرص. من السلالتين البكتيريتين اللتين عولجت بمقتطفات مائية مختلفة ، الأنتوسيانين وأوراق الجلاكونيك وجذور *Vitex agnus castus L* ، المكورات العنقودية الذهبية فقط ، كانت حساسة لمستخلص الأنتوسيانين للأوراق والأخرى الحساسة بدرجة معتدلة للمستخلص الأنتوسيانين من الجذور. ومع ذلك ، فإن رد فعل المقتطفات التي تم اختبارها على المكورات العنقودية الذهبية تم تجاوزه بكثير مقارنة بالتأثير الذي تميزه فانكوميسين. بتركيز 40 ميلي غرام لكل ميلي لتر ، أظهرت المستخلصات اللاهوائية للأوراق منطقة طفيفة للتنشيط في كل من بكتريا *S.aureus* و *E. coli* بينما عند تركيز 20 ميلي غرام لكل ميلي لتر ، لاحظنا وجود منطقة دقيقة من التنشيط. لنفس السلالات البكتيرية. كانت السلالة الفطرية ، *Aspergillus Niger* ، مقاومة لجميع مقتطفات من أوراق وجذور *Vitex agnus castus L*. النشاط المضاد للتخثر في المقتطفات التي تم الحصول عليها من أوراق *Vitex agnus castus L* تم تقييمها بواسطة الطريقة الطيفية. المستخلص الفلافوني لأوراق *Vitex agnus castus L* يحفز انحلال الدم ، والذي يتناسب مع تركيز *aglycones flavonic* المستخدمة خلال الاختبار. النسب المئوية لانحلال الدم من مقتطفات الأوراق ليست بعيدة مقارنة مع نسبة انحلال الدم من السيطرة السلبية. نتائج التحليل الميكروبيولوجي لجل الإستحمام المصنوع من مختلف المقتطفات المائية ، والأنتوسيانينية ، الجلاكونيك من *Vitex agnus castus L* ، كمادة حافظة طبيعية ، وكذلك تلك الخاصة بهلام الاستحمام مع مادة حافظة اصطناعية تمتثل للمعايير ، والتي هي من الترتيب من 1000 مكروب /مل. نتائج التحليل الفيزيائي الكيميائي لهلام الاستحمام مع مقتطفات من أوراق *Vitex agnus castus L* كمادة حافظة طبيعية وكذلك لنتائج هلام الاستحمام مع المواد الحافظة الاصطناعية كشفت قيم درجة الحموضة وفقاً للمعيار الذي وضعه المختبر (6.80-7.76). وبالمثل ، تعتبر المآشرات الحسية متطابقة ، ذات لون أصفر شفاف ، ورائحة مميزة ومظهر متجانس على الرغم من اختلاف درجة الحرارة.

الكلمات المفتاحية *Vitex agnus castus L* ،: Adrar ، نشاط مضاد للميكروبات ، نشاط مضاد للتحلل ، منتج تجميلي ، مركبات فينولية.

Listes des figures

Figure 1 : Aspect morphologique de <i>vitex agnus castus L</i>	3
Figure 2 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols	6
Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes	8
Figure 4 : Biosynthèses des flavonoïdes	9
Figure 5 : Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes	10
Figure 6 : Localisation de la zone de l'échantillonnage	15
Figure 7 : Méthode d'extraction des anthocyanes et des aglycones flavonoïques des feuilles et racines de <i>vitex agnus castus L</i>	17
Figure 8 : Rendement en aglycones flavoniques des feuilles et racines de <i>vitex agnus castus L</i> exprimées en %	23
Figure 9 : Zones d'inhibition de la croissance microbienne des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles et racines de <i>vitex agnus castus L</i>	26
Figure 10 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par traitements avec les différents extraits aglyconiques des feuilles de <i>vitex agnus castus L</i>	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	15
Tableau 2 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de la croissance microbienne des extraits aqueux flavonoïques et anthocyaniques des feuilles et racines de la plante <i>vitex agnus castus L</i>	25
Tableau 3 Résultats du pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par traitements avec les différents extraits aglyconiques des feuilles de <i>vitex agnus castus L</i>	29
Tableau 4 : Résultats d'analyse microbiologique du gel douche formulé avec les extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de <i>vitex agnus castus L</i> comme conservateur naturel	31
Tableau 5 : Résultats d'analyse microbiologique du gel douche formulé avec le conservateur synthétique	32
Tableau 6 : Résultats d'analyse physicochimique du gel douche formulé avec les extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de <i>vitex agnus castus L</i> comme conservateur naturel	33
Tableau 7 : Résultats d'analyse physicochimique du gel douche avec le conservateur synthétique	34

Sommaire

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

Chapitre : Synthèse bibliographique

1. Description botanique de <i>vitex agnus castus</i> L	3
1.1. Les noms vernaculaires de <i>vitex agnus castus</i> L.....	4
1.2. Classification botanique de <i>vitex agnus castus</i> L.....	4
1.3. Répartition géographique	4
1.4. Les constituants chimiques de <i>vitex agnus castus</i> L.....	5
1.5. Propriétés de <i>vitex agnus castus</i> L.....	5
1.6. Utilisation traditionnelle.....	5
2. Métabolites secondaires	5
2.1. Les polyphénols.....	6
2.2. Biosynthèse des polyphénols	6
2.3. Classification des polyphénols	7
2.4. Rôles des polyphénols.....	7
2.4.1. Les flavonoïdes	7
2.4.1.1. Définition	7
2.4.1.2. La biosynthèse des flavonoïdes	8
2.4.1.3. Classification des flavonoïdes	10
2.4.1.4. Rôle des flavonoïdes	10
3. Les activités biologiques	11
3.1. Activité antimicrobienne	11

Sommaire

3.2. Activités anti- hémolytique	11
3.3. Utilisation cosmétologique.....	12
3.3.1. Définition d'un produit cosmétique	12
3.3.2. Evaluation de la qualité du produit cosmétique	12
3.3.2.1. Contrôle physico-chimique	12
3.3.2.2. Contrôle microbiologique	13

Chapitre : Matériel et méthodes

1. Matériel	14
1.1. Matériel végétal.....	14
1.2. Les souches microbiennes	15
1.3. Principe de l'activité anti-hémolytique	16
1.4. Produit cosmétique.....	16
2. Méthode.....	16
2.1. Préparation de l'extrait aqueux	16
2.2. Extraction des flavonoïdes	16
2.2.1. Extraction des aglycones flavoniques et anthocyanes.....	16
2.3. Les activités biologiques	18
2.3.1. Activité antimicrobienne	19
2.3.2. Activité anti-hémolytique des extraits de feuilles <i>de vitex agnus castus L.</i>	20
2.3.3. Utilisation des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques dans une formulation cosmétique	21
2.3.3.1. Contrôle physico-chimique du gel douche.....	21

Sommaire

2.3.3.2. Contrôle microbiologique du gel douche	22
2.3.3.3. Contrôle organoleptique du gel douche.....	22

Chapitre : Résultats et discussion

1. Résultats du rendement en aglycones flavoniques	23
2. Activité antimicrobienne	24
3. Activité anti-hémolytique des extraits aglyconiques des feuilles de <i>vitex agnus castus L</i>	29
4. Utilisation des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques comme conservateur dans une formulation d'un gel douche.	31
4.1. Analyse microbiologique	31
4.2. Analyse physico-chimique	33
Conclusion.....	35

Références bibliographiques.

Annexes.

Introduction

Les plantes aromatiques médicinales représentent un intérêt économique considérable par leur utilisation aux industries de la parfumerie, des cosmétiques, de l'agro-alimentaire et de la pharmacie (Bruneton, 2009). En effet, le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux (BABA-AISSA, 2000). Parmi ces composés, figurent les flavonoïdes, les alcaloïdes les terpènes, les coumarines, les acides phénoliques et les tanins (Bahorun et *al.*, 1996).

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

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

L'Algérie, compte parmi les pays du bassin méditerranéen les plus riches en ressources phytogénétiques à intérêt aromatique et médicinal et ce, de part sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de variations climatiques auxquels s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des plantes aromatique et médicinales (Belouad, 2001).

Le Sahara Algérien dispose d'une biodiversité floristique exceptionnelle, constituée d'environ 500 espèces végétales (Ozanda, 1991). Ce sont en effet des réservoirs de substances naturelles à intérêt majeur pour les oasiens.

Cette étude s'inscrit dans la thématique de l'axe de recherche sur la biodiversité floristique algérienne et plus particulièrement des plantes aromatiques et médicinales au niveau du Laboratoire sur les Zones Arides de Bab Ezzouar. Notre travail, consiste en une contribution à l'étude des activités biologiques de *Vitex.agnus castus* L, espèce introduite dans les zones

arides du Sahara Algérien et plus particulièrement dans la région d'Adrar pour un développement rural durable en Algérie. Elle est connue des autochtones pour son apport nutritionnel et médicinaux et, qui résiste bien à la sécheresse. Ce travail est en effet une première ébauche pour présenter l'essence végétale en essayant de la valoriser sur le plan thérapeutique. Cette étude comporte deux parties :

La première partie porte sur une synthèse bibliographique, consacrée d'un côté à la présentation de *Vitex agnus castus* L. et la seconde partie sur le métabolisme secondaire ainsi que les activités biologiques.

La troisième partie concerne la partie expérimentale, qui comporte deux chapitres, l'un sur le matériel et les méthodes utilisées et l'autre, regroupera l'ensemble des résultats qui seront suivis d'une discussion. Enfin nous terminons par une conclusion et certaines perspectives en vue des travaux ultérieurs.

1. Description botanique de *Vitex agnus – castus L*

Vitex agnus castus L , ou gattillier est une espèce d'arbuste appartenant à la famille des *verbenaceæ* selon la classification classique, et à celle des *lamiaceæ* selon la classification phylogénétique (fig.1a)

Le système racinaire est pivotant, la tige est ligneuse ramifiée. Les feuilles sont composées palmées (fig.1b). Les folioles sont vertes, linéaires, lancéolées, dentées (Quezel et Santa, 1963). Il fleurit en août et septembre. Ses fleurs sont petites, de couleur bleue violacée, regroupées en une inflorescence de type épi (fig.1c). Il donne des baies qui ressemblent à des graines de poivre, dures, d'un pourpre à la peau noire, jaunâtres à l'intérieur, à moitié couvert par leur calices verts et contenant quatre graines (fig.1d). (Aissaoui, 2010).



Figure1. (1a) : Aspect morphologique de *Vitex agnus castus L* ; (1b) : feuilles ; (1c) : fleurs ; (1d) : fruits (www.google.com)

1.1. Les noms vernaculaires de *Vitex agnus castus* L.

Vitex agnus castus L. possède plusieurs noms communs notamment : « Kef Meriem ». Gattilier, agneau chaste, petit poivre, poivre sauvage, herbe aux poivre, arbre de poivre agnolyt, Berry chaste, baie de l'arbre chaste, chastétree, chanvre arbre, le poivre de moine (Grieve, 1982) et Khrouaâ (autochtones des la région d'Adrar)

1.2. Classification botanique de *Vitex agnus castus* L.

CRONQUIST (1981) a établi la classification suivante :

Règne : Plantae

Sous - règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Verbenaceae

Genre : *Vitex*

Espèce : *Vitex agnus castus* L

Et selon **APG III (2009)**, *vitex agnus castus* L appartient à :

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

1.3. Répartition géographique

Le gattilier est cultivé partout dans le monde, y compris la partie sud des Etats -Unis. Il a été introduit en Europe occidentale dans les jardins médiévaux, et s'est ensuite répandu dans toute la région du bassin méditerranéen où il pousse aujourd'hui spontanément. *Vitex agnus castus* L se rencontre au nord de l'Afrique (Allais, 2008). En Algérie, cette espèce trouve

un ultime refuge dans les zones arides du Sahara (Aissaoui, 2010) et, dans les terrains humides au bord des cours d'eau à faible altitude (Allais, 2008).

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

Le gattilier contient des alcaloïdes, des glucosides iridoïdes, huiles essentielle. Plusieurs études ont montrés la présence d'autres constituants dans l'espèce *Vitex agnus-castus* parmi lesquels : Les acides gras ; Les acides aminés ; et des traces d'hormones progestérone et hydroxyprogestérone dans les feuilles et les fleurs. Ses fruits, pour leur part, contiennent de la casticine et de l'iridoïde, des huiles grasses et des huiles essentielles, mais surtout des flavonoïdes. (Du Mee, 1993).

1.5. Propriétés de *Vitex agnus castus L*

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

1.6. Utilisation traditionnelle de *vitex agnus castus L*.

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

2. Métabolites secondaires

Chez les plantes, il existe un métabolisme secondaire, c'est une exclusivité du monde végétal. Ces composés du métabolisme secondaire sont à structure chimique souvent complexe, très

dispersée et très différente selon les espèces (Cuendet, 1999). Parmi ces métabolites : les polyphénols et les alcaloïdes.

2.1. Les polyphenols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux. (Gee et Johnson, 2001). Ils forment une immense famille de plus de 8000. Ils sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes (Dacosta, 2003).

2.2. Biosynthèse des polyphénols

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

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

À partir de glucide, cette voie conduit à la formation du précurseur (fig.2) des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques

- **La voie de l'acétate**

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

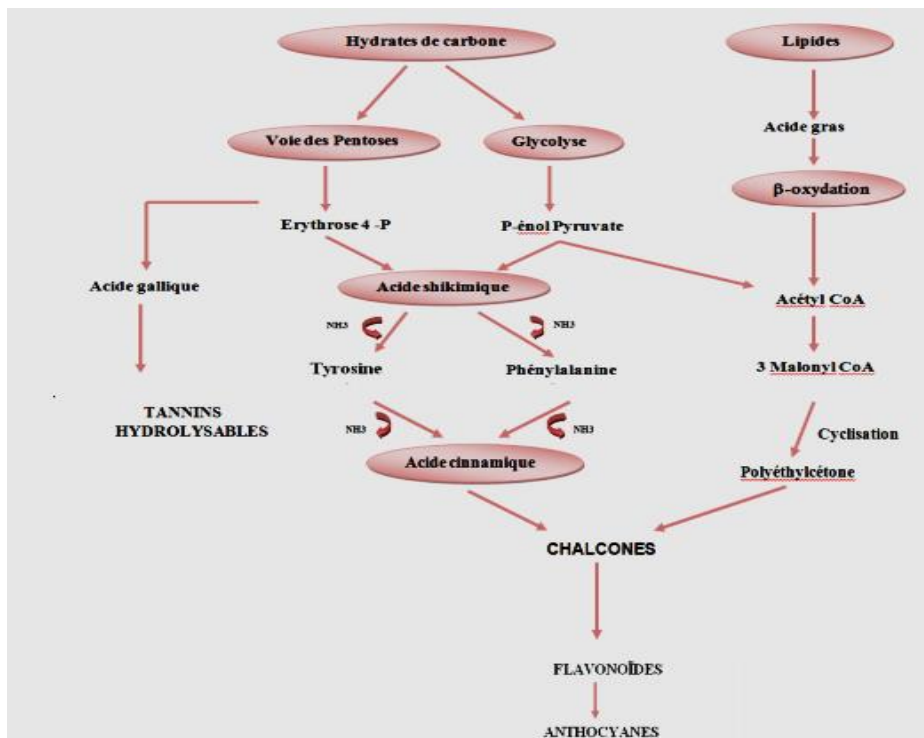


Figure 2. Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Akroum,

2.3. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libre ou liée à l'ester ou hétérosides (Bruneton, 1999). Les principales classes sont : les acides phénols, les flavonoïdes ; les tanins, les stilbénes ; les coumarines, les lignines. Les flavonoïdes représentent le groupe le plus vaste des polyphénols et le plus largement distribué dans le règne végétal (Amiot et *al.*, 2009)

2.4. Rôle des polyphénols

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

Ils jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement, en particulier contre les radiations UV, le stress oxydatif, les attaques microbiennes (Moneb et *al.*, 2011). Ils sont impliqués aussi dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (Biozot et Charpentier, 2006). Ils offrent également pour la santé humaine une protection contre certaines maladies impliquant un stress oxydatif, comme les cancers et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Sun et *al.*, 2011)

2.4.1. Les flavonoïdes

2.4.1.1. Définition

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et *al.*, 2006), ils sont considérés comme des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem et *al.*, 2001 ; Bruneton, 1999). La structure de base des flavonoïdes (fig.3) est celle d'un diphenyle propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui sont désignés par les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui est désigné par la lettre C (Dacosta.2003).

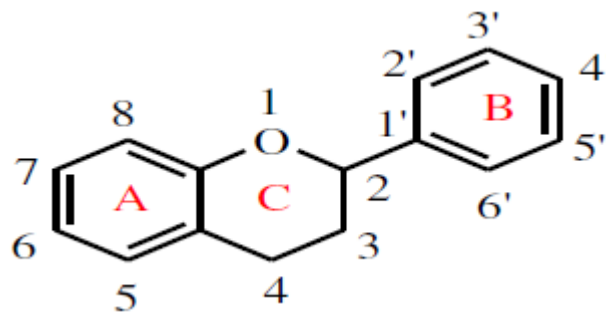


Figure 3. Structure de base des flavonoïdes.(Massaux ,2012)

Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet, plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams, 2000). Ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (Medic et al ., 2003), ils s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, ils se concentrent dans l'épiderme des feuilles où se répartissent entre l'épiderme et le mésophile (Bruneton.1999).

2.4.1.2. La biosynthèse des flavonoïdes

Malgré leur diversité importante, tous les flavonoïdes semblent avoir une voie synthétique commune présentée dans la Figure 4.

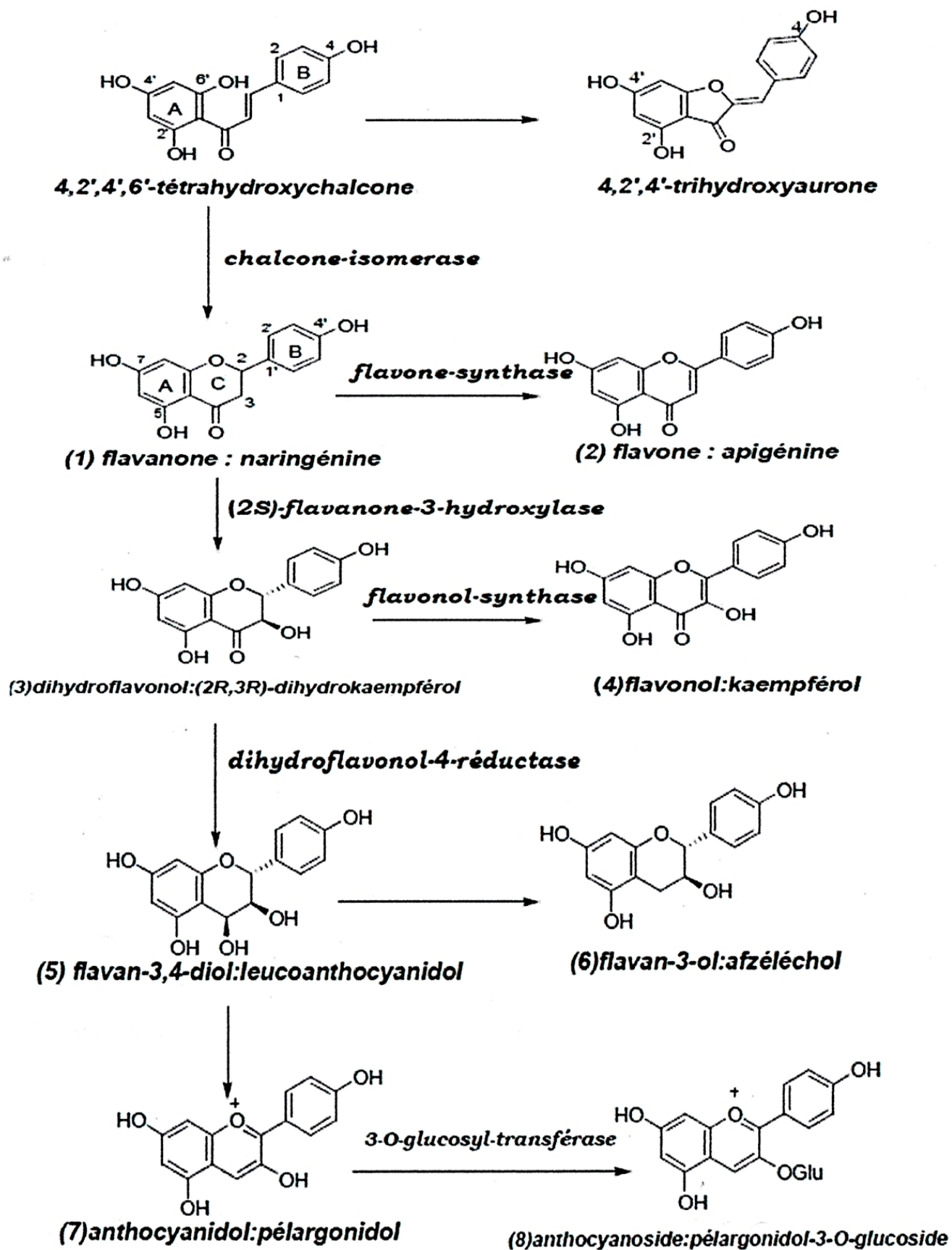


Figure 4 : Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton ,1999)

2.4.1.3. Classification flavonoïdes

Les principales classes des flavonoïdes (fig.5) sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes. Ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

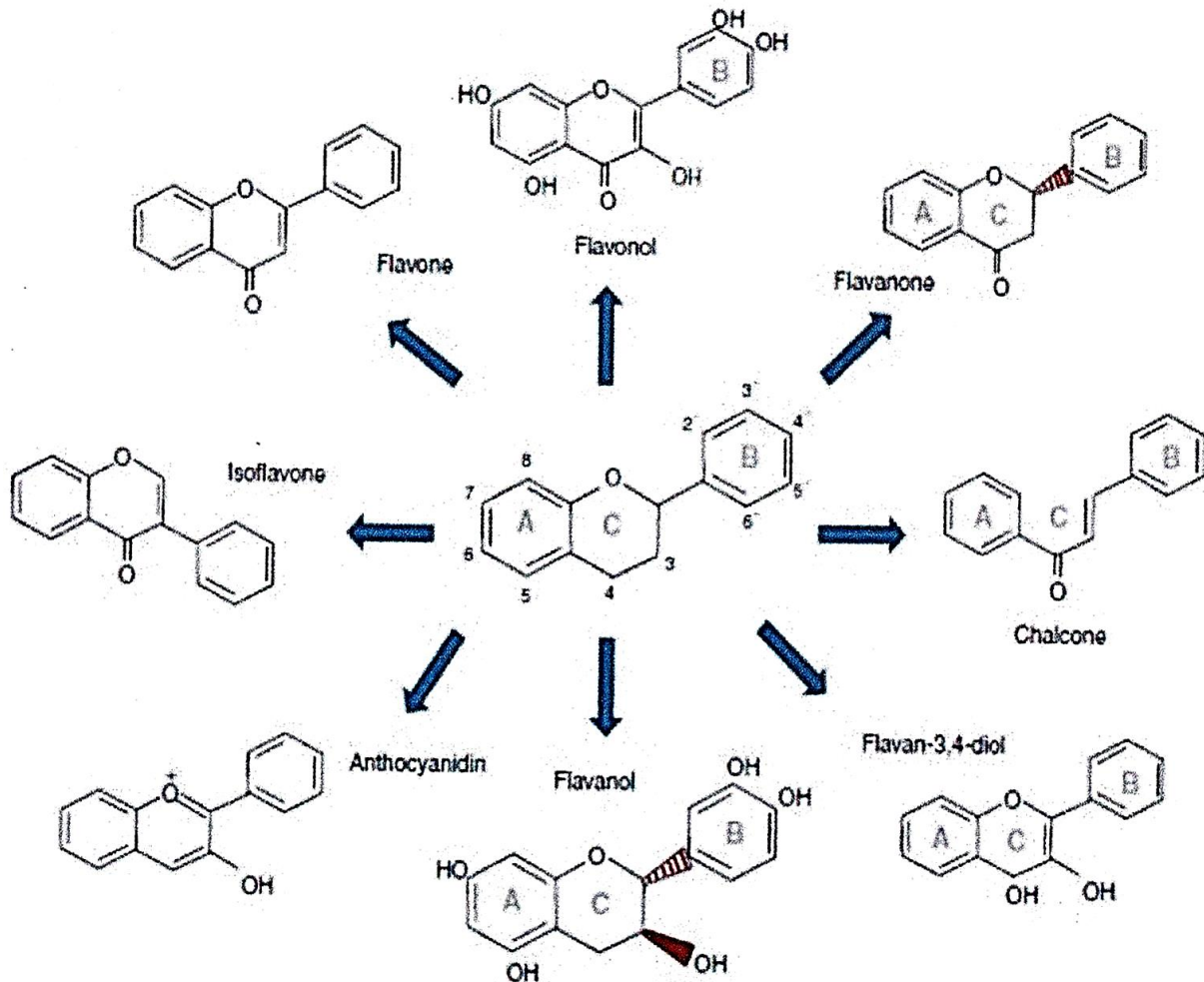


Figure 5: Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes (Fraga et Oteiza, 2011)

2.4.1.4. Rôle des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs. De ce fait, ils jouent un rôle important dans les systèmes de défenses des cellules végétales en réponse à certains stress tel que les radiations ultra violettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzyme, des agents chélatants

des métaux nocifs aux plantes. Certains flavonoïdes permettent de protéger les plantes génératrices des saveurs contre les herbivore (Harborne, 1979)

De plus, les flavonoïdes sont impliqués dans la photosensibilisation et les transports d'énergies, la morphogénèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (Pietta, 2000)

3. Les activités biologiques

3.1. Activité antimicrobienne

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

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

3.2. Activité anti-hémolytique

Les membranes des érythrocytes et l'hémoglobine sont continuellement exposées aux Espèces Réactives de l'Oxygène et d'autres espèces radicalaires (Pandey et Rizvi, 2011) qui peuvent être endommagé de manière irréversible les macromolécules environnantes en particulier les groupes amines et les groupes thiol des protéines et les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés dans les lipoprotéines, ce qui induit à une diminution dans les niveaux d'acides gras polyinsaturés (Cazzola et al 2004 ; Mohanty et al., 2014) et à l'hémolyse cellulaire (Asgray et al., 2005).

Diverses investigations ont récemment été menées sur l'efficacité protectrice des extraits de plantes contre l'hémolyse (Nabavi et al., 2012 ; Khalili et al., 2014). Cette efficacité souvent

attribuée aux composées phénoliques contenus dans l'extrait et leur interaction possible avec les lipides membranaires et les protéines des globules rouges (Maheshu et *al.*, 2010 ; Khalili et *al.*, 2014).

3.3. Utilisation cosmétologique

3.3.1. Définition d'un produit cosmétique

Selon l'article L.5131-1 du Code de la santé publique, un produit cosmétique est défini comme toute substance ou une préparation destinée à être mise en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles. »

Parmi les ingrédients utilisés dans la formulation d'un produit cosmétique : ingrédients lipophiles (excipients), ingrédients hydrophiles (adjuvants), les additifs (conservateurs, colorants, parfums), les ingrédients actifs.

3.3.2. Evaluation de la qualité du produit cosmétique

L'évaluation de la qualité des produits cosmétiques se fait selon deux types de contrôle qui sont :

3.3.2.1. Contrôle physico-chimique

L'identification d'un ingrédient consiste ainsi à recueillir le maximum de données sur sa qualité. Ces données concernent en particulier : l'origine de l'ingrédient (substance chimique de synthèse, ingrédient complexe d'origine végétale ou animale ...), sa dénomination (nom INCI, nomenclature internationale des ingrédients cosmétique), son mode détaillé d'obtention, ses propriétés organoleptiques et physico-chimiques (viscosité, solubilité, ...), son degré de pureté, la présence éventuelle d'ingrédients résiduels ainsi que sa stabilité (Elkassouani, 2013).

3.3.2.2. Contrôle microbiologique

Les industriels doivent contrôler la qualité microbiologique et la composition des produits cosmétiques qu'ils fabriquent. En conséquence, ils sont amenés à vérifier la contamination des produits, ou l'absence de bactéries pathogènes (Elkassouani, 2013).

Notre travail consiste à l'évaluation de quelques activités biologiques des extraits de *vitex agnus castus L.*, de la région d'Adrar, notre stage s'est déroulé durant la période allant de mars à juin 2019

- L'échantillonnage a été réalisé par Mme Mohamed Ouali le mois de Mars 2017.
- Le broyage des feuilles et racines a été réalisé par Mme Mohamed Ouali, au laboratoire de recherche sur les zones Arides (LRZA) à Bab Ezzouar.
- L'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie Végétale, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), El Harrach.
- L'étude de l'effet antimicrobien des extraits aqueux, flavoniques, anthocyaniques a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie (CHU de Tizi Ouzou).
- L'étude de l'effet anti-hémolytique des extraits flavoniques, a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyse de Beni Douala.
- L'utilisation de l'extrait aglyconique des feuilles en cosmétologie a été effectuée au niveau du site industriel SARL ALWAHA INTERNATIONAL (zone industrielle mouilha section 2 LOT 127 ouled Moussa wilaya de Boumerdes). L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire de contrôle de la qualité et de conformité Esafaa Azouza, Chabet El Aneur-Boumerdes.

1. Matériels

1.1. Matériel végétal

L'étude a porté sur les feuilles et les racines secondaires de 20 cm de profondeur de *Vitex agnus castus L.* L'échantillonnage a été réalisé de manière aléatoire durant le mois de mars 2017, à la station de Ouled Aissa, dans la région d'Adrar (27°54 Nord, 00°17 à l'ouest de l'Algérie), par une matinée ensoleillée, à une température de 30°C.

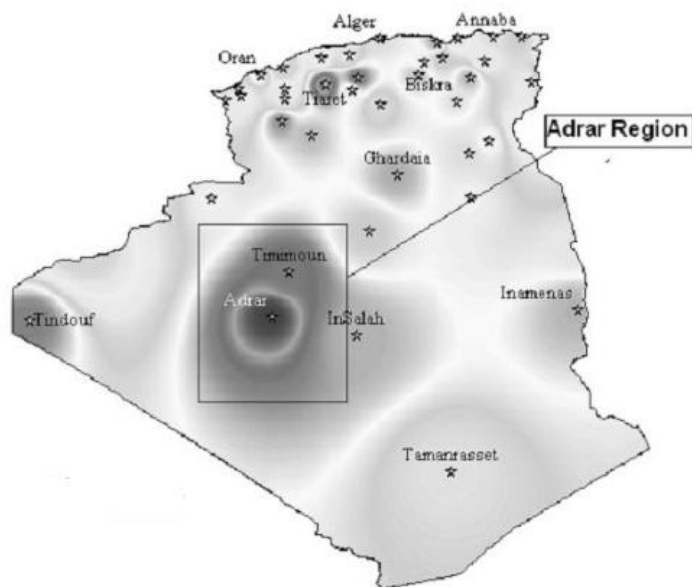


Figure 6. Localisation de la zone de l'échantillonnage (www.google.com)

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

1.2. Souches microbiennes

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur trois souches microbiennes nosocomiales (tableau1).

Tableau 1.Caractéristiques des souches microbiennes utilisées

Souches microbiennes	Gram	Familles	Références
<i>Escherichia coli</i>	-	Enterobacteriacées	ATCC252
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Staphylococcacées	ATCC25923
<i>Aspegillus niger</i>	/	Trichocomacæ	Extrait d'une souche isolée a partir d'une infection mycosique de l'oreille.

1.3. Principe de l'activité anti hémolytique

L'extrait aglyconique des feuilles de *vitex agnus castus L* a été testé in vitro sur une suspension du sang humain. L'évaluation de l'activité anti hémolytique se fait par mesure spectrophotométrique de l'hémoglobine à 540 nm. Dans ce test, l'hémolyse relative (hématies + extraits des feuilles + H₂O₂) a été évaluée en comparaison avec l'hémolyse induite par le H₂O₂ en absence de l'extrait aglyconique (contrôle négatif). Les globules rouges ont été utilisé comme contrôle positif.

1.4. Préparation du produit cosmétique

Les ingrédients rentrant dans la formulation de notre gel douche selon la désignation INCI (Nomenclature International des Ingrédients Cosmétiques)

- L'eau déminéralisée
- Le sodium laureth sulfate 40%
- Le cocamidopropyl
- Le chlore de sodium
- La betaine 6%
- Le sodium chloride 10%
- Le sodium benzoate glyceryl oléate
- L'acide lactique
- Le conservateur (synthétique, extrait aglyconique de feuilles de vitex agnus castus L.

2. Méthode**2.1. Préparation de l'extrait aqueux**

5g de poudre végétale sont infusés dans 150ml d'eau distillée jusqu'à ébullition, après refroidissement nous avons filtré la solution sur du papier watterman. L'infusé a servi d'un coté dans l'activité antimicrobienne et anti-hémolytique et de l'autre pour une éventuelle utilisation en cosmétologie.

2.2. Extraction des flavonoïdes**2.2.1. Extraction des aglycones flavoniques et des anthocyanes**

La technique utilisée a été mise au point par Bath Smith, (1954), reprise par Lebreton et al ,(1967) et enfin améliorée par Laracine, (1984).

- **Mode opératoire**

1 g de matière végétale (fig.7) est mis en suspension dans 80ml d'HCL à 2 N. Après 5 minutes de contact à froid, le mélange est porté dans un bain marie à 100°C. Pendant 40 min, nous procédons à des insufflations d'air toutes les 10 min. Après refroidissement, les extraits sont filtrés pour éliminer les traces de la matière végétale.

Deux décantations à l'éther diéthylique (30/30) sont réalisées. A chaque décantation, deux phases sont obtenues (annexe I)

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

Celle-ci est récupérée dans de petits Béchers, puis mise à évaporer à l'air libre (annexe I), pendant 24h. Après évaporation, les aglycones flavoniques sont récupérées d'un coté sec pour l'étude des activités microbienne et anti-hémolytique et de l'autre dans 3 ml d'éthanol à 96°, dans des tubes à essai et conservés à froid pour une éventuelle utilisation en cosmétologie. Notons que les manipulations ont été répétées en triplicata.

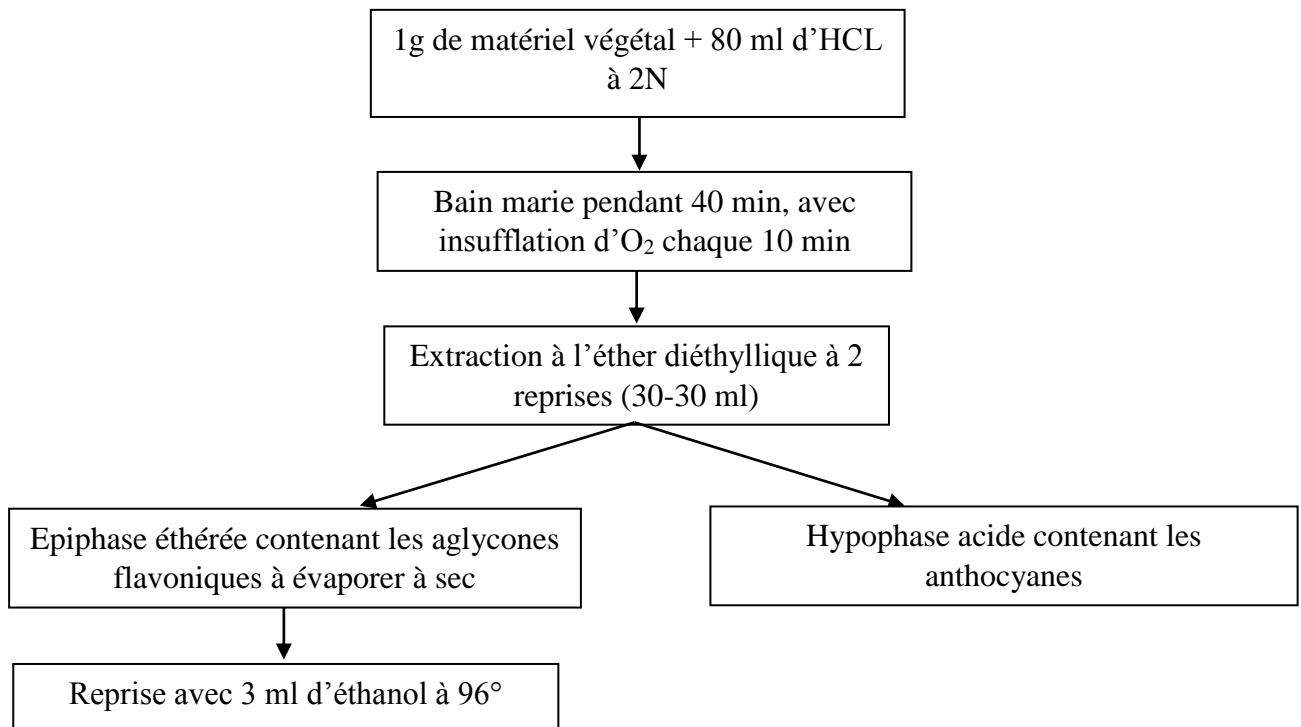


Figure 7. Méthode d'extraction des anthocyanes et des aglycones flavoniques des feuilles et racines de *vitex agnus castus L* (Laracine, 1984).

- **Calcul du rendement des aglycones flavoniques**

Le rendement (R) en aglycones flavoniques des feuilles et racines de *vitex agnus castus L*, exprimé en % est déterminé selon la formule suivante :

$$R = \frac{(m - m_0)}{m_T} \times 100$$

Avec :

m_0 : le poids du bécher vide

m : le poids du bécher avec l'extrait sec

m_T : poids de la matière végétale sèche en g.

2.3. Les activités biologiques

2.3.1 L'activité anti microbienne

Pour évaluer l'activité anti microbienne des extraits des feuilles et des racines de *vitex agnus castus L*, nous avons adopté la méthode de diffusion en milieu gélosé : le milieu Muller Hinton pour les bactéries, et le milieu Sabouraud pour les souches fongiques (antibiogramme), qui a pour but de déterminer la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (Burnichon et Texier, 2003)

Mode opératoire :

- **Préparation des suspensions**

À partir des cultures bactériennes jeunes, une à deux colonies bien isolées et parfaitement identiques sont inoculées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % de Na Cl. La suspension microbienne ainsi préparée, est bien homogénéisée et ajustée à une turbidité qui correspond au 0,5 Mc Farland (équivalente à 10^8 unités formant colonie par millilitre (CFU/ml)) (Ruiz et al., 2011) à l'aide d'un densitomètre (annexe I).

- **Préparation des milieux**

Après la fonte de la gélose au bain marie à 100°C, pendant 30 min, nous avons coulé une couche de 02 mm d'épaisseur dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre. Ces dernières sont mises au réfrigérateur à une température de 4°C pendant 1h, avant leur emploi.

- **Préparation des extraits**

Dans le bécher contenant les extraits secs d'aglycones flavoniques des feuilles et racines de *vitex agnus castus L*, nous avons rajouté 1ml de DMSO. Les solutions ainsi obtenus sont

considérées comme solution mère. De chaque bécher, nous avons pris 0.5 ml de cette solution à laquelle est ajouté 0.5ml de DMSO pour la préparation des dilutions.

- **Ensemencement**

L'ensemencement est réalisé sur boîte de pétri. 100µl de chaque suspension microbienne ont été prélevés, puis étalés à l'aide d'un râteau d'une manière uniforme sur la gélose de Müller-Hinton afin d'avoir un tapis microbien homogène. Par la suite, nous avons frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

- **Dépôt de disque et incubation**

La technique consiste à utiliser des disques de papier wattman de 6mm de diamètre imprégnés par 5µl de chaque extrait. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. La Vancomycine (30µg/disque. Oxoid LTD. Basingstoke Hampshire England) comme antibiotique pour *Staphylococcus aureus* et la Ceftriaxone (30µg/disque. Bio-Rad F92430 Marnes-la-coquette) comme antibiotiques pour *Escherichia coli* ainsi que la Voriconazole (1µg/disque. Bio-Rad F92430 Marnes-la-coquette) comme antifongique pour *Aspergillus Niger*, sont utilisés comme témoin positif. Le DMSO, l'éther et l'eau distillée comme témoin négatif.

Les boîtes sont maintenues à 6°C pendant 1 h, par la suite elles ont été incubées à l'étuve à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et 72h pour le champignon. Les manipulations sont réalisées en triplicatas.

- **Lecture des résultats**

Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) apparues sous formes de halos claires autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. D'après Chifundera et al.,(1990), les intervalles des zones d'inhibition sont interprétés comme suit :

- $ZI \leq 9\text{mm}$: souche résistante
- $10 \leq ZI < 15\text{mm}$: souche sensible
- $16 \leq ZI < 20\text{mm}$: souche sensible intermédiaire.
- $ZI > 20\text{mm}$: souche très sensible

2.3.2. Activité anti-hémolytique des extraits de feuilles de *vitex agnus castus L*

(Absence des extraits de racines par manque de matériel végétal).

l'activité anti hémolytique des flavonoïdes a été déterminée selon le protocole décrit par (Yang et al.,2005).

Préparation des extraits des polyphénols

Différentes concentrations de l'extrait des poly phénols totaux (10mg/ml ,20mg/ml) ont été solubilisées dans le Tompon Phosphate Salin (PBS).

- **Protocole expérimental**

Cinq millilitre de sang humain prélevé à partir de donneur sain ont été recueillis dans des tubes traités à l'EDTA (Ethyle diamine Tétra-Acétique) puis centrifugé (annexe I I I) pendant cinq minutes à 1000 tour/min. Le surnageant constitué de plasma, de plaquette et de la couche de globules blancs (buffycoat)a été délicatement ôté au moyen d'une pipette et le culot constitué d'érythrocytes séparés a été lavé trois fois par centrifugation de 1000 tours/min pendant 5 min dans le tampon phosphate salin (PBS) 0.2M, PH 7.4.Après la dernière centrifugation, 0.4ml du culot a été additionné à 9,6 ml de PBS pour obtenir une solution érythrocytaire à 4%

-Mettre dans des tubes 1ml de la suspension érythrocytaire préparée avec 0.5ml de l'extrait aglyconique (dilué avec le PBS) à différentes concentrations initiales

-Incuber les tubes a 37° dans l'étuve pendant 20min.

-Ajouter 0.5ml de la solution H₂O₂ (30%).

-Centrifuger les tubes a 1000 tours/min durant 10min.

-Récupérer le surnageant et éliminer le culot.

-Lire l'absorbance du surnageant de chaque tube à 540nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Mindray BA 88A (annexe I I I).

Chaque série d'expérience a été effectuée en duplicata et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par les différents extraits a été calculé.

- **Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule suivante

(Miki et al., 1987) :

$$\%d'inhibition= (Ac-Aex/Ac) \times 100$$

Où :

Ac=Absorbance du contrôle négative.

Aex=Absorbance d'extrait.

2.3.3. Utilisation des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques dans une formulation cosmétique

Le principe consiste à tester l'efficacité des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L*, en guise de conservateurs naturels en remplaçant le conservateur synthétique dans la préparation d'un gel douche.

La préparation d'un gel douche est réalisée en suivant le protocole adopté par le laboratoire de contrôle de la qualité et de conformité de DOREX

-Dans le bécher où est introduite l'eau déminéralisé, nous avons ajoutée : le sodium laureth sulfate 40%, le cocamidolpropyl, la betaine 6%, le sodium chloride 10%, le sodium benzoate glyceryl oléate, l'acide lactique. Le tous est mélangé sous une agitation de 500 tours/min pendant 1h 30 min jusqu'à dissolution est homogénéisation complète de la préparation.

-Dans la dernière étape, nous avons incorporé la préparation dans des lots de 100 g auxquelles nous avons ajouté respectivement :

Lot 1 : un conservateur synthétique

Lot 2 : un conservateur a base de l'extrait aqueux de feuilles à 2%

Lot 3 : un conservateur a base d'extrait anthocyanique de feuilles à 2 %

Lot 4 : un conservateur a base d'extrait aglyconiques de feuilles à 2%

2.3.3.1. Contrôle physicochimique du gel douche

Afin de s'assurer de la qualité du gel douche suite à l'utilisation des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques de la feuille de *vitex agnus castus L* comme conservateur naturel, nous avons déterminé son pH.

Mesure du potentiel d'Hydrogène (pH)

Ce paramètre est effectuée à l'aide d'un pH mètre de type HI 2550 pH/ORP et EC/TDS/NaCL Meter. Après avoir calibré le pH-mètre avec des solutions tampons (pH=5, pH=7). Nous avons trempé les électrodes dans le béccher qui contient le gel douche. Les valeurs du pH sont affichées sur l'écran du pH mètre.

2.3.3.2. Contrôle microbiologique du gel douche

Le contrôle microbiologique a été réalisé dans un incubateur de type EN 50 (Annexe IV) dans des conditions d'asepsie à des températures différentes spécifiques à chaque microbes.

Mode opératoire

Le protocole adopté est celui utilisé par le laboratoire de DOREX.

-Prélever 5g du gel douche de chaque lots et l'introduire dans des flacons stériles, puis compléter avec 50 ml du bouillon de neutralisation BROTH (D/E), bien homogénéiser le mélange et laisser agir pendant 15 min pour permettre le contact entre le diluant et le conservateur.

-À partir de chaque flacon, prélever 1 ml et l'introduire dans des boites des pétris stériles auquel nous avons ajouté 15 ml de milieu de culture Sabouraud pour levures et moisissures et un milieu PCA (plate count agar) pour les germes aérobies mésophiles totaux en faisant des mouvements circulaires et laisser solidifier et incuber par la suite, les boites de pétris dans l'étuve en augmentant la température au fur et à mesure.

2.3.3.3. Contrôle organoleptique du gel douche

Le contrôle organoleptique consiste à suivre les différents paramètres (odeur, couleur, aspect) en fonction du temps et de la température.

Résultats et discussion

1. Résultats du rendement en aglycones flavoniques

Les résultats du rendement en aglycones flavoniques des feuilles et racines de *vitex agnus castus L* sont présentés dans la figure 8

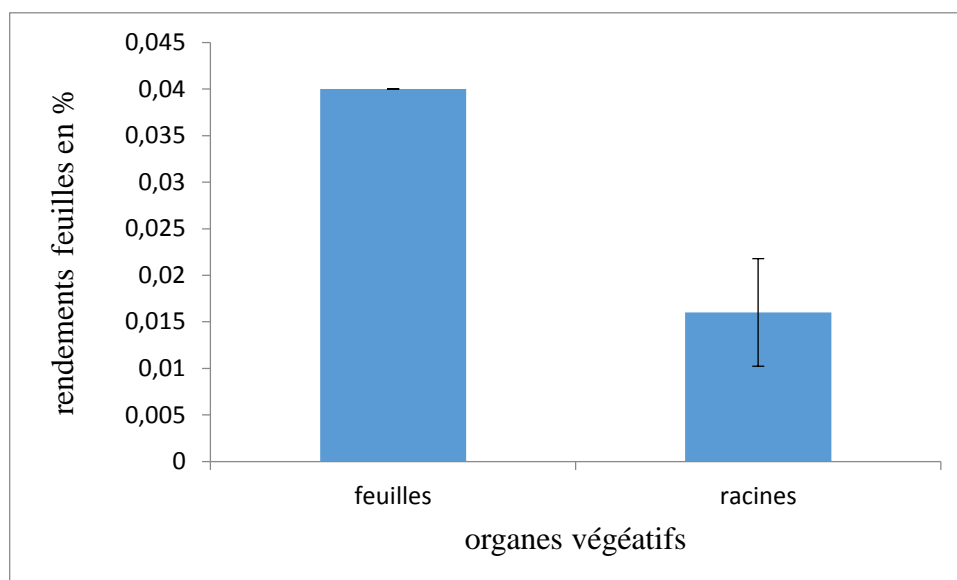


Figure 8 : Rendement en aglycones flavoniques des feuilles et racines de *vitex agnus castus L* exprimées en %

Au vu des résultats, le rendement en aglycones flavoniques exprimé en % et plus ou moins trois fois plus important au niveau des feuilles (0.04%) par rapport aux racines (0.016±0.005).

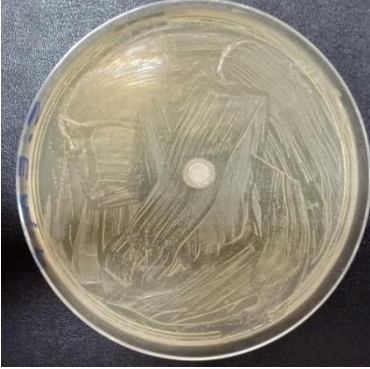
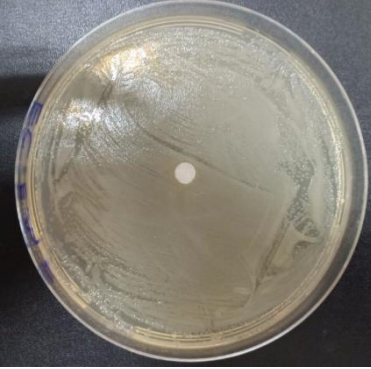
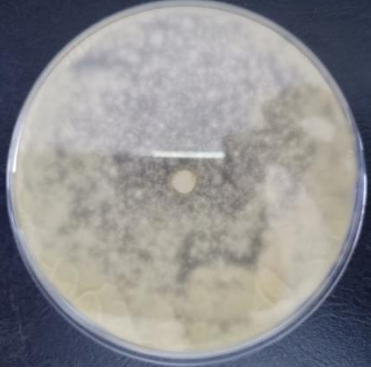



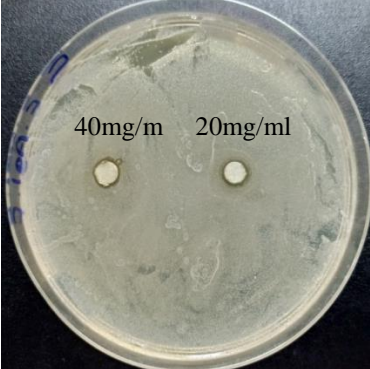
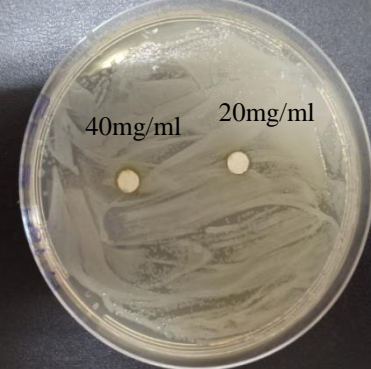
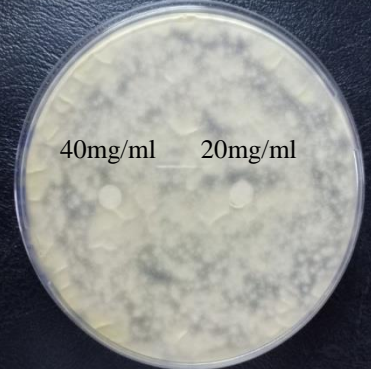
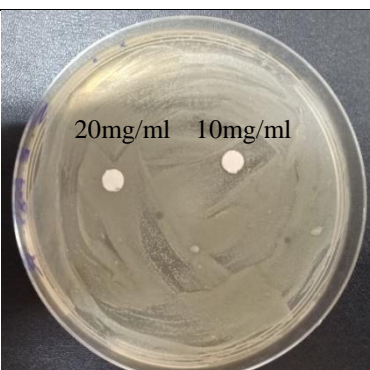

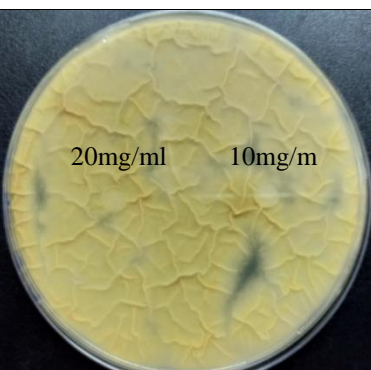
Cette inégale répartition des aglycones flavoniques pourrait s'expliquer par le fait que les feuilles sont plus exposées à l'ensoleillement que les racines. En effet, les extraits flavoniques assurent la protection des tissus de la plante contre les effets nocifs du rayonnement solaire. (Gehin et *al.*, 2006). Aussi la distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante, ceci pourrait être lié aux conditions climatiques (température, exposition solaire, sécheresse, salinité) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires notamment les aglycones flavoniques (Fallah et *al.*, 2008).

2. Activité anti microbienne

L'activité anti microbienne des extraits (aqueux, anthocyaniques et aglyconiques) des feuilles et des racines de *vitex agnus castus L* a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Cette méthode permet de déterminer l'action des différents extraits dissous dans le DMSO vis-à-vis des différentes souches microbiennes, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait. Les résultats de l'évaluation anti microbienne des extraits sont repris dans le tableau 2 dans l'annexe I I. Dans ce tableau sont présentées les valeurs en (mm) des zones ou diamètres d'inhibition de la croissance microbienne.

Tableau 2. Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de la croissance microbienne des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles et racines de *vitex agnus castus L*

Souches microbiennes Extraits testés	<i>Escherichi a coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aspergillus Niger</i>	Les normes selon CHIFUNDERA et al.,(1990)
Extrait aqueux des feuilles	6±0	6±0	6±0	10 ≤ ZI < 15 Souches sensible
Extrait aqueux des racines	6±0	6±0	6±0	
Extrait anthocyanique des feuilles	11±1.41	11.5±4.95	6±0	
Extrait anthocyanique des racines	10±1.41	11±1.41	6±0	
Extrait flavonique des feuilles (40mg/ml)	8±0	8.5±0.5	6±0	
Extrait flavonique des feuilles (20mg/ml)	7±0	7±0	6±0	
Extrait flavonique des racines (20mg/ml)	6±0	6±0	6±0	ZI < 9 souches résistante
Extrait flavonique des racines (10mg/ml)	6±0	6±0	6±0	
DMSO	6	6	6	-
Ether diéthylique	6	6	6	-
Eau distillé	6	6	6	-
Ceftriaxone (30µg/disque)	16	-	-	16 ≤ ZI < 20 Souche sensible intermédiaire
Vancomycine (30µg/disque))	-	30	-	ZI > 20 Souche très sensible
Voriconasole (1µg/disque)	-	-	18	16 ≤ ZI < 20 Souche sensible intermédiaire

Microbes Extraits.V	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Extrait aqueux des feuilles			
Extrait aqueux des racines			
Extrait aglyconique des feuilles			
Extrait aglyconiques des racines			

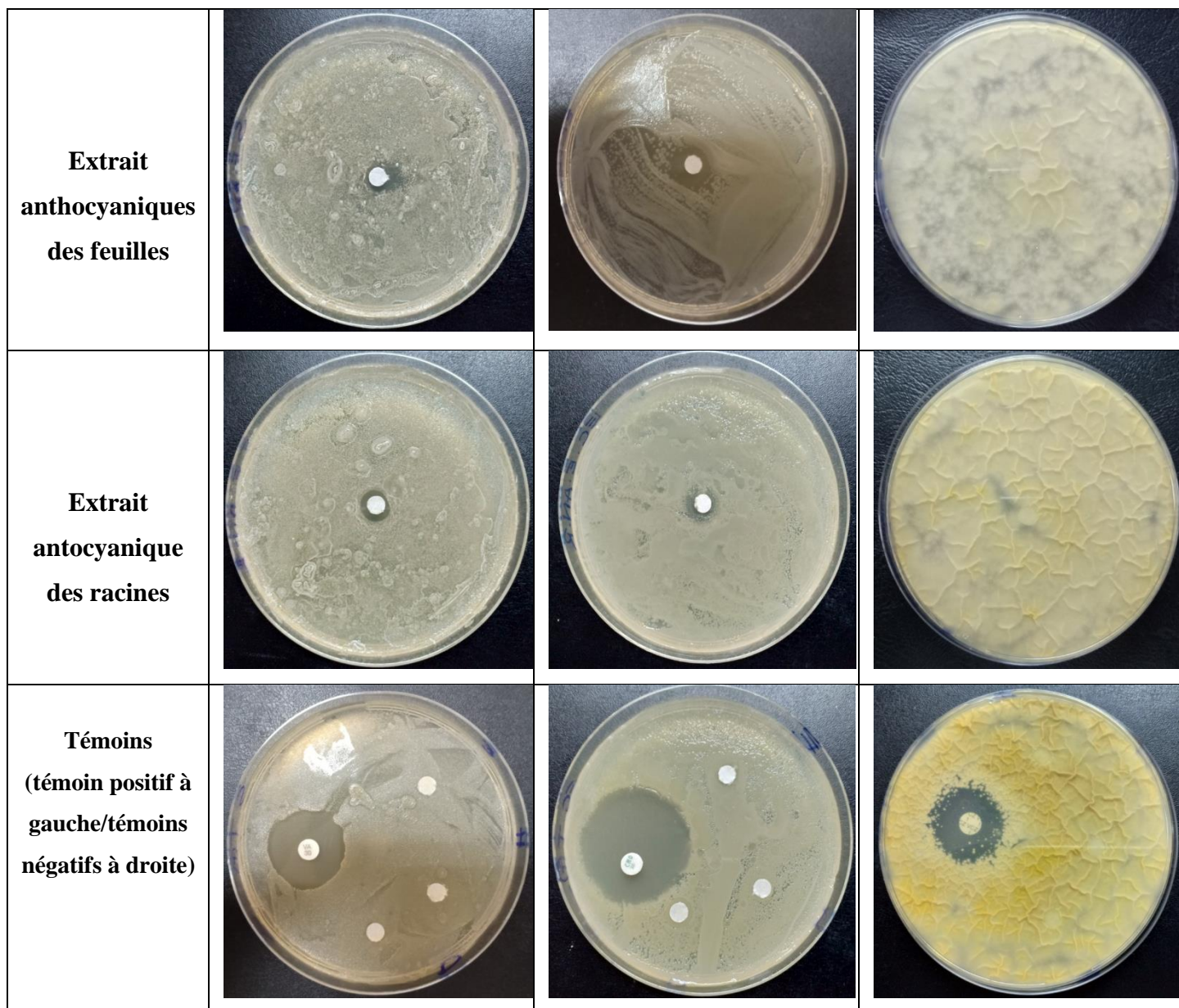


Figure 9. Zones d'inhibition de la croissance microbienne des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles et racines de *vitex agnus castus L.*

Des deux souches bactériennes traitées aux différents extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles et racines de *vitex agnus castus L*, seule *staphylococcus aureus*, s'est montrée sensible à l'extrait anthocyanique des feuilles avec une zone d'inhibition de l'ordre de $11.5 \pm 4.95\text{mm}$ et de l'autre moyennement sensible à l'extrait anthocyanique des racines avec une zone d'inhibitions de $10 \pm 1.41\text{mm}$. Cependant, cette réaction des extraits testés sur *staphylococcus aureus*, est de loin dépassée par rapport à l'effet marqué par la vancomycine sur la croissance de la bactérie, avec une zone d'inhibition de 30mm.

Utilisation de deux concentrations (20 mg/ml et 40 mg/ml) par manque de matériel végétal.

À la concentration 40mg/ml, les extraits aglyconiques des feuilles, ont montré une légère zone d'inhibition chez les deux bactéries *S.aureus* et *E.coli* avec respectivement des diamètres de l'ordre de $8.5 \pm 0.5\text{mm}$ et $8 \pm 0\text{mm}$. Alors que à la concentration 20mg/ml, nous observons une infime zone d'inhibition de l'ordre de $7 \pm 0\text{mm}$ pour les mêmes souches bactériennes.

Pour ce qui est de la souche fongique, *Aspergillus Niger*, s'est montrée résistante vis-à-vis de tous les extraits des feuilles et racines de *vitex agnus castus L*

L'extrait anthocyaniques ainsi que les aglycones flavoniques des deux organes analysés pourraient constituer une source potentielle de nouveau antibiotique. En effet, l'extrait anthocyanique de *vitex agnus castus L* possède un pouvoir inhibiteur important sur les deux bactéries étudiées. Cependant, les extraits aglyconiques de *vitex agnus castus L* paraît avoir un effet légèrement inhibiteur sur les deux bactéries

Les réactions positives des extraits anthocyaniques et aglyconiques sur les différentes souches microbiennes sont expliquées par la présence des molécules flavoniques possédant des propriétés antimicrobiennes. En effet, les polyphénols notamment les flavonoïdes sont reconnus pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes (Cowan, 1999 ; Akroum, 2011 ; Tabart, 2011). La résistance d'*Escherichia coli* pourrait s'expliquer par le fait que ces bactéries gram (-) possèdent une paroi bactérienne, très riche en lipopolysaccharides, ce qui empêcheraient les molécules antimicrobiennes d'y pénétrer. (Ghedadba et al., 2014).

Cependant, Plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antimicrobienne comme : Le type des microorganismes ciblés, la concentration, le type de l'extrait. (Ghedadba et al., 2014).

3. Activité anti-hémolytique des extraits aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L*

L'activité anti-hémolytique des extraits obtenus à partir des feuilles de *vitex agnus castus L* a été évaluée par la méthode spectrophotométrique. La figure 9 représente l'évolution de l'effet anti-hémolytique par absorbance et en pourcentage en présence de différentes concentrations de nos extraits comparée à un témoin négatif contenant des globules rouges en présence de H_2O_2 , puissant oxydant provoquant l'hémolyse cellulaire.

Tableau 3. Résultats du pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par traitements avec les différents extraits aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L*

	Concentrations (mg/ml)	Abs (1)	Abs (2)	% d'hémolyse	% d'inhibition (1)	% d'inhibition (2)	Moyennes + écart type
Extrait aglyconique 1	20	90	102	24.49	77.04	73.98	75.51±2.16
	10	128	132	33.16	67.35	66.33	66.84±0.72
Extrait aglyconique 2	20	110	116	28.83	71.94	70.41	71.17±1.08
	10	122	129	32.02	68.88	67.09	67.98±1.26
Contrôle négatif	/	392	392	100	04.09	04.09	04.09±0
Contrôle positif	/	8	8	/	/	/	8±0

Abs : absorbance

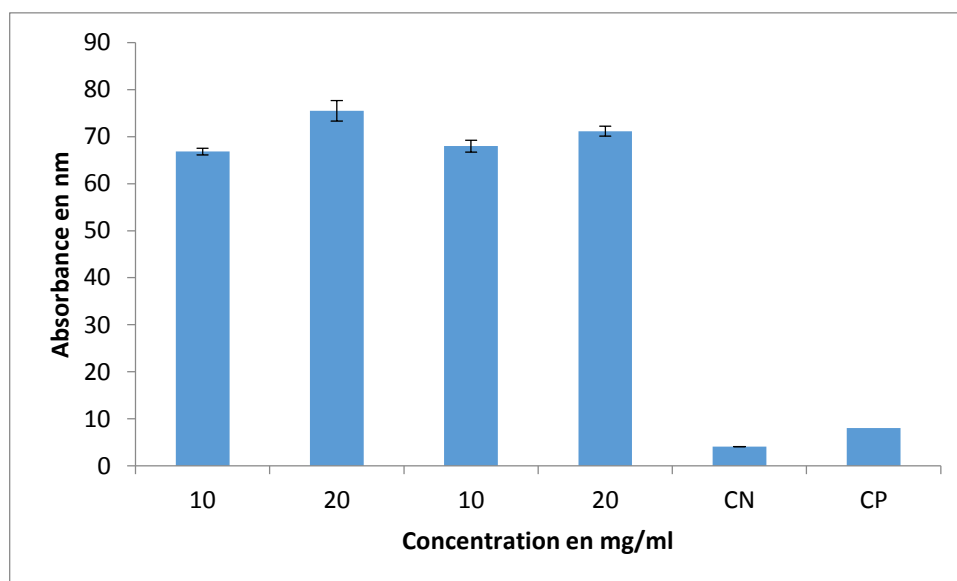


Figure 10. Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par traitements avec les différents extraits aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L*

Au vu des résultats, la concentration 10mg/ml des extraits aglyconiques des feuilles, le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est respectivement de l'ordre de 66.84 ± 0.72 et de 67.98 ± 1.26 . A la concentration 20mg/ml des extraits aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L*, le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est respectivement de l'ordre de 75.51 ± 2.16 et de 71.17 ± 1.08 . Ces taux sont jugées pas loin comparés au pourcentage d'hémolyse du témoin négatif (95.91%).

L'extrait flavonique des feuilles de *vitex agnus castus L* a inhiber une hémolyse, celle-ci est proportionnelle à la concentration en aglycones flavoniques utilisée au cours du test.

Il est intéressant de remarquer que l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration en aglycones flavoniques.

Les érythrocytes sont considérés comme des cibles de choix pour l'attaque par les radicaux libres en raison à la fois de la présence d'acides gras polyinsaturés dans la double membrane et au rôle transporteur d'oxygène, puissant générateur d'espèce réactives de l'oxygène (Ajila et Prasada Rao, 2008).

L'effet anti hémolytique des extraits aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L* pourrait être dû à la capacité des composées phénoliques, dont les flavonoïdes, à neutraliser les radicaux libres générés par H_2O_2 , protégeant ainsi les membranes érythrocytaires de la lyse cellulaire (Divya et al., 2012).

Diverses investigations ont récemment été menées sur l'efficacité protectrice des extraits de plantes contre l'hémolyse (Khalili et al., 2014). Cette efficacité est souvent attribuée aux composées phénoliques contenus dans l'extrait et leur interaction possible avec les lipides membranaires et les protéines des globules rouges (Khalili et al., 2014). Généralement, un bon inhibiteur est un agent ayant une activité antioxydante qui varie proportionnellement avec sa concentration (Bouhlali et al., 2015) intracellulaires des enzymes anti-oxydantes à activité oxydo-réductase trans-membranaires.

4-Utilisation des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques comme conservateur dans une formulation d'un gel douche

4.1. Analyse microbiologique

Les résultats d'analyse microbiologiques du gel douche formulé avec les différents extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L* comme conservateur naturel ainsi que ceux du gel douche avec conservateur synthétique sont représentés dans le tableau 4 et le tableau 5

Tableau 4. Résultats d'analyse microbiologiques du gel douche formulé avec les extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L* comme conservateur naturel

Jour	J0	J4	J8	J12	J16	J20	J24	Tolérance
Température	+25°C	+25°C	+25°C	+55°C	+55°C	+55°C	+55°C	/
Germes aérobies	00	00	00	00	00	00	00	<1000g/ml
Levures et Moisissures	00	00	00	00	00	00	00	<1000g/ml
Coliformes totaux	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<1000g/ml
Coliformes fécaux	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<1000g/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<1000g/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<1000g/ml
<i>Candida albicans</i>	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<1000g/ml
Salmonella	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<1000g/ml
Interprétations	Satis	Satis	Satis	Satis	Satis	Satis	Satis	

Abs : absence

Satis : satisfaisant

g/ml : germes/ml

Tableau 5. Résultats d'analyse microbiologique du gel douche formulé avec le conservateur synthétique.

Germes recherchés	Résultats	Normes	Références
Germes aérobies 30°C	00	<1000g/ml	N.A 1207
Levures et moisissures 20-25°C	00	<1000g/ml	N.A 8285
Coliformes totaux 30°C	00	<1000g/ml	ISO 4832
Coliformes fécaux 44°C	00	<1000g/ml	ISO 4832
<i>Staphylococcus aureus</i> 37°C	00	<1000g/ml	N.A 1198
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42°C	00	<1000g/ml	ISO 21717
<i>Candida albicans</i> 30°C	00	<1000g/ml	ISO 18416
Salmonella 37°C	00	<1000g/ml	N.A 1209/90

Au vu des résultats, à la concentration de 2% et à des températures variantes entre 25°C et 55°C des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L*, le taux des germes aérobies mésophiles, ainsi que les autres micro organismes mentionnées dans le tableau 4 est de 00 g/ml. Ces résultats sont conformes et inférieurs à la norme, qui est de l'ordre de 1000g/ml.

A la même concentration des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles, le taux de levures et moisissures et de 00 g/ml. Ces résultats sont conformes et inférieures à la norme qui est de l'ordre de 1000 g/ml.

Après la lecture de ces résultats, les extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L* pourraient être considérés comme conservateurs dans la formulation d'un gel douche grâce à leurs effets antimicrobiens. Ceci est lié à la richesse de *vitex agnus castus L* en polyphénols surtout en flavonoïdes, ces derniers sont des composés phénoliques qui suscitent un intérêt considérable en raison de leurs larges spectres et de la diversité de leurs effets biologiques (antimicrobien, antioxydant, antiviral) (Guo, 2011 ; Maimoona, 2011). Les propriétés biologiques multiples de ces composés devraient être exploitées comme ingrédients cosmétiques.

4.2. Analyse physicochimiques

Les résultats d'analyse physicochimiques du gel douche avec les extraits des feuilles de *vitex agnus castus L* comme conservateur naturel ainsi que ceux du gel douche avec le conservateur synthétique sont représentés dans le tableau 6 et le tableau 7

Tableau 6. Résultats d'analyses physicochimiques du gel douche formulé avec les extraits aqueux, anthocyaniques, aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L* comme conservateur naturel

1 Paramètre physico-chimique			
pH	Produit témoin (à la réception)	Produit témoin après 3 semaines	Produit à 55°C (après une semaine)
Extrait aqueux des feuilles de vitex	7.52	7.52	7.15
Extrait aglyconique des feuilles de vitex	7.33	7.30	6.76
Extrait anthocyanique des feuilles de vitex	6.65	6.66	6.50
Paramètres organoleptiques			
Odeur	Caractéristique	RAS	RAS
Couleur	Jaune translucide	RAS	RAS
Aspect	Homogène	RAS	Absence de déphasage

Tableau 7. Résultats d'analyse physicochimique du gel douche formulé avec le conservateur synthétique.

Paramètre physico-chimique			
pH	Produit témoin (à la réception)	Produit témoin après 3 semaines	Produit à 55°C (après une semaine)
	6.80	6.82	7.76
Paramètres organoleptiques			
Odeur	Caractéristique	RAS	RAS
Couleur	Jaune translucide	RAS	RAS
Aspect	Homogène	RAS	RAS

RAS : rien à signaler

Les résultats de mesures du pH du gel douche avec les extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L* comme conservateur naturel ainsi que le conservateur synthétique, ont révélés des valeurs allant de 6.50 à 7.52, valeur jugées conforme à la norme fixée par le laboratoire (6.80-7.76).

Le pH neutre du gel douche respecte l'équilibre de la peau avec un pH plus proche de 5.5. Cela est notamment dû à la présence sur la partie la plus superficielle de la peau d'un film hydrolipidique, une fine couche constituée de lipides (sébum) et d'eau (transpiration), dont le rôle est de préserver l'hydratation de la peau, mais également de nous protéger des agressions extérieures. Les bactéries, par exemple, ne survivent pas longtemps dans un milieu acide. La peau se dessèche et devient plus sensible aux agressions extérieures. Dans ce cas, il vaut mieux faire usage de gel douche au pH neutre bien plus respectueux de la peau et de son équilibre naturel (Johnson, 2018).

Conclusion

A l'issue de notre recherche qui a pour objectif d'évaluer quelques effets thérapeutiques des extraits de *Vitex agnus castus* L. de la région d'Adrar et également d'essayer d'incorporer l'extrait aglyconique des feuilles dans la formulation d'un gel douche.

Le rendement en aglycones flavoniques exprimé en % et quatre fois plus important au niveau des feuilles (0.04 %) par rapport aux racines (0.016 ± 0.005).

L'activité anti microbienne des extraits (aqueux, anthocyaniques et aglyconiques) des feuilles et des racines de *vitex agnus castus* L a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Cette méthode permet de déterminer l'action des différents extraits dissous dans le DMSO vis-à-vis des différentes souches microbiennes. Des deux souches bactériennes traitées aux différents extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles et racines de *vitex agnus castus* L, seule *staphylococcus aureus*, s'est montrée sensible à l'extrait anthocyanique des feuilles avec une zone d'inhibition de l'ordre de 11.5 ± 4.95 mm et de l'autre moyennement sensible à l'extrait anthocyanique des racines avec une zone d'inhibitions de 10 ± 1.41 mm. Cependant, cette réaction des extraits testés sur *staphylococcus aureus*, est de loin dépassé par rapport à l'effet marqué par la vancomycine sur la croissance de la bactérie, avec une zone d'inhibition de 30mm.

À la concentration 40 mg/ml, les extraits aglyconiques des feuilles ont montré une légère zone d'inhibition chez les deux bactéries *S.aureus* et *E.coli* avec respectivement des diamètres de l'ordre de 8.5 ± 0.5 mm et 8 ± 0 mm, alors que à la concentration 20 mg / ml, nous observons une infime zone d'inhibition de l'ordre de 7 ± 0 mm pour les mêmes souches bactériennes. Pour ce qui est de la souche fongique, *Aspergillus Niger*, s'est montrée résistante vis-à-vis de tous les extraits des feuilles et racines de *vitex agnus castus* L

L'activité anti-hémolytique des extraits obtenus à partir des feuilles de *vitex agnus castus* L a été évaluée par la méthode spectrophotométrique. L'extrait flavonique des feuilles de *Vitex agnus castus* L.a inhiber une hémolyse, celle-ci est proportionnelle à la concentration en aglycones flavoniques utilisée au cours du test. En effet, à la concentration 10 mg/ml des extraits aglyconiques des feuilles, le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est respectivement de l'ordre de 66.84 ± 0.72 et de 67.98 ± 1.26 . À la concentration 20 mg/ml des extraits aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus* L., le pourcentage d'inhibition d'hémolyse est respectivement de l'ordre de 75.51 ± 2.16 et de 71.17 ± 1.08 . Ces taux sont jugées pas loin comparés au pourcentage d'hémolyse du témoin négatif (100%).

Conclusion

Les résultats d'analyse microbiologique du gel douche formulé avec les différents extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L* comme conservateur naturel ainsi que ceux du gel douche avec conservateur synthétique ont montré qu'à la concentration de 2% et à des températures variantes entre 25°C et 55°C des extraits aqueux, anthocyaniques et aglyconiques des feuilles de *vitex agnus castus L*, le taux des germes aérobies mésophiles ainsi que les autres micro organismes est de 00 g/ml. Ces résultats sont conformes et inférieur à la norme, qui est de l'ordre de 1000g/ml.

Les résultats d'analyse physicochimique du gel douche avec les extraits des feuilles de *vitex agnus castus L* comme conservateur naturel ainsi que ceux du gel douche avec le conservateur synthétique ont révélé des valeurs du pH allant de 6.50 à 7.52, valeur jugées conforme à la norme fixée par le laboratoire (6.80-7.76). De même, les paramètres organoleptiques sont jugés identiques, avec une couleur jaune translucide, une odeur caractéristique et un aspect homogène.

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

- de caractériser le profil phénolique de *Vitex agnus castus L* à travers des techniques chromatographiques qualitatives et quantitatives notamment la GCMS, l'HPLC, ...avec l'application des tests de l'activité antimicrobienne in-vivo afin d'y trouver une application pharmaceutique dans le traitement des infections humaine, animale et végétale.
- d'augmenter l'effectif des souches bactériennes et fongiques pour mieux évaluer l'activité antimicrobienne et, d'identifier les constituants actifs responsables de l'activité antimicrobienne.
- d'identifier les principes actifs responsables de l'activité anti hémolytique et hémolytique par des techniques analytiques telles que l'HPLC.
- d'évaluer d'autres activités pharmacologiques sur les divers extraits flavoniques ainsi notamment les activités anti inflammatoire, antidiabétique, antispasmodique, antivirale...

Références bibliographiques

- [1] Allais, D., 2008, Le gattilier, *Actualités Pharmaceutiques*, vol 47, n° 479, p 49-52.
- [2] Aissaoui, H., 2010, Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de type flavonique d'une espèce de la famille des *verbénacées*, thèse de doctoral, université mentouri Constantine, 97 p.
- [3] APG III. The angiosperm phylogeny group, 2009, an update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III botanical journal of the Linnean society, 161(2), 105-121.
- [4] Amiot, M-J., Riollet, C., Landrier, J-F., 2009, polyphenols et syndrome métabolique, *Dossier thématique*, vol. 3- N°5,476-481.
- [5] Anonymous, 1998, Chaste Tree, In : Dombek C, Ed. Lawrence Review of Natural.
- [6] Akroum, S , 2011. Etude Analytique et biologique des flavonoides naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine.125p.
- [7] Bruneton, J., 2009, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Ed. Tec &.doc. 4ème Ed, paris.france. 1288p.
- [8] Bruneton, J., 1999, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales,(3ème Ed) Editions tec et doc Lavoisier, paris, 1120p.
- [9] Bathe- Smith, E., 1954, Then phenolic constituents of plants and threir taxonomic significance. J. Linn, Soc. Of London, 58 (371) p95.
- [10] Biozot, N ; Charpentier., 2006 méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. Le cahier des techniques de l'Inra, 79-82
- [11] Baba Iassa, F., 1999, Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ; Ed : LIBRAIRIE MODERNE – ROUIBA ; p : 243-244. .
- [12] Bahorun, T., Gressier, B ., Trotin, F., Brunet , C., Dine,T ., Luyckx, M., Vasseur, J ., Cazin, J., Pinkas, M., 1996, oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical prepations, *Arznei, Forschung*, 46:1086-1089pp.

Références bibliographiques

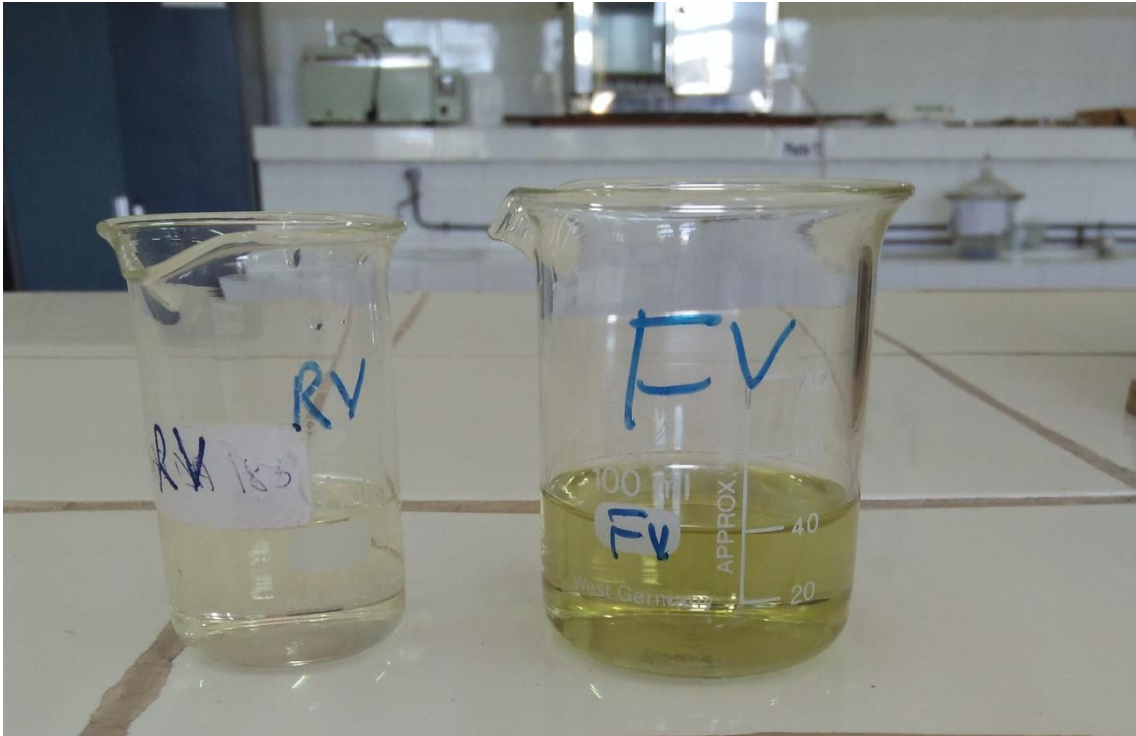
- [13] Belouad A., 2001. Plantes médicinales d'Algérie. Office Publication Universitaire, Alger, pp:5-10.
- [14] Cronquist, A., 1981, The evolution and classification of flowering plants, *Columbia University Press*, New-York
- [15] Cowan, M.M., 1999, Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4) : p 564-570.
- [16] Dacosta, Y., 2003, Les phytonutriments bioactifs, Ed Yves Dacosta, Paris, 317p.
- [17] Du Mee, C., 1993, *Aust. J. Med, Herb*, 5, 63-65.
- [18] Edeas, M., 2007, Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5, 264-270.
- [19] Fraga, C. J et Oteiza, P. I., 2011, Dietary flavonoides: Role of (-) – epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 81-823.
- [20] Falleh, H., Ksouri, R., Chaïed, K., Karray- Bouraoui, N., Trabelsi., Boulaaba, M., Abdely, C., 2008, Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. vol. (331). 372-379.
- [21] Ghestem, A., Segum, E., Paris, M., et Orecchioni, A.M., 2001. Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème} Ed *TEC&DOC*. Paris. pp275.
- [22] Grieve, 1982, A modern herbal, 2^{ème} Ed. Dover publications, New York, vol . I, 188.
- [23] Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, S., Mouloud, Y. 2014, Evaluation de l'activité anti-oxydante et antimicrobienne et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12 : 15-24.
- [24] Gehin, A., Guyon C., Nicod L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCat : The protective effect of Vitamins C and E. *Environ*, 2006, 22, 27-34.
- [25] Gee, J.M., Johnson, I.T., 2001, Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health *Current Medicinal Chemistry*, 8: 1-182.
- [26] Harborne, J.B., Williams, C-A., 2000, Advances in flavonoid research since 1992.

Références bibliographiques

- [27] Hansel R et al., 1994 Hagers Handbuchde pharmazeutichen praxis, Bd Drogen P-Z, springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1185.
- [28] J.B.Harbone, 1979, Flavonoid pigments, in Herbivores: Their Interaction With secondary plant Metabolites, Rosenthal, D.A.and Janzen D.H., EDS,Aademic press, New York.
- [29] Khadir, A., Bendahoum., Benbelaid, F., Abdoune, M-A., Abdelouahid, D-E.; 2013, pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf, récolté en Algérie ; phytothérapie ; 1-6.
- [30] Lebreton, P., Jay, M., Voirin, B., 1967, Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides, *Chimie Analytique*, Paris, 49(7) : 375-383pp.
- [31] Maussaux, C., 2012, Polyphénols : des allies pour la santé ; *abeilles & Cie* ; n°149 ; 1-4p.
- [32] Medic-Saric, M., Jasprica, I., Smolicic A., Momar, A.,2003 ; Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and phenolic Acids ; *CroatiaChemicaActa* ; vol.77 ; N°1-2 ; p:361-366.
- [33] Mohamed Ouali, D., 2016, Travaux en cours.
- [34] Moneba, A., Ibrahim,R-K ., Roy, R., Sarhan, F., 2011, Changes in wheat leaf phenolome in response to cold acclimation. *Phytochemistry*, 72, 2294-2307. Activity.
- [35] Ozanda, P., 1991, Fnore et végétation du Sahara 3éme éd. Ed.CNRS, Paris, France. 662p. relationships of flavonoids, *phytochemistry*, 67: 2058-2070.
- [36] P.Pietta, 2000, *J. Nat. Prod.*,63(7), 1035-1042.
- [37] Pottier.G, 1981. *Artémisia herba alba* flore de Tunisie : angiosperms dicotylédones gamopétales, 1012p.
- [38] Quezel, P., Santa, S., 1963, Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Vol), Paris, Centre National de la Recherche Scientifique
- [39] Richter, 1993, *Métabolisme des végétaux*. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lansamne C H-1015. .

Références bibliographiques

- [40] Ruiz, H.B. Ortega, S.R. R. Santillan, N. Farfan, Phenylboronic acid catalyzed-cyanide promoted, one-pot synthesis of 2-(2-hydroxyphenyl) benzoxazole derivatives, *Tetrahedron* , 52 ,(2011), 4308–4312.
- [41] Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K., 2006. Structure- radical scavenging activity.
- [42] Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., Zhang, Y., 2011, Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol.* 49: 2689-2696.
- [43] Teixeira, Da Silva, J.A., 2004, Mining the essential oils of the Anthemideae. *Afr.J. Biotechnol.* Vol.(3) : 706-720.
- [44] Yang, Z. G et Sang, W.H ,2005. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Astragalus membranaceus* Saponin.



Décantation

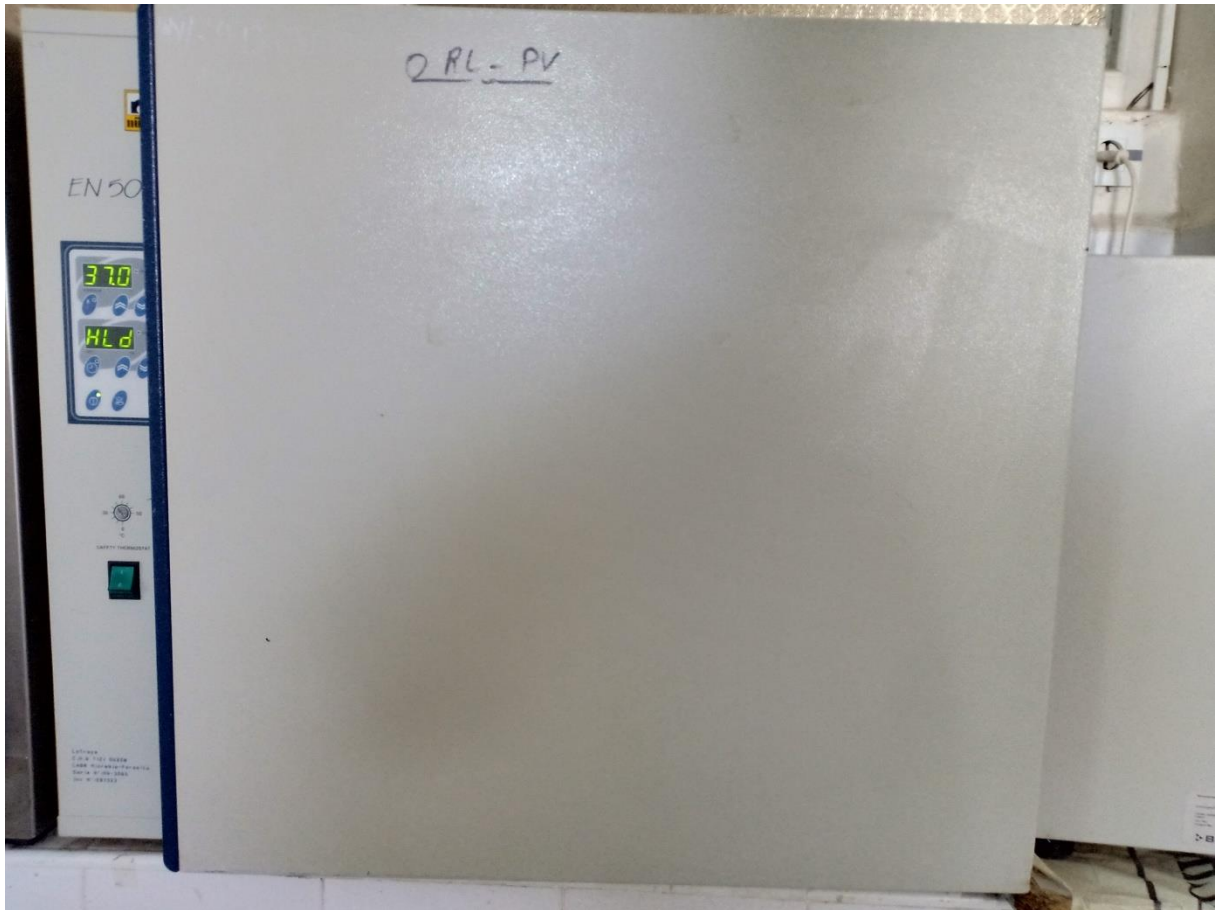




Centrifugeuse



Spectrophotomètre de type BA 88A



Incubateur de type EN 50