جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDALLAH DE FES
كلية العلوم ظهر المهراز فاس
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MEHRAZ FES

Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale

Laboratoire : Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

EL KAMARI Fatima

Criblage phytochimique et activités biologiques des huiles essentielles et des extraits non volatils de *Vitex agnus castus L.* et *Cymbopogon nardus L.*

Soutenue le 22 février 2020 devant le jury composé de :

Pr. Badiaa Lyoussi	Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès	*Présidente*
Pr. Abdelhak Belhaj	Faculté des Sciences, Meknès	*Rapporteur*
Pr.Younes Filali-Zegzouti	Faculté des Sciences, Meknès	*Rapporteur*
Pr. Abdelkader Gourch	Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès	*Rapporteur*
Pr. Mohammed Benyahya	Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès	*Examinateur*
Pr. Mourad Errasfa	Faculté de médecine et de pharmacie, Fès	Examinateur
Pr. Abdelfattah Abdellaoui	Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès	Directeur de thèse

Année universitaire : 2019-2020

Dédicace

*A mes chers parents **Ahmed** et **Aziza***
En témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leur amour, leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études. Que dieu leurs procure bonne santé et longue vie.

*A mes chers frères **Aziz, Abdelghani et Younes**.*

*A mon cher époux **EL Hassani Mohammed**, je vous remercie pour votre soutien, votre patience à mon égard et votre encouragement. Un grand merci pour la chaleur humaine que vous m'apporter au quotidien.*

*A mes enfants **Simane** et **Anir**, qui me font oublier tous mes soucis avec leurs douces paroles et leur charmant sourire enfantin. Merci pour le bonheur que vous m'apporter.*

*A ma belle sœur **Fouzia EL Hassani**, qui m'a beaucoup soutenue et encouragé pendant toute la période d'étude.*

A toutes mes tantes et mes oncles

A mes cousines et cousins

*A mes chères amis **Amal, Yassine, Imane, Nawal, Asmae, Hassan Driss, youssef, Tarik et soukaina***

A toute ma famille

A tous mes autres ami(e)s

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Remerciement

C'est avec une grande joie que j'ai débuté cette thèse, et un léger pincement au cœur que j'en arrive aujourd'hui à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne.

Cette thèse n'aurait été possible sans l'intervention de nombreuses personnes. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes plus sincères remerciements pour leurs soutiens, leurs encouragements et leurs précieux conseils.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse le Professeur ***Abdellaoui Abdelfattah*** *pour l'accueil qu'il m'a accordé dans son laboratoire, pour sa disponibilité, ses conseils, son suivi tout au long de mes années de recherche, sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et de sa confiance en moi tout au long de la préparation de ce travail. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance.*

Mes remercieument s'adressent à ***Badiaa Lyoussi,*** *directrice du laboratoire pharmacologie, physiologie et santé environnemental, pour ses encouragements et son soutien, et pour l'honneur et le plaisir qu'il me fait en acceptant la présidence du jury de ma thèse. Qu'il soit soit assuré de ma respectueuse considération.*

Je tiens également à remercier madamme ***Bouchra Oumokhtar****, professenur chercheur à la faculté de medecine et de pharmacie de Fès, qui nous a aimablement fourni des souches de bacteries nososcomiales contractées dans les services de reanimation néonatale à CHU.*

D'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, je souhaite remercier infiniment les professeurs ***Pr Abdelhak Belhaj, Pr Younes Filali Zegzouti,*** *et le Professeur* ***Abdelkader Gourch****. Je leurs suis*

particulièrement reconnaissante de m'avoir accompagné dans cette dernière étape du travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également aux examinateurs de cette thèse : Monsieur le professeur ***Mourad Errasfa*** *et Monsieur le Professeur* ***Mohammed Benyahya*** *pour avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et d'examiner ces travaux de recherche. Je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.*

Je ne saurais oublier le soutien et les encouragements de mes collègues du laboratoire pharmacologie, physiologie et santé environnementale : ***Amal Taroq, Yassine Elatki, Imane Aouam****, je vous remercie pour votre esprit d'équipe, votre soutien pendant les moments difficiles de ce travail, et Je vous souhaite tous une bonne continuation.*

Enfin, mes remerciements iront à toutes les personnes dont l'empreinte restera dans ce travail plus encore dans ma mémoire, pour leurs conseils scientifiques, leurs aides, leurs talents et leurs motivations.

Résumé

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une source inépuisable de molécules bioactives. Le présent travail consiste à la valorisation de deux plantes aromatiques et médicinales *Vitex agnus castus L*. et *Cymbopogon nardus L.*

Les huiles essentielles de *Vitex agnus castus L.* et de *Cymbopogon nardus L.*, ont été extraites par hydrodistillation et analysées par CPG-SM. L'activité antioxydante a été évaluée par trois méthodes spectrophotométriques ; DPPH, FRAP et CAT. La méthode de diffusion sur disque et la méthode de microdillution ont été utilisées pour tester l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Les extraits non volatils des deux plantes ont été obtenus par deux techniques différentes ; Soxhlet et macérée. Les teneurs en polyphénols, flavonoides, flavones et flavonols, ainsi que l'activité antioxtdante des différents extraits ont été déterminées. L'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux des plantes étudiées a été évaluée in vivo sur les rats Wistar par la méthode de Winter et al. et le test de torsion. L'effet diurétique de *Vitex agnus castus* a été testé en comparaison avec un médicament de référence ; le furosémide.

Le screening phytochimique des huiles essentielles des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus L* a révélé la richesse de ces huiles en monoterepène (1,8-Cinéole, l'α-Thujène, le Phyllocladène, l'α-Pinène). Les principaux constituants des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus L* sont le citronellal (16.9%) et le citronellol (10.4 %). Toutes les huiles sont dotées de propriétés antioxydantes modérées. Cependant, elles possèdent une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis des souches bactériennes résistantes responsables des infections nosocomiales contractées dans les services de réanimation néonatales.

Par ailleurs, Le criblage phytochimique des extraits non volatils des deux plantes étudiées montrent la présence de différents métabolites secondaires notamment les alcaloïdes, les saponines, les terpènes, les flavonoïdes et les polyphénols avec des teneurs qui différent selon type de solvant utilisé, et selon la plante ou l'organe étudié. L'évaluation de l'activité antioxydante de ces mêmes extraits par différents tests montre que ces derniers possèdent un pouvoir antioxydant important. Une forte corrélation entre la CAT et la quantité de flavones et flavonols a été détectée.

Les extraits aqueux des deux plantes étudiées possèdent un effet anti-inflammatoire dose dépendant, et une activité analgésique significativement importante en comparaison avec le Tramadol.

L'exploration de l'effet diurétique aigu et subchronique des extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* a montré que les deux extraits ont entraîné une augmentation significative du volume urinaire, de la créatinine urinaire, de la clairance de la créatinine et de l'excrétion urinaire de sodium et de potassium sans hypokaliémie en comparaison au furosémide. L'extrait des graines été plus puissant que l'extrait des feuilles autant que diurétique.

Mots clés : *Vitex agnus castus L., Cymbopogon nardus L.*, antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire, diurétique.

Abstract

Aromatic and medicinal plants are an inexhaustible source of bioactive molecules. The present work aims to the valorization of two aromatic and medicinal plants *Vitex agnus castus L.* and *Cymbopogon nardus L.*

Essential oils of *Vitex agnus castus L*. and *Cymbopogon nardus L*. were extracted by hydrodistillation and analyzed by GC-MS. Antioxidant activity was evaluated by three spectrophotometric methods; DPPH, FRAP and CAT. The disk diffusion method and the microdilution method were used to test the antibacterial activity of the essential oils. The non-volatile extracts of the two plantes were obtained by two different techniques; Soxhlet and macerated. The contents of polyphenols, flavonoids, flavones and flavonols, as well as the antioxtidant activity of the various extracts were determined. The anti-inflammatory and analgesic activity of the aqueous extracts of the plants studied was evaluated in vivo on Wistar rats by the method of Winter et al.and de torsion test. The diuretic effect of *Vitex agnus castus* was tested in comparison with a reference drug; furosemide.

The phytochemical screening of essential oils from the leaves and seeds of *Vitex agnus castus L* revealed the richness of these oils in monoterepene (1,8-Cineole, α-Thujene, Phyllocladene, α-Pinene). The main constituents of the essential oils of *Cymbopogon nardus L* leaves are citronellal (16.9%) and citronellol (10.4%). All oils have moderate antioxidant properties. However, they possess remarkable antibacterial activity against resistant bacterial strains contracted in the neonatal intensive care units.

In addition, the phytochemical screening of the non-volatile extracts of the two plants studied shows the presence of different secondary metabolites, including alkaloids, saponins, terpenes, flavonoids and polyphenols, with different contents depending on the plant or organ studied, and depending on the type of solvent used. The evaluation of the antioxidant activity of these extracts by different tests shows that they have an important antioxidant power. A strong correlation between CAT and the amount of flavones and flavonols was detected.

The aqueous extracts of the plants studied have a dose-dependent anti-inflammatory effect and a significant analgesic activity in comparison with Tramadol.

The Exploration of the acute and subchronic diuretic effect of aqueous extracts of seeds and leaves of *Vitex agnus castus L*. showed that both extracts resulted in a significant increase in urinary volume, urinary creatinine, creatinine clearance and urinary excretion of sodium and potassium without hypokalemia compared with furosemide. The seed extract was more potent than leaf extract as a diuretic.

Key words: *Vitex agnus castus L*., *Cymbopogon nardus L*., antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, diuretic.

Liste des publications

1. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. *Cymbopogon Nardus L.* Essential Oil: Phytochemical Screening and its Antibacterial Activity against Clinical Bacteria Responsible for Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2018 ; 50(1) : 14-17.
2. **Fatima El Kamari,** Amal Taroq, Yassine El Atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui**.** Chemical composition of essential oils from *Vitex agnus-castus l.* growing in Morocco and its *in vitro* antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2018; 11(10): 365-368.
3. **Fatima El Kamari,** Amal Taroq, Yassine El Atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenols content, flavonoid concentration and antioxidant activities of leaves extracts of *Vitex agnus-castus* l. Growing wild in Morocco. International journal of pharmaceutical sciences and research. 2019 ; 10(4) : 1670-1676.
4. Amal Taroq, **Fatima El Kamari**, Bouchra Oumokhtar, Imane Aouam, Yassine El Atki, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemical Screening of the Essential Oil of *Syzygium aromaticum* and Antibacterial Activity against Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 2018 ; 48(1) : 58-61.
5. Amal Taroq, **Fatima El Kamari**, Yassine El Atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant activities and total phenolic and flavonoid content variations of leaf extracts of *Laurus nobilis L.* from Morocco. Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research. 2018 ; 11(12) :540-543.
6. Imane Aouam, Yassine El Atki, Amal Taroq, **Fatima El Kamari**, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Various Extracts of *Thymus Riatarum* from Morocco. Journal of pharmaceutical sciences and research 2018 ; 10 (11) :2689-2692.
7. Amal Taroq, **Fatima El Kamari**, Yassine El Atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemical screening, polyphenols content and a novel source of antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. International journal of pharmaceutical sciences and research 2019 ; 10(8) : 3770-3776.
8. Yassine El Atki, Imane Aouam, **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Kaotar Nayme, Mohammed Timinouni, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research 2019 ; 10(2) : 63-7.

9. Yassine El Atki, Imane Aouam, **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Badiaa Lyoussi, Bouchra Oumokhtar, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium L*. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections. Arabian Journal of Chemistry 2019.
10. Yassine El atki, Imane Aouam, **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant activity of two wild Teucrium species from Morocco. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2019; 10(6): 2723-2729.
11. Yassine El Atki, Imane Aouam, **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Badiaa Lyoussi, Mustapha Taleb, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from *Teucrium polium* growing wild in Morocco. Materials Today : Proceedings 2019 : 777-783.
12. Imane Aouam, Yassine El Atki, Mustapha Taleb, Amal Taroq, **Fatima El Kamari**, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdelaoui. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of *Thymus riatarum.* Materials Today: Proceedings 2019; 579-586.
13. Yassine El Atki, Imane Aouam, **Fatima El kamari**, Amal Taroq, Abdelkader Gourch, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection bacteria. Journal of pharmaceutical sciences and research 2019; 11(2): 306-309.
14. Imane Aouam, Yassine El Atki, Amal Taroq, **Fatima El kamari**, Abdelfattah Abdellaoui. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of two Moroccan *Thymus* essential oils. Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research. 2019 ; 12(1) : 447-451.
15. Imane Aouam, Yassine El Atki, Amal Taroq, **Fatima El kamari**, Bouchra Oumokhtar, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential oil of *Thymus citriodorus L*. Growing Wild in Morocco: Preventive Approach against Nosocomial Infections. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 2019 ; 51(1) : 72-75.
16. K. Alaoui Ismaili, S. EL Arouji, A. Abdellaoui, **F. El Kamari**, Z. Rais, M. Filali Baba, M. Taleb, Khadijah M. Emran, A. Zarrouk, A. Aouniti and B. Hammouti. Electrochemical and gravimetric studies of the corrosion inhibition of mild steel in HCl medium by *Cymbopogon nardus* essential oil. Der Pharma Chemica, 2015, 7(10):34-44.

Liste des communications affichées

1. **Fatima El Kamari,** Soumaya Zizi, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui**.** Effet de la gelée royale marocaine sur certains paramètres sanguins chez les lapins : Glycémie, bilan lipidique et ionique. International conference Api-phytotherapy « Api-research for sustainable development. Palais des Congrès Fes, Morocco May 20-22, 2014.
2. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Zineb Jalal, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial activity of leaves essential oils of *Cymbopogon nardus* from Morocco. Second international symposium Api-phytotherapy « Api-qualityand Api research ». Faculté de Médecine et de pharmacie de Fès – Maroc, 5-7 Décembre 2014.
3. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine EL Atki, Abdelhamid Bendahmane, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Composition chimique et effet antioxydant de l'huile essentielle d'*Origanum Majorana* du Moyen Atlas Marocain. Journées Scientifiques organisées sous le thème « Outils d'innovation pour la valorisation des systèmes hétérocycliques et des plantes médicinales et aromatiques » le 5-6 juin 2015.
4. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Composition chimique et activité antibactérienne de quelques plantes de la région Fès Boulemane. deuxième forum des doctorants organisé par le pôle santé, recherches biomédicales et qualité de vie, la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, 3 novembre 2016.
5. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne *d'Artemisia absinthium ».* Premier congrès international : Maladies chroniques et qualité de vie organisé par le pole Santé, Recherche Biomédicale, Biomolécules et Qualité De Vie, à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, le 15 et le 16 Décembre 2016.
6. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielles de la camomille sauvage de la région de Taounate. Journées doctorales, faculté de sciences de Meknès le 2 et le 3 juin 2016.
7. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Photochemistry of the essential oil of *Cymbopogon nardus* growing in morocco: preventive approach against nosocomial infections. 1ère édition du Symposium international sur les effets bénéfiques de l'huile d'Argan sur la santé humaine, Faculté des sciences et technique d'Errachidia- Maroc, le 04-06 Mai 2017.
8. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenolic contents, flavonoid concentration and antioxidant

capacities of *Vitex agnus castus l.* growing in Morocco. 1er Congrès arabe des plantes médicinales et aromatiques, Faculté des sciences et techniques Fès- Maroc, le 18 et le 19 Octobre 2017.

9. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activities of leaves extracts of *Vitex agnus castus l.* growing wild in morocco**.** Trans Mediterranean Colloquium on Heterocyclic chemistry TRAMECH IX, Fés-Maroc, 22-25 November 2017.
10. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits *de Cladanthus arabicus.* 1'ère journée scientifique dédié aux doctorants sous le thème Biotechnologie, Ecologie et valorisation des phyto-ressources. FSDM-Fès, le 25 décembre 2017.
11. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemical components, antioxidant and antibacterial activity of leaves and fruits of *Vitex agnus castus* from Morocco. International colloquium: Valorization of natural and synthetic biomolecules in novel drug-vector nanostructures Fez, Morocco. 15-16 April 2019.

Liste des communications orales

1. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Etude phytochimique et évaluation de l'activite antioxydante et antibactérienne d'*Artemisia absinthium*. La 5ème edition internationale des jeunes chercheurs de chimie thérapeutique. Place de la phytothérapie et la chimie médicinale dans le processus de **DRUG DISCOVERY,** faculté pluridisciplinaire de Taza, le 28 et 29 novembre 2016.
2. Amal Taroq, **Fatima El kamari**, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemistry of the essential oil of *Illicium verum*: preventive approach against the pathogenic bacteria. La 5ème edition internationale de journées jeunes chercheuses de chimie thérapeutique. Place de la phytothérapie et la chimie médicinale dans le processus de DRUG DISCOVERY, faculté polydisciplinaire de Taza, Maroc 28 et 29 Novembre 2016.
3. Amal Taroq**, Fatima El kamari**, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochimie et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de Laurus nobilis du nord du Maroc. Colloque international sous thème substances naturelles stress et métabolismes cellulaires, Faculté des sciences et techniques Settat, Maroc 15et 16 Décembre 2016.
4. Amal Taroq, **Fatima El kamari**, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Activités antioxydantes, et variations de la teneur totale en polyphénols et flavonoides de trois extraits des feuilles du Laurus nobilis du Maroc. La deuxième édition du congrès international des sciences pharmaceutiques (CISPharm 2017), faculté des sciences et techniques de Béni Mellal, Maroc 17-18 Février 2017.
5. **Fatima El Kamari**, Amal Taroq, Yassine El Atki, Iman Aouam, Nawal El Menyiy, Asmae El Ghouizi, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Teneur en phénols et en flavonoïdes, activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de feuilles de *Cymbopogon nardus l.* Congrès international : Valorisation des ressources naturelles, de la recherche scientifique a la faisabilité socio-économique, faculté de sciences Rabat- Maroc**,** du 26 au 28 juin 2019.

Liste des figures

Figure I.1: Montage d'hydrodistillation (Clevenger). 10
Figure I.2: Principe de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau 11
Figure I.3: Monoterpènes et sesquiterpènes 13
Figure I.4: Exemples de composés aromatiques 13
Figure I.5: Stress oxydant 21
Figure I.6:Formation des radicaux libres 22
Figure I.7: Butylhydroxytoluène (BHT) 25
Figure I.8: Butylhydroxyanisole (BHA) 25
Figure I.9 : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires 36
Figure I.10: Structure de base du néphron 40
Figure I.11: sites d'action des substances diurétiques. 42
Figure I.12: *Vitex agnus castus L.* 44
Figure I.13: *Cymbopogon nardus L.* 48
Figure II. 1: Disques imprégnés d'antibiotique pour réalisation d'antibiogramme. 55
Figure II.2: Montage expérimental d'hydrodistillation. 56
Figure II.3: Montage expérimental de l'appareil Soxhlet 57
Figure II.4: Rotavapeur (Laboratoire LPPSE, FSDM) 58
Figure II.5: Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (Cité d'innovation Fès). 59
Figure II.6: Structure du DPPH et sa réduction par un antioxydant (RH). 62
Figure II.7: Etapes de la préparation des suspensions bactériennes 65
Figure II.8: Principe de la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme). 66
Figure III.1: Chromatogramme de CPG/SM d'huile essentielle des graines de *Vitex agnus castus*. 74
Figure III.2: Chromatogramme de CPG/SM d'huile essentielle des feuilles de *Vitex agnus castus*. 74
Figure III.3: Chromatogramme de CPG/SM d'huile essentielle des feuilles de *Cymbopogon nardus.* 76
Figure III.4: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles étudiées et du BHT. 78
Figure III.5: Absorbance en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles étudiées et de la Quercétine 79
Figure III.6: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux. 92
Figure III.7: Courbe d'étalonnage de Rutin pour le dosage des Flavonoïdes. 92
Figure III.8: Teneur en polyphénols dans les différents extraits des feuilles, des graines de *Vitex agnus castus L* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.* 93

Figure III.9: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des feuilles, des graines de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*..... 94
Figure III.10: Courbe étalon pour le dosage des flavonols..... 95
Figure III.11: Teneur en flavonols dans les différents extraits des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*..... 95
Figure III.12 : Courbe étalon de la vitamine C pour la mesure de la capacité antioxydante totale..... 96
Figure III.13: Activité antioxydante des différents extraits des graines de *Vitex agnus castus L.* préparés par la technique du soxhlet et du BHT. 97
Figure III.14: Activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Vitex agnus castus L.* préparés par la technique du soxhlet et du BHT. 98
Figure III.15: Activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Cymbopogon nardus L.* préparés par la technique du soxhlet et du BHT..... 98
Figure III.16: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des Graines de VAC préparés par soxhlet et la quercétine. 100
Figure III.17: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des feuilles de VAC préparés par soxclet et la quercétine..... 100
Figure III.18: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des feuilles de *Cymbopogon nardus L.* préparés par soxhlet et la quercétine. 101
Figure III.19: Teneur en polyphénols dans les différents extraits des feuilles, des graines de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*..... 104
Figure III.20: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des feuilles, des graines de *Vitex agnus castus L.* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L*..... 105
Figure III.21: Teneur en flanones et flavonols dans les différents extraits des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus L., et* les feuilles *de Cymbopogon nardus L.*..... 106
Figure III.22: Capacité antioxydante totale (CAT) des différents extraits en mg Eq Vit C /g Ms. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD. 107
Figure III.23: Activité antioxydante des différents extraits des graines de *Vitex agnus castus L.* préparés par macération et du BHT. 108
Figure III.24: Activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Vitex agnus castus L.* préparés par macération et du BHT. 108
Figure III.25: Activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Cymbopogon nardus L.* préparés par macération et du BHT..... 109
Figure III.26: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des Graines de *Vitex agnus castus L.* préparés par macération et la Quercétine..... 110
Figure III.27: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des feuilles de VAC préparés par macération et la Quercétine. 111

Figure III.28: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des feuilles de la citronnelle préparés par macération et la Quercétine. 111
Figure III.29: Corrélation entre la capacité antioxydante totale et la teneur des extraits en polyphénols totaux. 112
Figure III.30: Corrélation entre la capacité antioxydante totale et la teneur des extraits en flavonoïdes. 113
Figure III.31: Corrélation entre la capacité antioxydante totale et la teneur en Flavones et Flavonols. 113
Figure III.32 : Corrélation entre les valeurs d'IC_{50} et la teneur des extraits en flavonoïdes. 114
Figure III.33: Corrélation entre les valeurs d'IC_{50} et la teneur des extraits en polyphénols totaux..... 114
Figure III.34: Corrélation entre les valeurs d'IC_{50} et la teneur en Flavones et Flavonols. 115
Figure III.35: Corrélation entre les valeurs d'EC_{50} et la teneur des extraits en polyphénols totaux. .. 115
Figure III.36: Corrélation entre les valeurs d'EC_{50} et la teneur des extraits en flavonoïdes. 116
Figure III. 37: Corrélation entre les valeurs d'EC_{50} et la teneur en Flavones et Flavonols. 116
Figure III. 38: Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Cymbopogon nardus* administré par voie orale à différentes doses et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. 124
Figure III.39: Effet de l'extrait aqueux des graines de *Vitex agnus castus* administré par voie orale à différentes doses et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. 125
Figure III.40: Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Vitex agnus castus* administré par voie orale à différentes doses et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. 125
Figure III.41: Effet de la crème à base de citronnelle appliquée par voie cutanée à deux doses différentes (5 et 10 %) et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. 126
Figure III.42: Effet de la crème à base des feuilles de VAC appliquée par voie cutanée à deux doses différentes (5 et 10%) et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. 127
Figure III.43: Effet de la crème à base des Graines VAC appliquée par voie cutanée à deux doses différentes (5 et 10%) et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. 127
Figure III.44: Activité analgésique des extraits des plantes étudiées et du Tramadol en comparaison avec le groupe contrôle. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. ***: $p < 0.001$. 128

Figure III.45: Effet subchronique de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* et du furosémide sur le volume urinaire quotidien (mL/24 h). 133
Figure III.46: Effet de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.*, et du furosémide sur le niveau d'électrolytes urinaires (sodium, potassium et chlorure) à la fin du traitement (jour 16). 134
Figure III.47: Effet de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* et du furosémide sur l'indice salidiurétique observé au jour 16. 134

Liste des tableaux

Tableau I.1: Classification botanique de *Vitex agnus castus L.* 45

Tableau I.2: Classification botanique de *Cymbopogon nardus L.*..... 49

Tableau II.1: Différents groupes de rats utilisés pour l'exploration de l'effet diurétique de *Vitex agnus castus L.*..... 68

Tableau III.1: Composition chimique des huiles essentielles des feuilles et des graines de *Vitex agnus-castus L.*..... 75

Tableau III.2:Composition chimique des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus L.* 77

Tableau III.3: Activités antioxydantes des huiles essentielles étudiées en comparaison avec les standards. 78

Tableau III.4: Activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées et des antibiotiques exprimés en diamètre d'inhibition. 80

Tableau III.5: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles étudiées (en mg/ml). 81

Tableau III.6: Rendement en huiles essentielles selon l'origine géographique et la partie de la plante étudiée. 82

Tableau III.7: Rendements d'extraction obtenus à partir de *Vitex agnus castus* (graines et feuilles) et *Cymbopogon nardus* (Feuilles) par les différents solvants (Ethanol, méthanol, acétates d'éthyle et l'eau). 90

Tableau III.8: Résultats de criblage phytochimique des différents extraits des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* L. et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*..... 91

Tableau III.9: Capacité antioxydante totale des différents extraits en mg Eq Vit C /g Ms. 97

Tableau III.10: Les valeurs des IC_{50} pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3). 99

Tableau III.11 **:** Les valeurs des EC_{50} pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3). 101

Tableau III.12 : Coefficients de corrélation de Pearson entre les composés et le pouvoir antioxydant par différents tests..... 102

Tableau III.13: Rendements d'extraction obtenus à partir de *Vitex agnus castus L.* (graines et feuilles) et *Cymbopogon nardus L.* (Feuilles) par les différents extraits (Ethanol, méthanol, acétate d'éthyle et l'eau.)..... 103

Tableau III.14 : Les valeurs des IC_{50} pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3). 109

Tableau III.15: Les valeurs des EC_{50} pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3). 112

Tableau III.16: Effet aigu de l'eau distillé, des extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* et du furosémide administré par voie orale sur le volume urinaire chez les rats Wistar normaux pendant 24 h. 132

Tableau III.17: Effet de l'administration quotidienne d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* et du furosémide sur les concentrations plasmatiques de sodium, de potassium, de chlorure, d'urée et de créatinine chez des rats normaux après seize jours de traitement. 135

Tableau III.18: Effet de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* et du furosémide sur la clairance de la créatinine mesurée au jour 1 et au jour 16 après le traitement (mL / min). 135

Tableau III.19: Effet de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* et du furosémide sur l'osmolalité plasmatique, l'osmolalité urinaire, la clairance osmolaire et la clairance d'eau libre au jour 16 du traitement. 136

Liste des abréviations

H E	: Huile essentielle.
AFNOR	: L'Association Française de Normalisation.
CPG /MS	: chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.
ERO	: Espèces réactives d'oxygène
ADN	: Acide Désoxyribo Nucléique
AGPI	: Acides gras polyinsaturés.
NNIS	: National Nosocomial Infections Surveillance.
OMS	: Organisation mondiale de la santé.
WHO	: World health organisation.
PAF	: Platelet Activiting Factor.
AINS	: Les anti-inflammatoire non stéroïdiens.
COX	: Cyclooxygénase.
AIS	: Anti-inflammatoires stéroïdiens.
AINS	: Anti-inflammatoires Non stéroïdiens.
APG	: l'Angiosperms Phylogeny Group.
VAC	: *Vitex agnus castus L.*
CN	: *Cymbopogon nardus L.*
VIH	: Virus de l'Immunodéficience Humaine.
SIDA	: Syndrome d'immunodéficience acquise.
CAT	: Capacité Antioxydante Totale.
DPPH	: 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
FRAP	: Ferric reducing power activity
CMI	: concentration minimale inhibitrice.
IC50	: Inhibitory concentration 50%.
BHT	: Hydroxytoluène butylé
AG	: Acide Gallique

Sommaire

Dédicace i
Remerciement ii
Résumé iv
Abstract v
Liste des figures xi
Liste des tableaux xv
Liste des abréviations xvii
Introduction générale 3

Partie I: Synthèse bibliographique

Chapitre I : Plantes aromatiques et médicinales 7
I. Définition 7
II. Composition 7
II.1. Composés volatiles : Les huiles essentielles 7
II.1.1. Bref historique 7
II.1.2. Définition 8
II.1.3. Caractéristiques physiques 9
II.1.4. Biosynthèse 9
II.1.5. Localisation et rôles 9
II.1.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles 10
a. L'hydro distillation 10
b. Entraînement à la vapeur d'eau 11
c. L'expression à froid 11
d. Extraction par solvants 11
e. Extraction par les corps gras 12
f. Extraction assistée par micro-ondes 12
g. Extraction par CO_2 supercritique 12
II.1.7. Composition chimique des huiles essentielles 12
II .1.7.1. Les terpènes : 12
II.1.7.2. Les composés aromatiques : 13
II.1.7.3. Les composés d'origine variée 14
II.1.8. Facteurs influençant la composition d'une HE 14
II.1.9. Conservation des huiles essentielles 14
II.1.10. Analyses des huiles essentielles 15
II.1.11. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles 15
a. Effet antioxydant 15

b. Effet anti-inflammatoir 15
c. Effet antibactérien 16
d. Effet antifongique 16
e. Effet antiparasitaire 16
f. Effet insecticide et insectifuge 16
g. Effet antiviral 16
h. Effet anti-tumorale 17
i. Effet sur le système nerveux 17
II.1.12. Domaines d'utilisation des huiles essentielles 17
II.1.12.1 Industrie alimentaire 17
II.1.12.2 Parfumerie et cosmétologie 17
II.1.12.3 En pharmacie 18
II.1.13. Toxicité des huiles essentielles 18
II.2. Composés organiques non volatiles 18
II.2.1. Composés phénoliques 18
II.2.1.1. Flavonoïdes 18
II.2.1.2. Tanins 19
II.2.1.3. Coumarines 19
II.2.2. Terpènes 19
II.2.3. Alcaloïdes 19
II.2.4. Saponines 19
Chapitre II : Stress oxydatif 21
I. Définition 21
II. Radicaux libres et espèces réactives d'oxygène 21
III. Origine du stress oxydant 22
IV. Conséquences du stress oxydant 23
V. Antioxydants et système de défense 24
V.1. Antioxydants 24
V.2. Système de défense enzymatique 24
V.3. Système de défense non enzymatique 25
V.4. Antioxydants de synthèse 25
Chapitre III : Infections nosocomiales néonatales 27
I. Infections nosocomiales : définition et prévalence 27
II. Infections nosocomiales néonatales 27
II.1. Prévalence 27
II.2 Sites d'infections et germes responsables 28
a. Bactéries 28

b. Virus 29
c. Champignons et parasites 29
II.3. Resistance bactérienne 30
a. Définition 30
b. Mécanismes d'antibioresistance 30
II.4. Diagnostic de l'infection nosocomiale 31
II.5. Impact des infections nosocomiales néonatales 31
II.6. Prévention des infections nosocomiales 32
Chapitre IV : Inflammation et nociception 33
I. Inflammation 33
I.1. Définition 33
I.2. Types d'inflammation 33
I.3. Médiateurs de l'inflammation 34
I.3.1. Médiateurs plasmatiques 34
I.3.2. Médiateurs cellulaires 35
I.4.Anti-inflammatoires 35
I.4.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens 36
I.4.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens 36
I.4.3. Effets Indésirables des anti-inflammatoires 36
II. Douleur 37
II.1. Définition 37
II.2. Types de douleur 37
II.2.1. Douleur aiguë 37
II.2.2. Douleur chronique 37
II .3. Les antalgiques 37
II.3.1. Les antalgiques morphiniques (opiacés) 38
II.3.2. Les antalgiques non morphiniques 38
Chapitre V : Diurèse et Diurétiques 39
I. Diurèse 39
I.1. Définition 39
I.2. Rappel de physiologie rénale 39
I.2.1. Structure 39
I.2.2. Fonction 39
a. Filtration glomérulaire 40
b. Réabsorption 40
c. Sécrétion tubulaire 41
II. Les diurétiques 41

II.1. Définition 41
II.2. Classification des diurétiques 41
II.3. Indications thérapeutiques 43
II.4. Effets indésirables des diurétiques 43
Chapitre VI : Présentation des plantes étudiées 44
I. *Vitex agnus castus L.* 44
I.1. Description de l'espèce 44
I.2. Classification botanique 45
I.3. Répartition géographique 45
I.4. Noms communs 45
I.5. Aspects Historique et usage traditionnel 45
I.6. Composition chimique 46
I.7. Activités biologiques 47
I.7.1. Activité hormonale 47
I.7.2. Activité antitumorale 47
I.7.3. Activité anti-inflammatoire 47
I.7.4. Activité antibactérienne et antifongique 47
I.7.5. Activité antioxydante 48
II. *Cymbopogon nardus L.* 48
II.1. Description de l'espèce 48
II.2. Classification 49
II.3. Répartition géographique 49
II.4. Utilisations traditionnelles 49
II.5. Composition chimique 50
II.6. Activités biologiques 50
II.6.1. Activité antifongique 50
II.6.2. Activité antibactérienne 50
II.6.3. Activité cytotoxique 50
II.6.4. Activité Analgésique 51
II.6.5. Activité antivirale 51

Partie II: Matériel et méthodes

Matériel et méthodes 53
I. Matériel 53
I.1. Matériel végétal 53
I.2. Animaux 53
I.3. Souches bactériennes 53

I.4. Antibiotiques 54
II. Méthodes d'extraction 55
II.1. Extraction des huiles essentielles 55
II.1.1. Détermination du rendement 56
II.1.2. Conservation des huiles essentielles 56
II.2. Extraction par les solvants organiques 56
II.2.1. Par macération 56
II.2.2. Par soxclet 57
III. Méthodes d'analyse des huiles essentielles 58
IV. Méthodes d'activités biologiques 59
IV.1. In vitro 59
IV.1.1. Criblage phytochimique 59
IV.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante 61
IV.1.2.1. Capacité antioxydante totale (CAT) 61
IV.1.2.2. Détermination du pouvoir réducteur 62
IV.1.2.3. Piégeage du radical libre DPPH 62
IV.1.3. Dosage de polyphénols totaux 63
IV.1.4. Dosage de flavonoïdes totaux 64
IV.1.5. Dosage de flavons et flavonols 64
IV.1.6. Evaluation de l'activité antibactérienne 64
IV.1.6.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) 65
IV.1.6.2. Méthode de microdilution 66
IV.2. IN VIVO 67
IV.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L* 67
IV.2.2. Exploration de l'effet diurétique des extraits aqueux de graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L* 68
IV.2.2.1. Traitement aigu 68
IV.2.2.2. Traitement subchronique 68
IV.2.2.3. Dosages 69
IV.2.2.4. Analyses statistiques 70

Partie III: Résultats et discussion

Chapitre I : Composition chimique, activité antioxydante et antibactérienne des huiles essentielles de *Vitex agnus castus L. et Cymbopogon nardus L.* 72
I. Introduction 72
II. Résultats 73

II.1. Analyse chromatographique des huiles essentielles de *Vitex agnus castus L*..... 73
II.1.1. Rendement 73
II.1.2. Composition chimique 73
II.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* 76
II.2.1. Rendement 76
II.2.2. Composition chimique 76
II.3. Activité antioxydante des huiles essentielles de *Vitex agnus castus* et *Cymbopogon nardus* ... 77
II.3.1. Le piégeage du radical libre DPPH• 77
II.3.2. Pouvoir réducteur (FRAP) 79
II.3.3. Capacité antioxydante totale 79
II.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles 80
III. Discussion 81
III.1. Rendement et composition des huiles essentielles de *Vitex agnus castus L.*..... 81
III.2. Rendement et composition chimique des huiles essentielles de *Cymbbopogon nardus L.* 83
III.3. Activité antioxydante des huiles essentielles de *Vitex agnus castus* L. et *Cymbopogon nardus L.* 84
III.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles 85
IV. Conclusion..... 88
Chapitre II : Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitex agnus castus L.* et *Cymbopogon nardus* L.par deux techniques différentes : soxclet et macéré.. 89
I. Introduction..... 89
II.Résultats..... 89
II.1. Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitex agnus castus L.* et *Cymbopogon nardus L.* par la technique de soxclet 89
II.1.1. Rendement des extraits 89
II.1.2. Résultats de l'analyse qualitative (Criblage phytochimique) 90
II.1.3. Résultats de l'analyse quantitative..... 91
II.1.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits 96
II.1.4.1. Capacité antioxydante totale (CAT) 96
II.1.4.2. Piégeage du radical libre DPPH :..... 97
II.1.4.3. Pouvoir réducteur de fer 100
II.1.4.4. Corrélations..... 102
II.2. Dosage de Polyphenols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitex agnus castus* et *Cymbopogon nardus* préparés par macération..... 103
II.2.1. Rendement des extractions 103
II.2.2. Résultats de l'analyse quantitative..... 103
II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits 106

II.2.3.1. Capacité antioxydante totale (CAT) 106
II.2.3.2. Piégeage du radical libre DPPH :..... 107
II.2.3.3. Pouvoir réducteur du fer 110
II.2.3.4. Corrélation 112
III. Discussion 116
III.1. Rendement d'extraction 116
III.2. Criblage phytochimique 117
III.3. Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols 117
III.4. Activité antioxydante 119
III.4.1. DPPH..... 119
III.4.2. FRAP 121
III.5. Corrélations 121
IV. Conclusion..... 122
Chapitre III : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux de *Vitex agnus castus L*. et de *Cymbopogon nardus L* 123
I. Introduction..... 123
II. Résultats..... 123
II.1. Activité anti-inflammatoire..... 123
II.1.1. Voie orale..... 124
II.1.2. Voie cutanée 125
II.2. Activité analgésique..... 127
III. Discussion 128
IV. Conclusion..... 130
Chapitre IV : Exploration de l'effet diurétique des extraits aqueux de graines et des feuilles de Vitex agnus castus..... 131
I. Introduction..... 131
II. Résultats..... 132
II.1. Traitement aigu..... 132
II.1.1. Effet sur le débit urinaire 132
II.2. Traitement subchronique 132
II.2.1. Effet sur le volume urinaire 132
II.2.2. Effet sur l'excrétion des électrolytes..... 133
II.2.3. Effet sur les taux plasmatiques des électrolytes, de l'urée et de la créatinine..... 134
II.2.4. Effet sur la filtration glomérulaire 135
II.2.5. Effet sur l'osmolarité et la clairance de l'eau libre 136
III. Discussion 136
IV. Conclusion..... 138

Références Bibliographiques..... 143

Introduction générale

Introduction générale

Le stress oxydant résulte de la surproduction des radicaux libres. Le principal danger du stress oxydant, vient des dommages que les radicaux libres peuvent causer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants tels que l'ADN, Les protéines, les lipides. Ainsi, le stress oxydant est considéré comme une cause principale de plusieurs maladies comme les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson), cancer et maladies inflammatoires. De plus, Les antioxydants synthétiques utilisés dans les domaines agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques qui devaient apporter une solution au phénomène de stress oxydant sont suspectés d'avoir des effets toxiques et/ou cancérigènes à haute dose.

Ajouté au problème de stress oxydant, La résistance aux antibiotiques devient une grande menace pour la santé publique. Ainsi, selon un rapport de l'organisation mondiale de la santé, les infections nosocomiales chez les nouveaux- nés sont responsables de la mort d'un enfant toutes les cinq minutes à cause d'une bactérie résistante aux médicaments dans la région de l'Asie du Sud-est (Singh, 2016).. Les médicaments qui traitent les maladies mortelles perdent de plus en plus leur efficacité (Singh, 2016). D'autres médicaments synthétiques qui traitent plusieurs maladies y compris les maladies inflammatoires et rénales sont suspectés d'avoir un grand nombre d'effets secondaires, ce qui peut perturber l'homéostasie interne et influencer l'équilibre nécessaire pour une vie saine et normale.

La toxicité des antioxydants synthétiques, la résistance des microorganismes pathogènes aux /antibiotiques et les effets secondaires des médicaments synthétiques inquiétaient les chercheurs ces dernières années, et a poussé les différents laboratoires de recherche à explorer la nature pour découvrir et développer de nouvelles armes thérapeutiques efficaces, moins agressives pour l'organisme humain. Ainsi, la phytothérapie, qui propose des remèdes naturels à base d'extraits de plantes, peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates joignant l'efficacité scientifique prouvée et l'acceptabilité culturelle.

Grâce à sa position géographique entre l'océan Atlantique à l'Ouest et la mer Méditerranée au Nord, le Maroc est caractérisé par une grande diversité topographique et climatique, qui est à l'origine de la grande richesse floristique par rapport aux autres pays méditerranéens. Ajouté à cela, notre pays a constitué très tôt une terre de rencontre entre des populations d'origines diverses et un carrefour de civilisations. Ainsi, La pharmacopée traditionnelle marocaine s'est

enrichie de multiples recettes à base de plantes grâce aux différents apports des civilisations ayant été en contact avec le Maroc à travers l'histoire.

Notre contribution s'inscrit dans la démarche générale de notre laboratoire qui s'intéresse à la valorisation des plantes aromatiques et médicinales et l'exploration de leurs vertus thérapeutiques. Après un screening des activités de certaines espèces, nous avons opté pour l'étude des extraits volatils et non volatils de *Vitex agnus castus L et Cymbopogon nardus L* qui constituent deux espèces prometteuses dans le domaine de la recherche en termes d'activités biologiques et pharmacologiques qui restent peu étudiées au niveau du laboratoire.

Ce manuscrit comporte trois parties :

La première partie s'intéresse à une synthèse bibliographique sur les plantes aromatiques et médicinales, le stress oxydant, les infections nosocomiales, l'inflammation et la nociception, la diurèse et les diurétiques. Cette partie est achevée par une présentation des deux plantes étudiées.

La deuxième partie est consacrée au matériel et méthodes

La troisième partie présente les résultats et les discussions de ce travail, cette partie est devisée en quatre chapitres :

- ✓ Le premier chapitre se focalise sur l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles de *Vitex agnus castus L* et *Cymbopogon nardus L*, et sur l'évaluation de leurs activités antioxydante et antibactérienne.
- ✓ Le deuxième chapitre se rapporte sur les résultats du dosage de polyphénols, flavonoïdes et sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitex agnus castus L* et *Cymbopogon nardus L* obtenus par deux techniques différentes dites Soxhlet et macéré.
- ✓ Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux *Vitex agnus castus L* et *Cymbopogon nardus L*.
- ✓ Le quatrième chapitre présente les résultats de l'exploration de l'effet diurétique des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* sur un modèle animal ; les rats *Wistar albinos*.

On terminera ce travail de thèse par une conclusion générale donnant un récapitulatif sur les principaux résultats obtenus, ainsi que les perspectives qui feront l'objectif d'ultérieurs travaux.

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Plantes aromatiques et médicinales

I. Définition

Toute plante renferme un ou plusieurs principes actifs capables de guérir, soulager ou prévenir les maladies est appelée plante aromatique et médicinale. La phytothérapie constitue l'ensemble des soins faisant intervenir les drogues d'origine végétale (Bellakhdar, 2006, 1997a)**.**

L'utilisation des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans la civilisation chinoise se trouve des témoignages très anciens d'utilisation des plantes. Le premier ouvrage qui s'intéresse à la pharmacopée traditionnelle chinoise a été rédigé par l'empereur Shen Nong (2739-2697 av. JC), contenait la liste d'un grand nombre de remèdes à base de plantes (Duraffourd and Cilapraz, 1978)**.** Les Grecs, les Perses, les indiens, les romains et les Egyptiens exploitaient les propriétés des extraits de plantes et leurs diverses vertus médicinales.

Le Maroc par sa diversité géographique et climatique, dispose d'une flore très variée (Sijelmassi, 1990), il est classé parmi les cinq pays du bassin méditerranéen les plus riches floristiquement (Quézel and Médail, 1995). Plusieurs facteurs contribuent à assigner à la médecine traditionnelle un parfait enracinement dans la société marocaine y compris le facteur socioéconomique. Cependant, la posologie et la durée d'utilisation de ces plantes peuvent dans certains cas, exposer la santé humaine à des accidents graves.

II. Composition

La composition des plantes aromatiques est complexe. Elles sont constituées de deux fractions. La première est dite volatile est constituée de l'ensemble de métabolites secondaires qui composent l'huile essentielle. La deuxième fraction est constituée de composées non volatiles essentiellement les polyphénols, les flavonoïdes et les coumarines.

II.1. Composés volatils : Les huiles essentielles

II.1.1. Bref historique

L'histoire des huiles essentielles est associée à l'évolution des civilisations humaines. Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles (HE) datent de l'an 3000

avant l'ère chrétienne (Baser and Gerhard, 2015). Les Grecs, les Perses, les indiens, les chinois et les romains exploitaient leurs propriétés en parfumerie et leurs diverses vertus médicinales. En Egypte, l'utilisation de baumes et des résines aromatiques remonte à l'époque des pharaons: embaumement, momification et divers autres usages (Franchomme and Pénoël, 2007).

Avec la civilisation arabo musulmane, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne met au point le procédé d'extraction des HE par le processus d'entraînement à la vapeur d'eau ou hydrodistillation. Ce médecin arabo-musulman a également écrit de nombreux ouvrages médicaux consacrant une grande place aux HE (Baudoux et al., 2006). L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques y compris les huiles essentielles.

A la fin du 19eme siècle, le nombre de molécules identifiées n'a cessé d'augmenter grâce aux avancées scientifiques de la chimie qui ont aidé à extraire les composants des huiles essentielles, et éclaircir leur rôle thérapeutique (Bruneton, 2009). En France, le pharmacien français René-Maurice Gatte fossé est le précurseur de l'usage actuel des HE, il a utilisé le terme aromathérapie pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a découvert par accident, lors d'une explosion dans son laboratoire que la lavande a guéri une brûlure à sa main (Baudoux, 2008; Pacchioni, 2014).

À partir des années 1970, l'aromathérapie commence à se positionner en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation issue de la tradition. Ceci grâces aux travaux de recherches approfondies réalisées par des chercheurs et des médecins notamment les travaux de Jean Valnet qui codifia les propriétés, les indications et les posologies des huiles essentielles (Sophie, 2005).

De nos jours, l'orientation vers l'utilisation des huiles essentielles est devenue de plus en plus importante, que ce soit dans le domaine médical, alimentaire ou cosmétique.

II.1.2. Définition

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergente sur le fait que les huiles essentielles sont des produits de composition assez complexe, renferment des principes odorants volatils contenus dans les végétaux. L'Association Française de Normalisation, a défini les huiles essentielles en se basant sur leur méthode d'obtention. Selon l'AFNOR, « une huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après

séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, soit par distillation sèche ». (AFNOR, 2000) .

II.1.3. Caractéristiques physiques

Les HE présentent les caractéristiques physiques, d'être liquide à température ambiante, rarement visqueuse ou cristallisée, d'être volatile contrairement aux huiles grasses, et odorante. Elles sont insolubles dans l'eau, plus légère que l'eau pour la plupart et soluble entièrement dans les huiles grasses, partiellement dans les alcools à titre élevé et les solvants organiques. Elles sont de couleurs très variées (par exemple l'HE d'absinthe de couleur verte, l'HE de Camomille romaine bleue, l'HE de Cannelle de Ceylan rougeâtre) (V. Van Snick, 2012).

II.1.4. Biosynthèse

La chlorophylle constitue le point de départ de La biosynthèse des H.E. Elle se fait suivant deux principales voies : La voie des terpénoïdes et celle du phénylpropanoïdes (Bruneton, 1999a, 1993)

- **Voie des terpénoïdes :**

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires qui dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes : les monoterpénoïdes (C10) et les sesquiterpénoïdes (C15).

- **Voie des Phénylpropanoïdes**

Cette voie commence par un métabolite du fructose, le PEP (phosphoenolpyrivate). Elle aboutit à un très grand nombre d'acides aromatiques, importants en thérapeutique. Les plus importants sont : les acides salicylique, cinnamique et benzoïque et leurs esters dont le salicylate de méthyle, les cinnamates, les benzoates, certains phénols (eugénol) ainsi que les coumarines.

II.1.5. Localisation et rôles

Les huiles essentielles sont largement répondues chez les végétaux supérieurs. Cependant elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : conifères, rutacées,

ombellifères, myrtacées, labres. Elles peuvent être stockées dans tous les organes, les sommités fleuries, les feuilles, les rhizomes, les fruits, les écorces et les graines.

les huiles essentielles sont considérées comme des sources de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement : attraction des insectes pollinisateurs, action répulsive sur les prédateurs, protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsives contre les animaux herbivores , inhibition de la germination des graines, communication entre végétaux ; émission de signaux chimiques qui signalent la présence d'animaux herbivores par exemple (Gershenzon and Dudareva, 2007; Hassiotis, 2010; Unsicker et al., 2009).

II.1.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première : Son état originel et ses caractéristiques, sa nature proprement dite. Le rendement « HE/matière première végétale » peut être extrêmement variable selon les plantes (Desmares et al., 2008)**.** Les huiles essentielles sont extraites par plusieurs méthodes :

a. L'hydro distillation

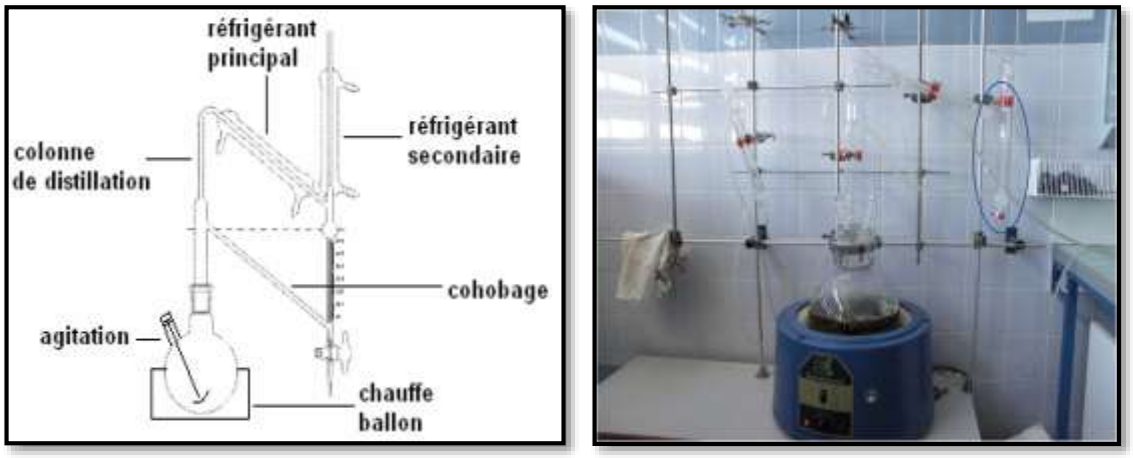


Figure I.1: Montage d'hydrodistillation (Clevenger).

Le principe de l'hydrodistillation (Fig. I.1) consiste à immerger la biomasse végétale dans un ballon rempli d'eau, que l'on porte ensuite à ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux (Bruneton, 1993).

b. Entraînement à la vapeur d'eau

Une technique ancienne qui consiste à récupérer l'huile essentielle contenue dans les différentes parties de la plante au moyen de la vapeur d'eau (Fig. I.2). La matière végétale est mise dans un ombilic dans lequel est injectée, la vapeur d'eau formée par un générateur. La vapeur d'eau libère les molécules odorantes en détruisant la structure des cellules végétales. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation (AFNOR, 2000; El Haib, 2011).

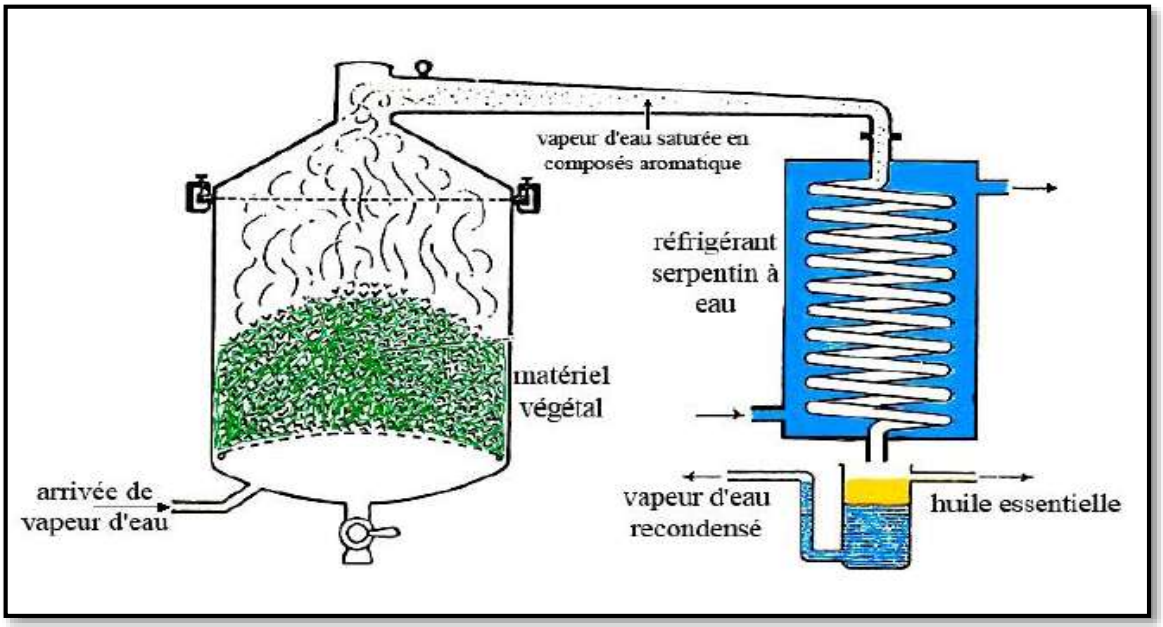


Figure I.2: Principe de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (El Haib, 2011).

c. L'expression à froid

C'est une technique physique surtout réservée aux agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. Les composés volatils ne subissent aucune modification (Chaintreau et al., 2003).

d. Extraction par solvants

Cette extraction est basée sur l'épuisement du matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition (pentane, hexane, éther de pétrole) qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite (Shellie et al., 2004).

e. Extraction par les corps gras

Technique appelée aussi l'enfleurage, c'est une méthode d'extraction utilisée dans le traitement des parties fragiles des plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Le principe consiste à mélanger des fleurs à des graisses afin d'obtenir une pommade florale, puis les huiles sont récupérées par extraction dans l'alcool (Besombes, 2009).

f. Extraction assistée par micro-ondes

Le montage obtenu se rapproche sensiblement d'un montage d'hydrodistillation classique. Le réacteur contenant seulement le matériel végétal est chauffé par les micro-ondes à l'intérieur du four, les vapeurs sont ensuite entraînées dans le col de cygne avant d'être condensées dans le réfrigérant puis recueillies dans un essencier. Les graines sont en permanence humides, ce qui ne laisse aucune chance à la réalisation d'éventuelles réactions secondaires, néfastes à la qualité du produit obtenu (Lucchesi, 2006).

g. Extraction par CO_2 supercritique

Dans cette technique, un courant de CO_2 à forte pression fait éclater les poches à essence, et entraine les H.E qui seront, ensuite, récupérées (Scimeca, 2007) .

II.1.7. Composition chimique des huiles essentielles

La composition d'une huile essentielle peut varier selon la localisation (tige, la feuille, l'écorce ou autres parties). Elle ne contient pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs. Sur le plan chimique, les HEs sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Il s'agit aussi de terpènes, composés aromatiques (phénols), et d'autres composés d'origine diverses (C. Marinier and Lobstein, 2013).

II .1.7.1. Les terpènes :

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, caractérisés par la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes et répondent à la formule générale $(C_5H_8)n$. les plus importants sont les monoterpènes et les sesquiterpènes (Fig. I.3) (Bakkali et al., 2008).

- **Les monoterpènes :** formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des HEs, parfois plus de 90% des huiles essentielles.

- **Les sesquiterpènes** : Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes, les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents.

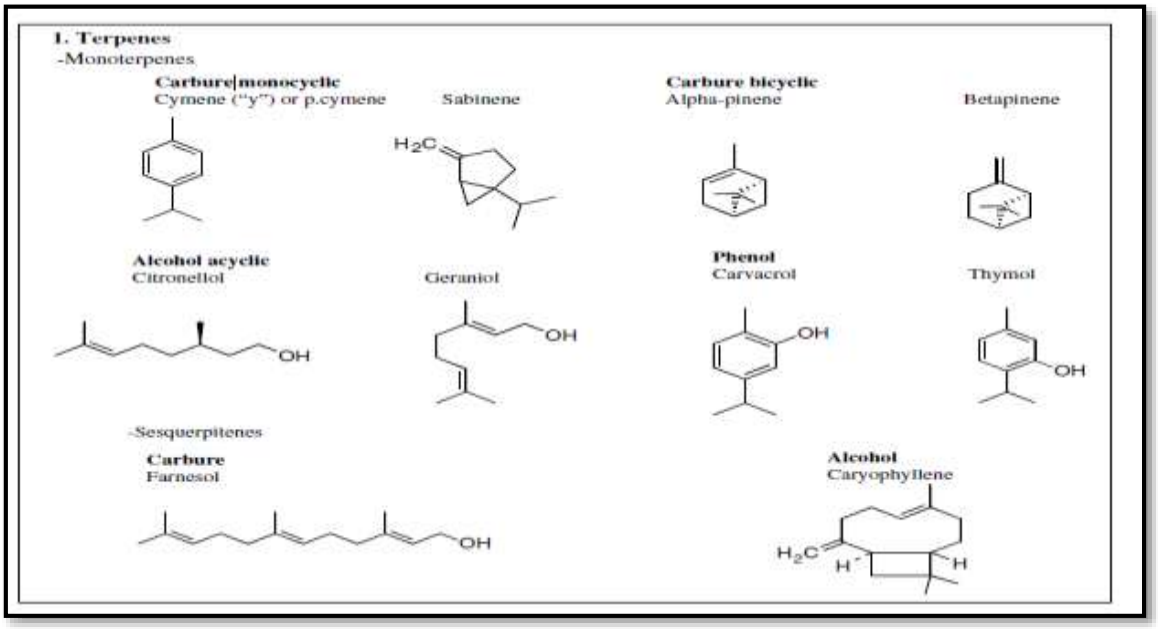


Figure I.3: Monoterpènes et sesquiterpènes

II.1.7.2. Les composés aromatiques :

Les composés aromatiques (Fig. I.4) sont moins abondants dans les huiles essentielles contrairement aux dérivés terpéniques. Il s'agit des drivés phénylpropane, qui sont responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles, nous pouvant citer à titre d'exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (Kunle et al., 2003).

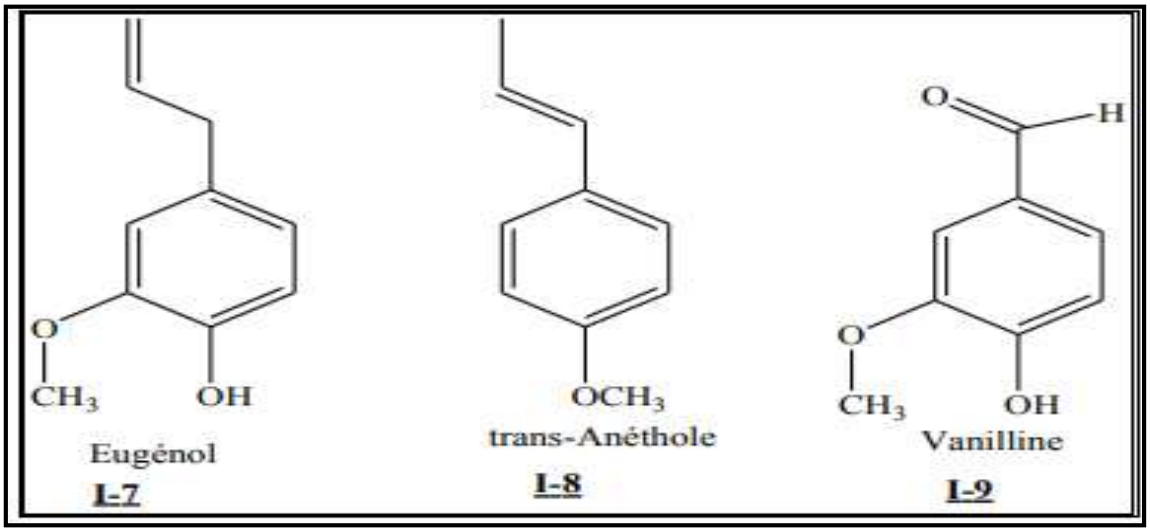


Figure I.4: Exemples de composés aromatiques

II.1.7.3. Les composés d'origine variée

De faibles quantités de composés acycliques non terpéniques et de poids moléculaires peu élevés peuvent se retrouver dans certaines HEs (alcools, aldéhydes, cétones, etc) (Jouhanneau, 1991) .

II.1.8. Facteurs influençant la composition d'une HE

Pour une même espèce botanique, La présence ou l'absence de certains constituants dépend de l'un ou la combinaison de 3 facteurs : le patrimoine génétique, l'âge et l'environnement de la plante. Selon Bruneton, 1993, la composition chimique d'une huile essentielle dépend de l'origine géographique, la famille botanique de la plante, l'organe producteur, le cycle végétatif, les facteurs environnementaux (la température, l'humidité, l'altitude , la latitude et la nature du sol), et le procédé d'extraction (l'acidité, la température, la durée d'extraction). Le mode de récolte, les conditions de transport, séchage et de stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques. D'autres facteurs tels que l'état du matériel végétal (frais ou sec) et les températures élevées du chromatographie en phase gazeuse peuvent contribuer aux changements de la composition des huiles essentielles (Bruneton, 1993; Lawrence, 1992).

II.1.9. Conservation des huiles essentielles

Une huile essentielle ne peut pas dépasser une année, sans subir d'importantes modifications physico-chimiques, par conséquent, la conservation des huiles essentielles est très délicate (Lobstein et al., 1983).

Une meilleure préservation de sa qualité nécessite le respect de certaines règles élémentaires de stockage : conservation sous atmosphère d'azote, utilisation de flacons propres de faibles volumes, et secs. Ces flacons peuvent êtres en aluminium vernissé, acier inoxydable ou en verre teinté de manière à le protéger de la lumière. Le stockage doit se faire à basse température. L'utilisation des flacons en plastique est à éviter en raison du risque d'interactions entre le produit et la matière plastique (Desmares et al., 2008; Morel, 2008).

Pour conserver une huile essentielle on peut y ajouter des substances capables d'interférer avec les réactions oxydantes comme l'acide citrique. Cette substance est fréquemment employée pour la conservation des huiles essentielles utilisées dans l'alimentation.

II.1.10. Analyses des huiles essentielles

La connaissance de la composition chimique de l'huile essentielle reste une étape importante et nécessaire, puisqu' ils constituent une matière première destinée à divers secteurs d'activités tels que la parfumerie, la cosmétique, l'industrie pharmaceutique et l'agroalimentaire. Plusieurs méthodes permettent L'analyse quantitative et qualitative de l'huile essentielle en utilisant des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques. Parmi ces méthodes on cite ; La chromatographie en phase gazeuse GC qui est utilisée pour l'analyse quantitative alors que la chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS est utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative (Lahlou, 2004; Lamarti et al., 1993). Ces deux techniques permettent, en plus de connaître très exactement la composition chimique, la recherche d'éventuelles traces de produits indésirables tels que les pesticides ou des produits chimiques ajoutés (Buchbauer, 2000).

II.1.11. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

a. Effet antioxydant

Les antioxydants sont des substances qui permettent aux cellules de lutter contre le stress oxydatif. Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles a été prouvé par plusieurs laboratoires de recherche. Ce pouvoir est dû à leur richesse en phénols et en polyphénols qui possèdent un groupement hydroxyle sur leur structure chimique (K. Alain, 1992). Récemment, certains chercheurs rapportent que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants de Synthèse (Hossain et al., 2008). Ainsi, ces huiles peuvent contribuer à préserver certains aliments des phénomènes d'oxydation, soit en les incorporant directement aux aliments (viandes hachées, yaourts) ou en les appliquant par vaporisation en surface de l'aliment (poulet, fruits et légumes entiers) (Caillet and Lacroix, 2007) .

b. Effet anti-inflammatoir

Les molécules aromatiques sont douées de propriété anti-inflammatoire et peuvent agir de différentes manières sur l'inflammation (Raymond, 2005). Certains aldéhydes favorisent les défenses anti-inflammatoires naturelles de l'homme. Les mécanismes d'action ne sont pas toujours élucidés. Toutefois, certains chercheurs ont récemment montré que les huiles essentielles de *Chromoleana odorata* présentaient des actions positives sur la fonction Cyclooxygénase de la Prostaglandine H-synthétase, qui intervient dans le processus inflammatoire (Bedi et al., 2010).

c. Effet antibactérien

Depuis l'antiquité, Les huiles essentielles ont été considérées comme des agents antimicrobiens très efficaces. Plusieurs chercheurs ont démontré que ces extraits volatils possèdent une forte activité antibactérienne, elles agissent contre un large éventail de bactéries (bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif), y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques (Burt, 2004). Cet effet antibactérien peut être soit bactéricide ou bactériostatique, et il est variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba and Kunicka, 2003; Oussou et al., 2004).

d. Effet antifongique

Des molécules aromatiques de nombreuses familles chimiques ont démontrées leur activité antifongique. Ainsi, Les phénols sont considérés comme étant les plus puissants, suivis par les alcools, cétones et éthers. Les huiles essentielles de thym, de citronnelle, de cannelle et de *Melaleuca alternifolia* ont montré une activité antifongique importante (Burt, 2004).

e. Effet antiparasitaire

Les phénols des huiles essentiels sont dotés d'une action antiparasitaire, Certains vers comme ascaris et Ténia sont sensibles aux huiles essentielles de *Thymus Vulgaris* (Carillon, 1985).

f. Effet insecticide et insectifuge

Certaines huiles essentielles sont connues par leur activité insecticide ou insectifuge, les huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* exercent un effet insecticide grâce à leur richesse en Citronellal (M. Shirner, 2004).

g. Effet antiviral

Les huiles essentielles constituent une véritable alternative pour traiter les pathologies virales. L'activité virucide de l'huile essentielle de thym vis-à-vis du virus de l' Herpes a été récemment démontrée (Goetz and Ghedira, 2012). L'huile essentielle d*'Hysope officinale* s'avère aussi intéressante dans le traitement des pathologies virales qui touchent les voies respiratoires (Pierron, 2014).

h. Effet anti-tumorale

L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant des cellules leucémiques HL-60 et K562 (de Sousa et al., 2004). L'huile essentielle de *Nigella sativa L* a démontré une activité cytotoxique in vitro contre différentes lignées tumorales (Mbarek et al., 2007).

i. Effet sur le système nerveux

Les huiles essentielles peuvent réguler le système nerveux central en exerçant un effet antispasmodique, un effet calmant et anxiolytique en favorisant le sommeil, et un effet antalgique (Mayer, 2012).

II.1.12. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont aujourd'hui omniprésentes dans notre quotidien grâce aux multiples propriétés exploitables qui leur permettent de trouver des applications dans des domaines très variés.

II.1.12.1 Industrie alimentaire

Les huiles essentielles sont très utilisées dans l'industrie alimentaire pour rehausser le gout, aromatiser et colorer les aliments (Pingot, 1998). Le domaine des boissons gazeux s'avère le plus grand consommateur des huiles essentielles (Garneau et al., 2005).

En vertu de leurs propriétés antioxydantes et antibactériennes, les huiles essentielles sont utilisées comme des agents naturels de conservation des aliments (Hammer et al., 1999). Certaines huiles comme celle du thym, peut protéger les denrées alimentaires contre les mycotoxines produites par un large spectre de champignons (Kumar et al., 2008).

II.1.12.2 Parfumerie et cosmétologie

En raison de leurs propriétés odoriférantes, les huiles essentielles constituent une matière première très recherchée par les parfumeurs particulièrement celles de rose et de jasmin. En cosmétologie, différentes huiles essentielles sont utilisées pour parfumer les produits cosmétiques tels que les dentifrices, les champoings, les crèmes solaires, les rouges a lèves et les savons (Naouel, 2015).

II.1.12.3 En pharmacie

L'industrie pharmaceutique emploie les huiles essentielles, soit comme base de médicaments : les collyres, les crèmes et les élixirs, soit comme aromatisant pour masquer le gout d'un principe actif (Kaloustian and H. Minaglou, 2013). Elles peuvent être également utilisées comme agent de perfusion percutané (Karande and Mitragotri, 2009). Toutes les préparations qui sont à base des huiles essentielles doivent répondre à la réglementation des médicaments à base de plante.

II.1.13. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont dotées d'innombrables vertus curatives. Néanmoins, il est important de souligner que l'automédication fréquente abusive (dosage et mode d'application) de ces essences végétales est néfaste pour l'organisme notamment chez les enfants et la femme enceinte, et peut engendrer des effets secondaires qui sont parfois toxiques ; Irritation de la peau, allergies, altération des hépatocytes, détérioration des néphrons, carcinome hépatique, neurotoxicose et avortement (Kaloustian and H. Minaglou, 2013).

II.2. Composés organiques non volatiles

II.2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques représentent un large groupe de métabolites secondaires solubles dans les solvants polaires (Bruneton, 1999a)**,** ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (Tige, racine, feuilles, graines). Les flavonoïdes, les tanins et les coumarines constituent les principales classes des composés phénoliques (Crozier et al., 2006).

II.2.1.1. Flavonoïdes

C'est la classe la plus représentatif des composés phénoliques. Tous les composés phénoliques possèdent le même squelette de base a 15 atomes de carbone, fait de deux phénols reliés par une chaines en C3 (Yao et al., 2004)**.** On distingue les flavonoïdes hétérosides qui sont hydrosolubles et solubles dans les alcools et les flavonoïdes solubles dans les solvants organiques généralement apolaires (Bruneton, 1999a)**.** Ils possèdent des propriétés intéressantes tel qu'un anticoagulant, antioxydant, antivirale et anticancéreux.

II.2.1.2. Tanins

Les tanins constituent un groupe de substances chimiques variées, caractérisées par une saveur astringente et qui peuvent être présents dans tous les organes de la plante (Scalbert, 1991). On distingue les tanins hydrosolubles qui contiennent un sucre dans leur structure et les tanins condensés qui ne possèdent pas de sucre dans leur structure (Bruneton, 1999a).

II.2.1.3. Coumarines

Les coumarines sont des composés issues du métabolisme du phénylalanine, caractérisés par l'odeur du foin (Cowan, 1999). Ils se trouvent dans la nature à l'état libre ou combiné avec le sucre. Les coumarines de différents types possèdent des propriétés biologiques intéressantes comme cytotoxiques, antivirales et hypotensives.

II.2.2. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels dérivés de l'isoprène (C_5H_8), de formule chimique $(C_5H_8)_n$, Ils sont classés selon le nombre d'unité isoprène en monoterpènes (n=2), sesquiterpènes (n=3), diterpenes (n=4), sesterpènes (n=5), et les Triterpènes (n=6) (Bruneton, 1999a).

II.2.3. Alcaloïdes

Ce sont des composés azotés, complexes, de nature basique et insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques. Certains alcaloïdes peuvent avoir une activité hypoglycémiante, anticancéreuse, antalgique, antidépresseur et sédative, bien qu'ils risquent de provoquer des effets toxiques s'ils sont utilisés avec des doses élevées.

II.2.4. Saponines

Les saponines sont des composés non-volatils, qui sont principalement distribués dans le règne végétal (Vincken et al., 2007). Elles doivent leur nom au fait qu'elles forment dans l'eau une solution moussante.

De nombreuses revues rapportent que les saponines sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne des plantes, (Waller, 1996 ; Osbourn, 1996) . Les saponines trouvent également de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie cosmétique en raison de leur propriété moussante et émulsifiante. Les applications des

saponines s'étendent au domaine de l'agriculture pour l'assainissement des sols (Chen et al., 2008) et comme des pesticides naturels (Chapagain et al., 2007).

Chapitre II : Stress oxydatif

I. Définition

Dans les systèmes biologiques, des molécules pro-oxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène sont produites quotidiennement. Cependant, cette production est contrôlée par les antioxydants (Fig. I.5). A l'état physiologique, la balance oxydants/antioxydants est en équilibre. Toutefois, un apport excessif endogène ou exogène des ERO, ou une défaillance des défenses antioxydantes, peut déséquilibrer cette balance en faveur des pros oxydants, c'est ce qu'on désigne par le terme stress oxydatif ou stress oxydant (Dickinson and Forman, 2002; Morel and Barouki, 1999).

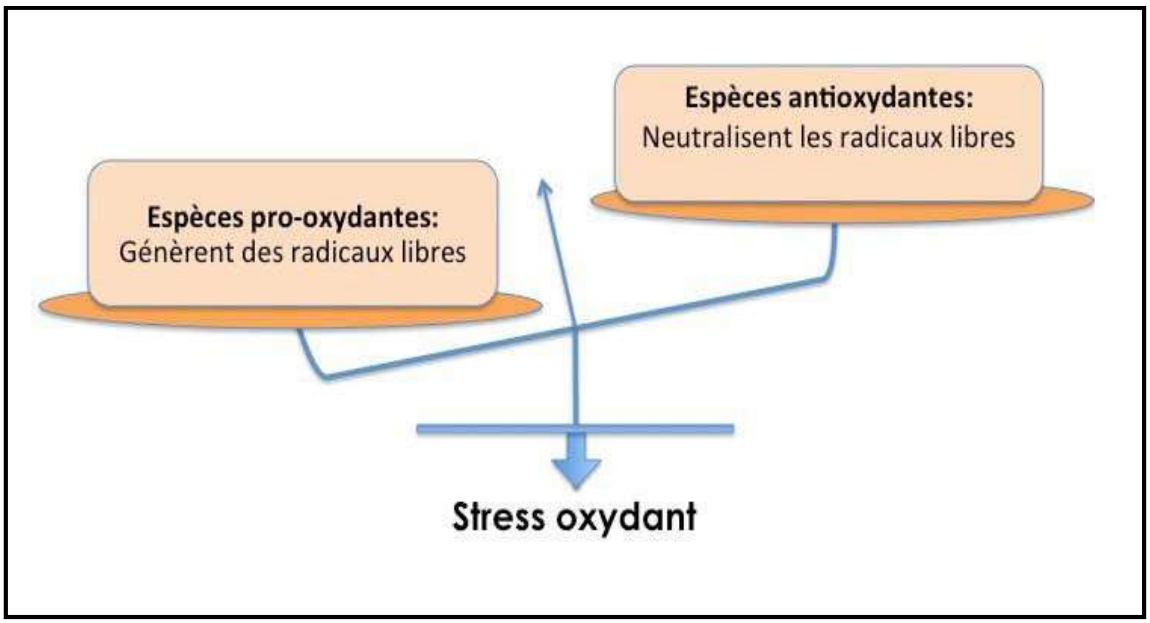


Figure I.5: Stress oxydant

II. Radicaux libres et espèces réactives d'oxygène

Un radical libre est une molécule ou un atome caractérisé par une instabilité et un pouvoir oxydant fort, possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche électronique la plus externe (Vansant, 2004). Cela lui confère une grande réactivité et une courte demi-vie En effet, l'électron célibataire du radical libre aura toujours tendance à s'apparier avec un autre électron, pour que la molécule devienne stable via une réaction d'oxydation (Fig. I.6). (Goudable and Favier, 1997).

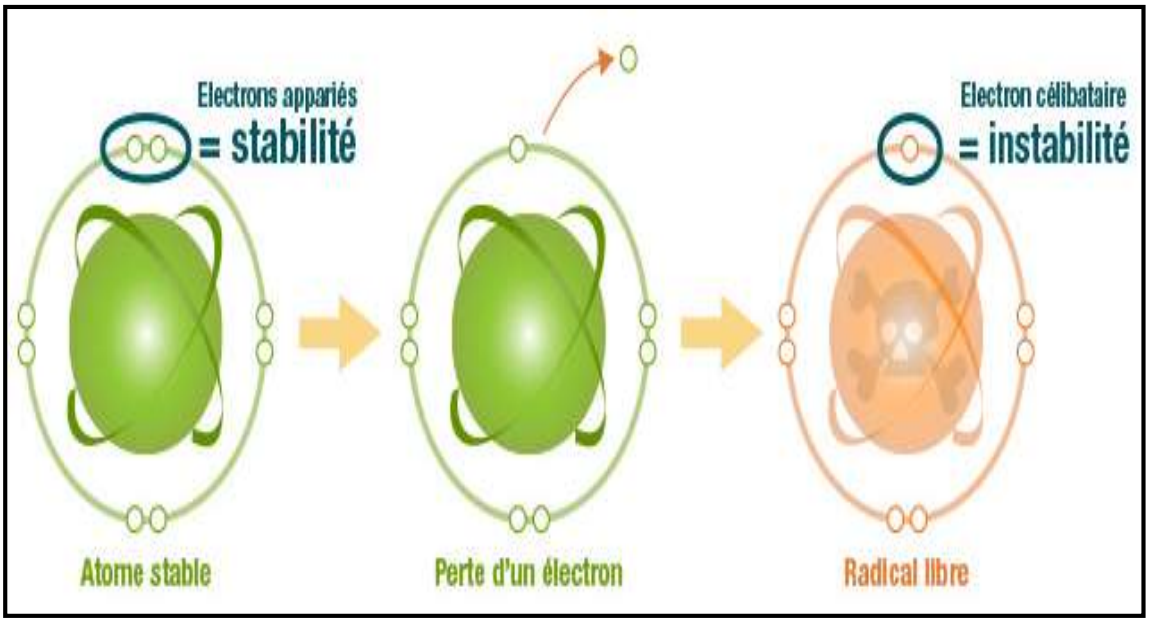


Figure I.6: Formation des radicaux libres

Les espèces réactives d'oxygène est une famille de molécules responsables du stress oxydant qui regroupe les radicaux libres (anion superoxyde (O_2•), le radical hydroxyle (OH•)) et des espèces oxygénées comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, le dioxygène singulet ($^1O_2$), le peroxynitrite ONOOH et les oxydes d'azote NO•.

Les ERO sont formées en permanence par l'organisme au cours du métabolisme basal, en quantité limitée, soit comme déchet de la respiration cellulaire au niveau de la mitochondrie, soit pour accomplir un rôle précis. En effet, les phagocytes (monocytes, neutrophiles, macrophages et éosinophiles) produisent une quantité importante des radicaux libres au cours de la phagocytose, qui servent à défendre l'organisme contre les agressions bactériennes et virales. D'autres ERO interviennent dans les processus inflammatoires comme des médiateurs régulant la vasodilatation capillaire. L'apoptose est un processus qui fait aussi intervenir des radicaux libres (Favier, 2003; Holevinsky and Nelson, 1995).

III. Origine du stress oxydant

Les espèces réactives d'oxygène sont produites par divers mécanismes physiologiques, ils contribuent au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire à dose raisonnable. Lorsque la quantité d'ERO générée dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme, par défaut du système de régulation, on parle de stress oxydant**.**

Un grand nombre de mécanismes endogènes (origine génétique) et exogènes (les métaux lourds, les rayonnements ionisants, les agents infectieux, rayons ultra-violets et la fumée de cigarette) peuvent déclencher la production excessive des ERO (Tamer, 2003). Lorsque l'homéostasie réd/ox est perturbée, tous les tissus et leurs composants peuvent être touchés.

IV. Conséquences du stress oxydant

Le principal danger du stress oxydant, vient des dommages que les radicaux libres peuvent causer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants tels que :

L'ADN : Une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. L'oxydation peut toucher les bases azotées particulièrement la guanine. Le radical hydroxyle peut aussi viser le sucre causant ainsi des dommages oxydatifs qui peuvent aboutir à une mutagenèse et une perturbation des processus de réplication, de transcription et de traduction (Cardey, 2009; Favier, 2003).

Les protéines : les acides aminés constitutifs des protéines sont susceptibles d'être oxydés par les espèces réactives d'oxygène (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydations peuvent être classées en deux types :

- Des réactions qui modifient les chaines peptidiques en cassant les liaisons peptidiques.
- Des réactions de modifications de peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

Ces attaques radicalaires conduisent généralement à une perte de fonction catalytique et structurale des protéines affectées, qui deviennent très sensibles aux protéases. Les protéines oxydées deviennent hydrophobes, par suppression des groupements amines ionisables ou par extériorisation des zones hydrophobes et constituent des amas qui, une fois associés aux lipides, forment des dépôts de lipofuschins caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).

Les lipides : les lipides constituent des cibles privilégiées des ERO, principalement ceux présents dans les membranes cellulaires ainsi, Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'instauration (Hulbert, 2005; Pamplona et al., 2000). Ce qui conduit à la modification de la fluidité, la perméabilité et l'excitabilité cellulaire, le fonctionnement des récepteurs et par conséquence à la mort cellulaire. Cette attaque des lipides peut aussi concerner les lipoprotéines circulantes ce qui aboutisse à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées

qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Esterbauer et al., 1992).

Les glucides : Les espèces réactives de l'oxygène peuvent agir essentiellement sur les protéoglycanes du cartilage. Ce qui peut aboutir à la fragilisation des parois et la rétinopathie chez les personnes diabétiques (Favier, 2003).

Aujourd'hui, il est admis que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans l'étiologie de plusieurs maladies soit comme facteur déclenchant ou comme facteur lié au complication de l'évolution, y compris les maladies neurodégénératives, comme Alzheimer (Smith et al., 1996), parkinson (Bolton et al., 2000), les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Jha et al., 1995). Les radicaux libres interviennent également dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme p53, entrainant ainsi les cancers (Favier, 2003).

V. Antioxydants et système de défense

V.1. Antioxydants

Le terme antioxydant désigne toute substance qui, présente à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, peut significativement ralentir ou empêcher l'oxydation de ce substrat. Ce sont des molécules qui réagissent avec les radicaux libres afin qu'ils deviennent inoffensifs (Halliwell, 1994). D'après la littérature, il existe deux principaux systèmes de défense antioxydants : Enzymatiques et non enzymatiques).

V.2. Système de défense enzymatique

Notre organisme possède un système enzymatique endogène de défense contre les radicaux libres, il est constitué de trois enzymes :

La Superoxyde dismutase (SOD) : Elimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation (Borg et al., 2004).

$$2O_2^{-\bullet} + 2\mathrm{H}^+ \xrightarrow{\mathrm{SOD}} \mathrm{H_2O_2} + \mathrm{O_2}$$

Gluthation peroxydase : Elle catalyse l'élimination de H_2O_2 et aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol (Ganther, 1999).

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + H_2O$$

La catalase : Elle assure la transformation de deux molécules de peroxyde d'hydrogène en simple molécule d'eau et en oxygène qui sont plus stable, selon la réaction suivante (Borg et al., 2004).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Cat} H_2O + O_2$$

V.3. Système de défense non enzymatique

Ce système inclut deux catégories d'antioxydants qui sont capables de neutraliser un radical libre par molécule :

Des antioxydants liposolubles : tels que les caroténoïdes, les vitamines E et C, qui agissent au niveau des membranes et des lipoprotéines circulantes.

Des antioxydants hydrosolubles : l'acide urique, les protéines, et les polyphenols qui assurent une protection du milieu intra et extracellulaire (Naouel, 2015).

V.4. Antioxydants de synthèse

Ajouté aux antioxydants produits par l'organisme pour sa défense contre les ERO, il existe des molécules de synthèse qui sont dotés de propriétés antioxydantes dont les squelettes sont souvent dérivés de substances naturelles. Le butylhydroxytoluène (BHT) (Fig. I.7) et le butylhydroxyanisole (BHA) (Fig. I.8) sont les antioxydants de synthèse les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Babu et al., 2013).

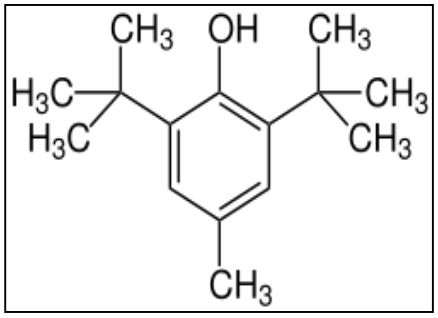


Figure I.7: Butylhydroxytoluène (BHT)

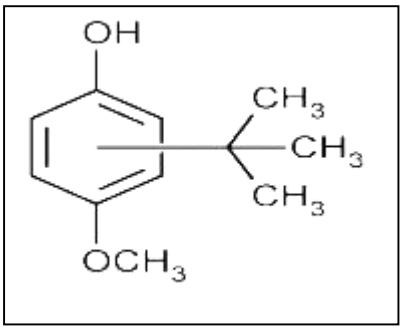


Figure I.8: Butylhydroxyanisole (BHA)

Plusieurs d'études ont montré que le BHT et le BHA sont toxiques et/ou cancérigènes à haute dose (Grice, 1988, 1986) . Leur utilisation est donc limitée dans plusieurs pays en raison de ses effets indésirables sur la santé humaine. Par conséquent, de grands laboratoires spécialisés s'orientent vers la recherche d'antioxydants d'origine naturelle. Les plantes représentent une

source très riche en antioxydants naturels tels que les flavonoïdes et les polyphénols, qui peuvent servir d'alternative aux antioxydants synthétiques parce qu'ils sont biodégradables en produits non toxiques (Kayano et al., 2002; Lim et al., 2002)

.

Chapitre III : Infections nosocomiales néonatales

I. Infections nosocomiales : définition et prévalence

Les infections nosocomiales dites aussi « infections hospitalières » sont définies par le National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) comme un état, localisé ou systémique qui résulte de la réaction défavorable de l'organisme due à la présence d'un agent infectieux ou sa toxine et qui n'était ni présent ni en incubation au moment de l'admission du patient. Un délai d'au moins 48 heures après admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire (Garner et al., 1988)**.**

Ces infections contribuent de manière importante à la morbidité et à la mortalité chez des patients hospitalisés. En effet, D'après une enquête réalisée par l'OMS sur la prévalence des infections nosocomiales dans 55 hôpitaux de 14 pays d'Asie de sud Est, Europe, méditerranée orientale et pacifique occidentale, 8,7% des patients hospitalisés étaient touchés par une infection nosocomiale. Selon le même rapport, Les infections nosocomiales les plus fréquentes sont celles du site opératoire, les infections urinaires et les infections respiratoires basses (OMS, 2002). La prévalence maximale des infections nosocomiales s'observe dans les unités de soins intensifs, elle peut atteindre 51% selon une étude internationale sur la prévalence des infections nosocomiales en soins intensifs (EPIC II) (Vincent et al., 2009).

II. Infections nosocomiales néonatales

II.1. Prévalence

Chez les nouveau-nés, et en particulier les prématurés, la résistance aux infections est amoindrie à cause du système immunitaire affaibli, ce qui les rend plus vulnérables aux infections nosocomiales. La prévalence de ces dernières dans les unités de soins intensifs néonatales est élevée elle varie entre 3,5% et 12% dans les pays à revenu élevé, tandis qu'elle varie entre 5,7% et 19,1% dans les pays à revenu moyen et faible. (Aujard et al., 2000; Nagata et al., 2002), La fréquence des infections nosocomiales globales dans les pays à faible revenu est trois fois plus élevée que dans les pays à revenu élevé, alors que cette incidence est 3 à 20 fois plus élevée chez les nouveau-nés (Nejad et al., 2011) . Selon une étude canadienne, 40% des infections nosocomiales recensées en pédiatrie étaient regroupées dans quatre types de

services : Hémato-oncologie, neurochirurgie, unités de soins intensifs néonatals et réanimation pédiatrique polyvalente ou une forte incidence a été observée (Stein and Trevino, 1994).

Au Maroc, une étude a été réalisée en 2003 concernant l'infection nosocomiale chez le nouveau-né dans l'unité de soins intensif à l'hôpital d'enfants Adberrahim Harouchi CHU Ibn Rochd à Casablanca, a rapporté que Le taux d'incidence de l'infection nosocomiale été de 7,5% et la densité d'incidence était de 7,1 pour 1000 jours d'hospitalisation (Chemsi et al., 2013). Cette densité est plus élevée en réanimation mixte pédiatrique et néonatale à l'hôpital mère enfant, CHU Mohammed VI à Marrakech, elle est de l'ordre de 21,9 % (Maoulainine et al., 2014). Le taux d'incidence a été évalué à 26% avec une densité d'incidence de 64 pour 1000J d'hospitalisation, dans une étude qui a été réalisée sur les patients admis à l'unité de réanimation néonatale du CHU Hassan II a Fès, ayant séjourné 48H ou plus entre le 1er janvier et le 31 décembre 2009 (El hammoumi, 2011).

II.2 Sites d'infections et germes responsables

Chez l'enfant, les sites anatomiques les plus touchés par l'infection nosocomiale sont : le système sanguin, les voies respiratoires et l'appareil urinaire. En général, ce sont les bactériémies et les pneumopathies qui constituent les deux principales localisations des infections nosocomiales en réanimation pédiatrique (Chemsi et al., 2013; El hammoumi, 2011; Maoulainine et al., 2014).

Des agents pathogènes très divers peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales. Ils varient d'un établissement de santé à l'autre et d'un pays à l'autre. Ils appartiennent à la flore hospitalière composée de la flore des malades et du personnel hospitalier ainsi que des germes de l'environnement qui existent sur le sol, les objets, les conduits d'eau, les circuits de climatisation. (Mireya et al., 2007). Ce sont :

a. Bactéries

Elles constituent 90 % des micro-organismes impliqués dans les infections nosocomiales (Mireya et al., 2007; OMS, 2002).

Bactéries à Gram négatif :

- Les entérobactéries (par *exemple Escherichia coli, Klebsiella, Proteus, Enterobacter, Serratia marcescens*) peuvent provoquer des infections graves (infection du site opératoire,

infection pulmonaire, bactériémie, infection du péritoine). Elles peuvent également être hautement résistantes.

- Pseudomonas sont des microorganismes gram négatif, qui se multiplient sur des surfaces humides et qui peuvent facilement colonoser les voies digestives chez les patients hospitalisés.

Bactéries à Gram positif :

- *Staphylococcus aureus* est L'espèce la plus importante du genre staphylococcus, c'est une bactérie cutanée qui colonise la peau et le nez du personnel hospitalier et des patients et peut provoquer un ensemble d'infections, pulmonaires, osseuses, cardiaques et sanguines et résiste fréquemment aux antibiotiques.
- Les streptocoques sont également des agents pathogènes importants, en particulier *Streptococcus pneumoniae* qui est responsable de pneumopathies et de méningites.

b. Virus

Outre les bactéries, les virus constituent également une cause importante d'infections nosocomiales. Ainsi, 5% de toutes les infections nosocomiales sont dues à des virus (Lemsanni, 2016). Ils peuvent être transmis par la bouche, les voies respiratoires ou par la voie orale fécale-orale (Aitken and Jeffries, 2001). Les services de pédiatrie sont les plus affectés par le virus respiratoire syncytial, c'est un virus très contagieux et responsable des épidémies nosocomiales (Ducel et al., 2002). D'autres virus comme ceux des hépatites B et C, le cytomégalovirus, le rotavirus et le virus de l'immunodéficience humaine sont également responsables d'infections nosocomiales du fait qu'ils sont transmissibles dans les liquides biologiques (M. C. Cloupet et al., 2014; Mireya et al., 2007; OMS, 2002).

c. Champignons et parasites

Les deux genres de champignons qui sont fréquemment rencontrés sont Candida et Aspergillus, ils constituent des agents opportunistes qui provoquent les infections nosocomiales en cas de traitement prolongé avec les antibiotiques (Lachassinne et al., 2004). Certains parasites comme *Sarcoptes scabies* provoque régulièrement des flambées épidémiques dans les établissements de santé (OMS, 2002).

II.3. Resistance bactérienne

a. Définition

La résistance bactérienne aux antibiotiques est considérée comme le principal obstacle à la réussite d'un traitement contre les maladies infectieuses. C'est une caractéristique importante des infections nosocomiales en réanimation. Une souche est dite résistante lorsqu'elle supporte une concentration notablement plus élevée que celle qui inhibe la multiplication de la majorité des autres individus de la même culture, ou des autres souches de la même espèce. Il existe deux types de résistances : la résistance naturelle qui survient lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique, et la résistance acquise qui survient lorsque seulement quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique deviennent résistantes (Cunha, 1998; Khan et al., 2017).

b. Mécanismes d'antibioresistance

Pour résister face à un antibiotique, plusieurs mécanismes ont été élaborés par les bactéries, qui peuvent cibler directement les antibiotiques ou les différents mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances (Boyce, 1997; Dennesen et al., 1998; Mainardi and Gutmann, 1998; Yoshikawa, 1998).

- ***Modification de la cible de l'antibiotique***

Ce mécanisme rend l'antibiotique incapable de se lier correctement et exercer son activité au niveau de la bactérie, soit par mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible, ou par l'acquisition du matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique.

- ***Inactivation enzymatique de l'antibiotique***

Les bactéries peuvent également détruire ou modifier l'antibiotique par une inactivation enzymatique l'empêchant alors de reconnaître sa cible. Elle représente le principal mécanisme de résistance contre les bêta-lactamines, les macrolides, le chloramphénicol et les aminosides.

- ***Diminution de la perméabilité de la cible***

Ce dernier mécanisme contribue à diminuer la concentration d'antibiotique en contact avec la cible : Ce phénomène peut avoir lieu par modification des composants de la paroi (porines) qui réduisent la vitesse de diffusion des antibiotiques et/ou par leur expulsion de manière active vers le milieu extracellulaire via des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux.

Plusieurs facteurs peuvent favoriser l'apparition de la résistance bactérienne, qui reflète une faculté remarquable chez les microorganismes de se protéger contre les antibiotiques en développant des mécanismes de résistance. L'utilisation excessive des antibiotiques est la cause principale de l'apparition des souches résistantes. D'autre part, un usage inadéquat des antibiotiques pour le traitement des infections virales a des doses trop faibles ou trop élevées, sur de courte ou de logues durée contribuent à l'émergence de souches résistantes (Prevention, 1997). Le non respect des directives de lutte contre les infections et les mesures d'hygiène inappropriées dans les hôpitaux, favorisent aussi ce phénomène de résistance bactérienne (Favier, 2003; Rybak, 2004). Ainsi, des souches multi résistantes de Klepsiella et de *Pseudomonas aeruginosa* sont prévalents dans de nombreux hôpitaux au niveau international. Cette situation est particulièrement critique dans les pays en voie de développement ou les antibiotiques de seconde intention, plus chers peuvent ne pas être disponibles ni financièrement accessibles (OMS, 2002).

II.4. Diagnostic de l'infection nosocomiale

Généralement, Le diagnostic des IN s'effectue en se basant sur des données cliniques, radiologiques, biologiques et microbiologiques (Monnet, 2012). En néonatalogie, les nouveaux nés et surtout les prématurées, sont considérés comme des patients à haut risque d'infections nosocomiales. Poser un diagnostic précoce d'infection nosocomiale en réanimation néonatale reste difficile mais indispensable. Les signes cliniques chez les nouveaux nés sont non spécifiques. Ainsi, toute aggravation inexpliquée de l'état d'un enfant hospitalisé doit faire suspecter une infection nosocomiale. Le diagnostic est confirmé le plus souvent par des prélèvements bactériologiques, en particulier l'hémoculture qui permet d'identifier les pathogènes responsables des infections, et de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques afin de choisir un traitement ciblé et adapté à chaque cas (Chemsi et al., 2013).

II.5. Impact des infections nosocomiales néonatales

Les infections nosocomiales constituent une des causes majeures de décès, Elles sont responsables de 4%–56% de décès chez les nouveau-nés, avec un taux d'incidence de 75% en

Asie du Sud-est et en Afrique subsaharienne (WHO, 2016)**.** Leur coût économique est considérable, il est dû principalement à la prolongation du séjour à l'hôpital des patients infectés qui est augmentée a 4 jours en moyenne (Monnet, 2012). Un séjour prolongé augmente les coûts directs sur les organismes qui prennent en charge le paiement et les coûts indirects dus aux médicaments et aux tests supplémentaires, ainsi que la charge du travail du personnel qui se trouve augmentée (OMS, 2002)**.**

II.6. Prévention des infections nosocomiales

Des mesures de prévention doivent être mises en place pour diminuer l'incidence des infections nosocomiales. Cela implique un travail multidisciplinaire et transversal au sein des établissements de santé afin de prévenir la transmission de germes potentiellement pathogène. Un certain nombre de pratique doivent êtres appliqués :

- **Hygiène du personnel soignant** : Lavage des mains avant et après tout contact avec le patient par une solution hydro alcoolique, le port des gants et d'une tenue professionnelle.
- **Hygiène de l'environnement :** consiste à un entretien quotidien des locaux d'hospitalisation par le nettoyage, et la désinfection des eaux, des surfaces et de l'air par des méthodes adéquates.
- **Hygiène de l'instrumentation :** stérilisation et désinfection du matériel utilisé.
- **Hygiène du patient** : consiste à limiter la durée d'hospitalisation et a un usage optimal des anti-infectieux (Lemsanni, 2016; OMS, 2002).

Chapitre IV : Inflammation et nociception

I. Inflammation

I.1. Définition

L'inflammation ou la réaction inflammatoire est une réponse immunitaire naturelle de l'organisme qui se développe suite à une lésion tissulaire ayant pour origine différents facteurs physicochimiques (irradiations, brulure, piqûre d'insecte traumatismes mécaniques…) ou des infections microbiennes. L'inflammation est un mécanisme mis en jeux afin d'éliminer l'infection et réparer les tissus lésés, elle se manifeste par quatre signaux cardinaux : Rougeur, Gonflement, Chaleur et Douleur (Diebold et al., 1995; Libby, 2007).

La réaction inflammatoire est divisée en trois phases (Canaud et al., 2003).

• **Une phase d'initiation** qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires.

• **Une phase d'amplification** avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires.

• **Une phase de résolution** et de réparation qui a pour but la restauration du tissu agressé.

I.2. Types d'inflammation

Selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire, l'inflammation est classée en deux catégories (Mansour, 2015).

- **Inflammation aiguë :** L'inflammation aigüe est une réponse physiologique immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), qui implique la participation de l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement. Cependant, elles peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est prononcée (Serhan et al., 2010)**.**
- **Inflammation chronique :** L'inflammation chronique est définie comme une inflammation qui ne peut pas guérir spontanément et qui évoluent en persistant ou en s'aggravant pendant une

durée étalée sur des mois ou des années. On peut citer deux causes majeures de survenue des inflammations chroniques :

✓ Les inflammations aiguës qui évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même tissu.

✓ Les inflammations peuvent parfois se manifester du premier coup sous une forme chronique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes ou La phase aiguë est passée inaperçue car elle est brève ou asymptomatique (Nourshargh et al., 2006; Rankin, 2004).

I.3. Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire stimule la libération de divers médiateurs inflammatoires qui interviennent dans les différentes étapes de l'inflammation. Ces médiateurs peuvent être devisés en médiateurs plasmatiques et médiateurs cellulaires.

I.3.1. Médiateurs plasmatiques

- **Les kinines**

Ce sont des polypeptides plasmatiques dont la plus active est la bradykinine, qui favorise la vasodilatation et la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscles lisses et la libération des prostaglandines.

- **Le système du compliment**

Un groupe de protéines qui interviennent dans le processus inflammatoire, et plus particulièrement les facteurs C3 et C5. La fraction C3a Provoque la dégranulation des mastocytes et la fraction C5a Provoque la dégranulation des mastocytes et des neutrophiles, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse.

- **Les facteurs de coagulation**

La fibrine formée à partir du fibrinogène, qui intervient dans la formation du caillot sanguin.

I.3.2. Médiateurs cellulaires

- **Les amines vasoactives**

La sérotonine libérée par les Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes, stimule les fibres lisses vasculaires et la disjonction des cellules endothéliales (Capron, 1998).

L'histamine, libérée par les Mastocytes et les plaquettes, Cette molécule augmente la perméabilité vasculaire et le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles (Janeway and Murphy, 2003).

- **Prostaglandines et leucotriènes**

Synthétisées à partir de l'acide arachidonique, interviennent dans le processus de l'inflammation aigue et chronique en augmentant la vasodilatation et la perméabilité capillaire. De plus les prostaglandines potentialisent l'effet de la sérotonine et la bradykinine (Male et al., 2007; Rankin, 2004).

- **Cytokines**

Un ensemble de protéines synthétisées par les plaquettes, les fibroblastes, les lymphocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, et les cellules épithéliales. Ils jouent un rôle essentiel dans les communications intercellulaires et notamment entre les médiateurs du processus inflammatoire (Capron, 1998).

- **Le PAF acéther : Facteur d'activation des plaquettes**

C'est un phosphoglycéride issu de la dégradation des phospholipides membranaires, joue le rôle de vasodilatateur qui augmente la perméabilité capillaire (Cavaillon, 2005).

I.4.Anti-inflammatoires

Un anti-inflammatoire est qualifié comme étant toute substance ou médicament destiné à traiter la réaction inflammatoire quelque soit son origine (Nardi et al., 2003). On distingue deux grandes classes des anti-inflammatoires.

I.4.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) constituent un groupe de médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques, très hétérogène de point de vue chimique mais ils ont tous le même mécanisme d'action (Fig. I.9). Ces médicaments diminuent la synthèse des prostaglandines qui sont directement impliqués dans l'inflammation, via l'inhibition de la cyclooxygénase (COX) (Blain et al., 2000).

I.4.2. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes, sont des dérivés synthétiques des hormones naturelles, tel que le cortisol et la cortisone, dont ils se distinguent par un pouvoir anti-inflammatoire plus important (Fig. I.9). Ces médicaments inhibent la libération de l'acide arachidonique via l'inhibition de la phospholipase A2. De plus, ils diminuent fortement la production de plusieurs médiateurs de l'inflammation tels que la sérotonine, l'histamine, la bradykinine et les cytokines (Bourin et al., 1993).

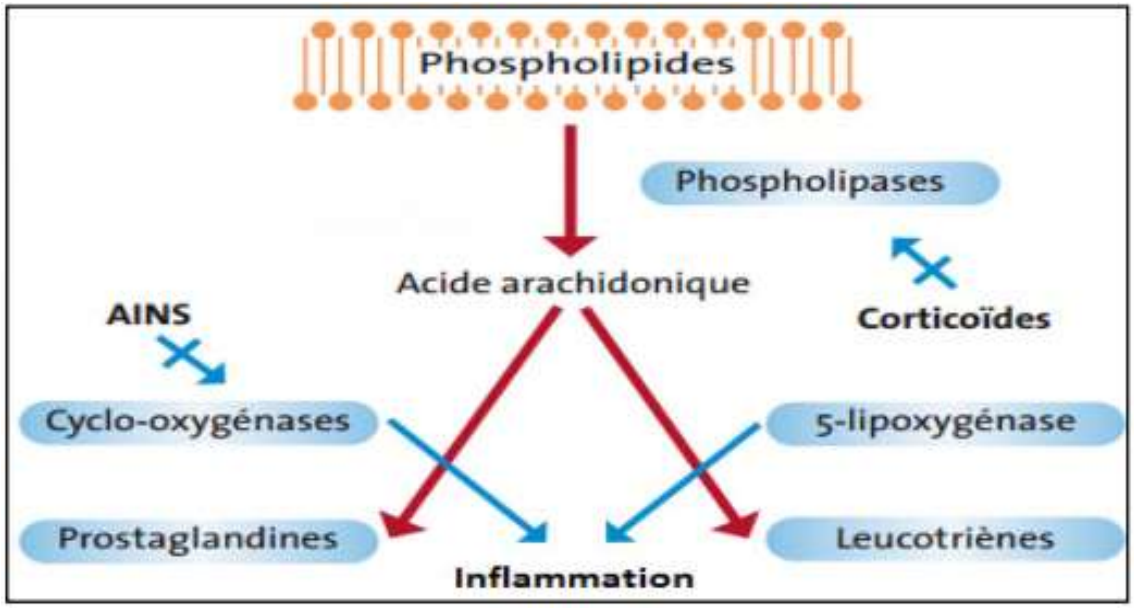


Figure I.9 : Mécanisme d'action des anti-inflammatoires (Turpin et Webber, 2012).

I.4.3. Effets Indésirables des anti-inflammatoires

L'usage des glucocorticoïdes est souvent associé à des effets secondaires indésirables tels que dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes, l'hypertension artérielle, l'euphorie avec insomnie et l'apparition d'ulcères gastro-duodénaux. Des troubles chroniques

peuvent aussi apparaitre tels que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003).

Comme pour les glucocorticoïdes, l'utilisation les anti-inflammatoires non stéroïdiens à long terme peut induire des effets indésirables comme les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale (Ouédraogo et al., 2012).

II. Douleur

II.1. Définition

Le terme de douleur désigne l'expression d'une expérience sensorielle et émotionnelle associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle. La douleur constitue un premier signal d'alarme d'un phénomène pathologique qui peut nuire à l'organisme. La nociception est une fonction défensive, c'est l'ensemble des phénomènes permettant l'intégration au niveau du système nerveux central d'un stimulus douloureux via l'activation des nocicepteurs (récepteurs à la douleur). (J. F. Payen, 2002).

II.2. Types de douleur

II.2.1. Douleur aiguë

La douleur aiguë est une douleur vive, immédiate, et généralement brève. Sa durée d'évolution est inférieure à trois mois La douleur aiguë a une valeur du signal d'alarme, de symptôme aidant au diagnostique.

II.2.2. Douleur chronique

La douleur chronique est définie par une durée d'évolution supérieure à trois mois ou six mois selon les auteurs. Par le fait même de sa persistance, une douleur qui était initialement un signal d'alarme peut se modifier et devenir une maladie en elle-même (Laroche, 2014).

II .3. Les antalgiques

Un antalgique ou analgésique est un médicament a action symptomatique qui attenue les sensations douloureuses. Il existe deux classes des antalgiques **:**

II.3.1. Les antalgiques morphiniques (opiacés)

Les opiacés sont des substances naturelles ou synthétiques dérivées de l'opium, largement utilisés pour traiter les douleurs modérées à sévères. Des effets secondaires immédiats peuvent être associés à une baisse de la tension, un ralentissement du rythme cardiaque, des nausées ou des vomissements, des vertiges, des sueurs, des démangeaisons, une rétention d'urines, une constipation et des spasmes abdominaux (Roulet et al., 2011).

II.3.2. Les antalgiques non morphiniques

Ces médicaments ont une action moine forte que celle des analgésiques morphiniques. Ils sont classés en trois groupes selon leur profil pharmacodynamique : les antalgiques purs qui sont seulement sédatifs de la douleur, les antalgiques dont l'effet est couplé à une action antipyrétique et les antalgiques anti-inflammatoires (Perrot et al., 2013).

Chapitre V : Diurèse et Diurétiques

I. Diurèse

I.1. Définition

Le mot diurèse est une contraction de "dia-", à travers, et "oûron", urine. C'est un processus physiologique capital qui permet l'excrétion du sel et de l'eau, l'élimination des produits terminaux du métabolisme et les substances étrangères, afin de maintenir le volume et l'osmolalité du compartiment extracellulaire constants. Il s'agit d'une fonction vitale puisqu'il maintient l'homéostasie interne (Lote, 2000; P. Hallouët and A. Borry, 2009).

I.2. Rappel de physiologie rénale

Les reins des mammifères exercent aussi bien des fonctions d'excrétion et de régulation des équilibres hydro-électrolytique et acido-basique, que des activités endocrine et métabolique essentielles à la vie de l'individu. De plus, ils sont caractérisés par une plasticité importante, leur permettant de s'adapter tant fonctionnellement que structurellement en réponse à des demandes accrues de l'organisme, de manière à assurer le maintien de l'homéostasie du milieu intérieur.

I.2.1. Structure

L'analyse anatomique du rein montre qu'il est constitué d'une population d'organites élémentaires, les néphrons. Chaque rein contient environ un million de néphrons, dont chacun est constitué d'un glomérule, siège de l'ultrafiltration du plasma sanguin (formation de l'urine primitive) et d'un tube urinifère. Ce dernier, subdivisé en plusieurs segments (tube contourné proximal, anse de Henlé et tube contourné distal) présentant des structures anatomiques, cellulaires et fonctionnelles différentes, et qui contribuent progressivement à l'élaboration de l'urine définitive. Plusieurs néphrons sont reliés à un tube collecteur. A leur tour, les tubes collecteurs fusionnent pour former un conduit papillaire (figure I.10) (Masson, 2009).

I.2.2. Fonction

Le néphron, unité fonctionnelle du rein, remplit trois fonctions essentielles : filtration glomérulaire, réabsorption et sécrétion tubulaires.

a. Filtration glomérulaire

L'ultrafiltration du plasma circulant dans les capillaires glomérulaires aboutit à la formation de l'urine primitive. Ce liquide dépourvu de cellules, contient toutes les substances du plasma (à l'exception des protéines) avec des concentrations pratiquement identiques.

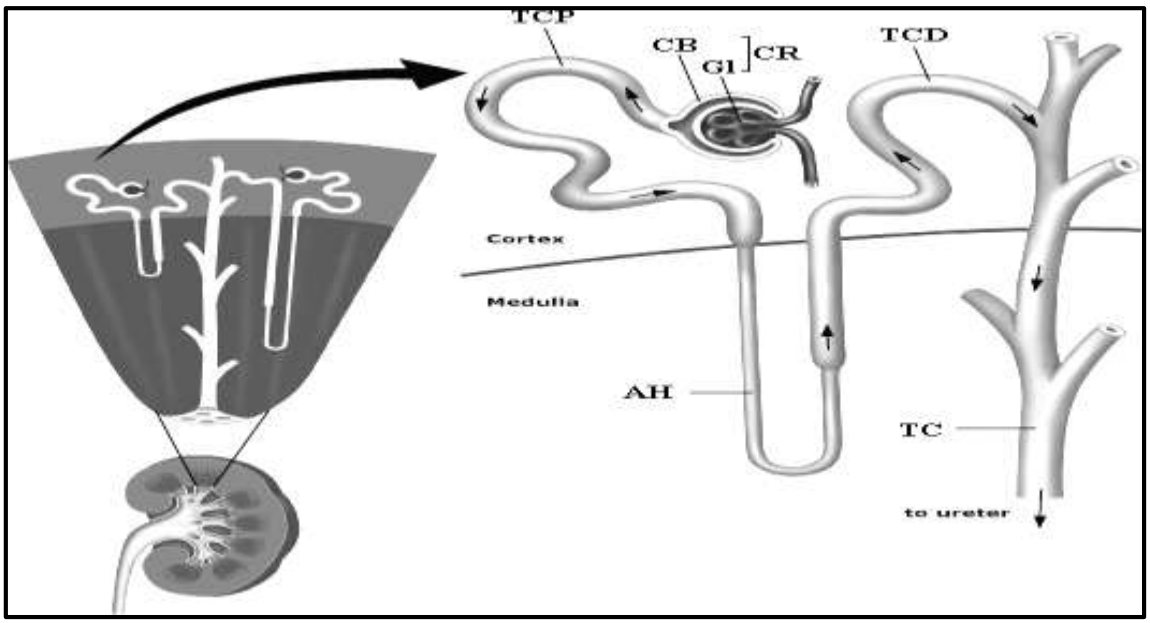


Figure I.10: Structure de base du néphron.
Gl : glomérule, CB : capsule de Bowman, CR : corpuscule rénal, TCP : tube contourné proximal, AH : anse de Henlé, TCD : tube contourné distal, TC : tube collecteur.

b. Réabsorption

La composition de l'urine primitive se modifie sous l'effet de déplacements de substances du tubule vers les capillaires péritubulaires, et vice versa. En conséquence, de 90% à plus de 99% de sodium filtré, seront réabsorbés le long du néphron.

La réabsorption tubulaire du sodium débute aussitôt que le filtrat pénètre dans les tubules contournés proximaux, selon des mécanismes multiples faisant intervenir des transports actifs notamment le cotransport Na^+/substrat et l'échange Na^+ /H^+. La réabsorption iso-osmotique du sodium au niveau du TCP peut atteindre 70%, et elle entraine une réabsorption passive de l'eau (MorelL, 1976). Au niveau du segment large ascendant de l'anse de Henlé, 20 à 25% du Na^+ sont réabsorbés par symport Na^+-$2Cl^-$$K$ (Katz et al., 1979). Cette partie du néphron se caractérise par une faible perméabilité à l'eau, et elle est appelée segment de dilution.

La réabsorption du sodium se poursuit Au niveau du tube distal, par un cotransport Na^+/Cl^-. Environs 10% du sodium filtré y est réabsorbé. Au niveau du tube collecteur, la réabsorption

de Na^+ s'effectue passivement au travers des canaux Na^+ qui peuvent être activés par l'aldostérone et l'hormone antidiurétique (Haïdara, 2008; Silbernagl et al., 2001; Stokes, 1993).

c. Sécrétion tubulaire

La réabsorption du Na^+ dans le tube collecteur s'effectue en parallèle à la sécrétion du K^+. D'autres substances telles que les ions H^+ (hydrogène), les ions K^+ (potassium) et la créatinine diffusent des capillaires tubulaires vers le filtrat pour être éliminées dans l'urine. Ce processus est important dans l'élimination de certains médicaments et toxines, qui ne se trouvent pas déjà dans le filtrat, ou dans la régulation du pH sanguin (Johanna, 2013).

II. Les diurétiques

II.1. Définition

Les diurétiques sont des composés chimiques, capable d'augmenter l'excrétion urinaire du sodium, soit en diminuant la réabsorption du sodium tubulaire ou en augmentant la charge de sodium filtré ou encore par une combinaison de ces effets. Ajouté à leur effet natriurétique, les diurétiques peuvent modifier l'excrétion urinaire d'autres électrolytes, notamment du calcium, du potassium, des chlorures, du magnésium et des protons. L'augmentation de l'excrétion urinaire du sodium est toujours associée à une augmentation du volume urinaire (Donald and Warkentin, 2011; Puschett, 1988; Seldin and Giebisch, 197AD).

II.2. Classification des diurétiques

La classification des diurétiques se fait selon leur structure chimique, leur pouvoir diurétique, leur mécanisme et leur site d'action à l'intérieur du néphron (Fig. I.6).

- **Diurétiques osmotiques**

Les diurétiques osmotiques n'interfèrent pas directement avec des mécanismes de transport mais agissent comme des substances osmotiques au niveau tubulaire. Lorsque le diurétique osmotique est administré, il est filtré mais très peu réabsorbé à cause de leur faible capacité a passer à travers les membranes luminales, ils fixent les molécules d'eau et les retiennent dans la lumière tubulaire, empêchant par la suite une baisse de la réabsorption des ions Na^+ et Cl^-. Le mannitol et le sorbitol sont représentants les plus connus de cette classe (Lüllmann et al., 2010; Morrison, 1997).

- **Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique**

Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique agissent principalement au niveau du TCP. Ils réduisent la production d'acide carbonique et par conséquent celle des protons (Fig. I.11). Ce qui entraine une baisse des échanges Na^+/H^+, une diminution de l'ammonurie et une excrétion importante des bicarbonates. L'acétazolamide est le diurétique le plus connu de cette classe (Wile, 2012).

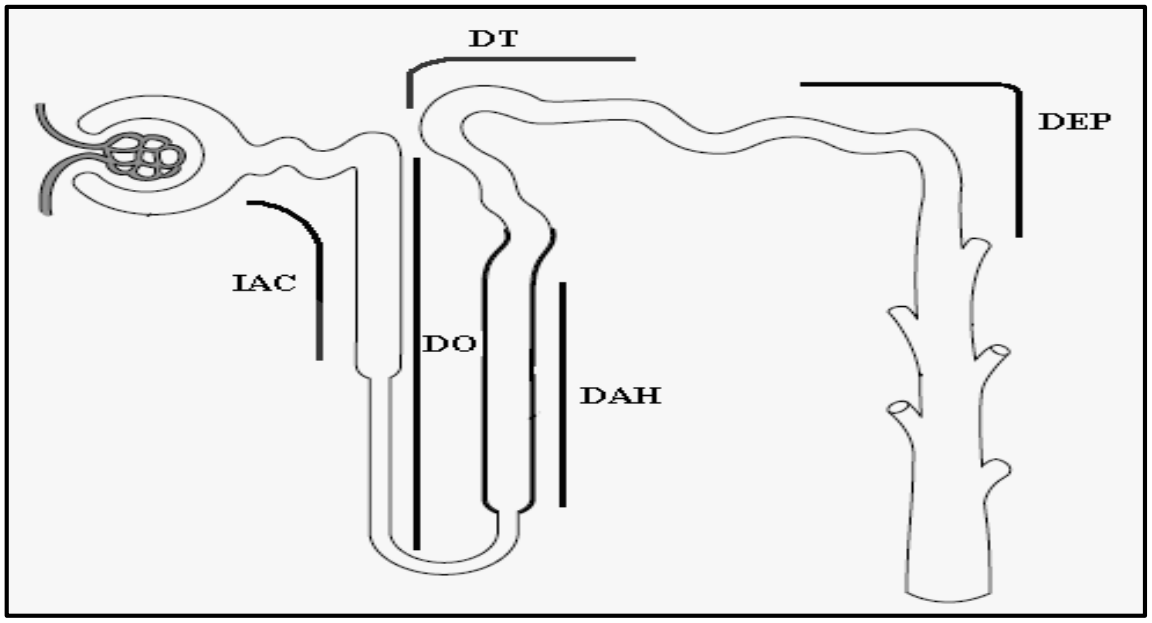


Figure I.11: sites d'action des substances diurétiques.
IAC : inhibiteurs d'anhydrase carbonique ; DO : diurétiques osmotiques ; DAH : diurétiques de l'anse de Henle ; DT : diurétiques thiazidiques ; DEP : diurétiques d'épargne potassique.

- **Diurétiques de l'anse de Henle**

Le furosémide est le chef de file de cette classe. Ces diurétiques exercent leur effet au niveau de de la branche large ascendante de l'anse de Henlé par une inhibition du cotransporteur Na^+-$2Cl^-$-K^+, ce qui augmente l'excrétion urinaire d'eau et de nombreux ions : Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}, Mg^{2+}, PO_4^{3-} et NH_4^+. Cette classe de médicaments diurétique est caractérisée par une action rapide et une haute efficacité (Breyer, 1990; M. Maldonado and Cordova, 1990).

- **Diurétiques thiazidiques**

Les diurétiques thiazidiques agissent sur le segment initial du tube contourné distal via l'inhibition du cotransport chlorure de sodium NaCl se qui conduit à une rétention d'eau dans l'urine (LaCroix et al., 1990). Ils provoquent une hypokaliémie en stimulant la réabsorption de Ca^{2+} et l'excrétion urinaire de K^+ (LaCroix et al., 1990).

- **Diurétiques d'épargne potassique**

Ce sont des diurétiques hyperkaliémiants qui agissent au niveau du segment terminal du TCD et du tube collecteur. Ils épargnent le potassium en bloquant les échanges sodium-potassium et augmentent l'élimination du sodium et à un moindre degré du chlorure et de l'acide carbonique. On distingue deux groupes : Les antagonistes de l'aldostérone (Ex : la spironolactone) et non antagonistes d'aldostérone (Ex : l'amiloride). (Beaux, 1991; Corvol et al., 1981).

II.3. Indications thérapeutiques

Les principales indications thérapeutiques des diurétiques sont :

- **l'hypertension artérielle** : les diurétiques constituent les médicaments base pour le traitement d'une pression artérielle élevée. Les thiazidiques sont les diurétiques les plus largement utilisés contre l'hypertension artérielle, ils favorisent l'élimination urinaire d'eau et du sodium. Cela a pour conséquence de diminuer le volume sanguin et le débit cardiaque et faire chuter la pression artérielle (Montani et al., 2005).

- **l'insuffisance cardiaque :** Une amélioration immédiate des variables hémodynamiques et des performances cardiaques est obtenue dans le cas d'insuffisance cardiaque chronique après traitement par un diurétique, principalement en raison de la réduction des volumes de plasma et de liquides extracellulaires (Silke, 1994). Ce sont Les diurétiques thiazidiques et ceux de l'anse qui sont efficaces dans le traitement de l'insuffisance cardiaque aigue et chronique (Silke, 1994).

- **L'insuffisance rénale :** la thérapie diurétique, s'appuyant sur l'usage des diurétiques de l'anse constitue un traitement de choix chez les patients présentant une insuffisance rénale compliquée de surcharge hydrosaline (van Olden et al., 1995). Le traitement vise à rétablir le flux urinaire et les doses utilisées doivent être adaptées selon le degré d'insuffisance rénale.

II.4. Effets indésirables des diurétiques

Les effets secondaires des diurétiques sont liés principalement à leur mode d'action, et à la dose administrée. Généralement, L'hypokaliémie, l'hypotension, l'élévation des concentrations plasmatiques d'urée et de créatinine, l'hyperuricémie et l'hyponatrémie sont Les principaux effets secondaires des diurétiques. Ils peuvent aussi provoquer une déshydratation chez les personnes âgées (Schneider and Mclane, 1997).

Chapitre VI : Présentation des plantes étudiées

I. *Vitex agnus castus L.*

I.1. Description de l'espèce

Vitex agnus-castus L. (Fig. I.12) est un arbuste à feuilles caduques qui atteint une hauteur jusqu'à 5m. Les feuilles sont opposées, à pétiole allongé, composées de cinq à sept folioles rayonnantes qui sont supportés sur une tige principale. Les folioles vertes sont linéaires, lancéolées, dentées, sombre sur le dessus et gris en dessous. Les fleurs sont parfumées, de coloration bleu, lilas, rose ou blanc. Les baies ressemblent à grains de poivre, dur, d'un pourpre à la peau noire, jaunâtre à l'intérieur, à moitié couvert par leur sage-calices verts et contenant quatre graines. L'odeur est aromatique et épicée, la saveur chaude et singulière après maturation (Berrani et al., 2017).



Figure I.12: *Vitex agnus castus L.*

I.2. Classification botanique

Selon le botaniste Arthur Cronquist, *Vitex agnus castus L* appartenait à la famille des verbénacées (Berrani et al., 2017) (Tab. I.1). Cette classification classique des angiospermes a été basée essentiellement sur des critères morphologiques, anatomiques et chimiques en ignorant les critères phylogénétiques. Cependant, les analyses de l'ADN par l'Angiosperms Phylogeny Group, a démontré que *Vitex agnus castus* appartient à la famille des Lamiacées (APG III 2009).

Tableau I.1: Classification botanique de *Vitex agnus castus L.*

Règne	Plantae
Sous –règne	Tracheobionta
Division	Magnolyophita
Classe	Magnolyopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Lmiales
Famille	Verbanaceae
Genre	Vitex
Espèce	Agnus-castus

I.3. Répartition géographique

Vitex agnus castus (VAC) est une espèce originaire de la zone méditerranéenne et de l'Asie occidentale, maintenant elle est cultivée partout dans le monde y compris la partie sud des états unis (Habbaba et al., 2016). Au Maroc, cette espèce est rencontrée dans les endroits humides au bord des cours d'eau (Bellakhdar, 1997b).

I.4. Noms communs

Vitex agnus castus possède plusieurs noms communs : Chaste tree et chaste berry en anglais; (Chen et al., 2011; Rani and Sharma, 2013) Gattilier, poivre sauvage, petit poivre, le poivre de moine en français (Aissaoui, 2010), Shajarat mariam en arabe (Miguel et al., 2014). Au Maroc, *Vitex agnus castus* est connu sous le nom vernaculaire d'angarf-lkhrwaa.(Saadi et al., 2013).

I.5. Aspects Historique et usage traditionnel

Le gattilier est utilisé comme herbe médicinale depuis au moins deux mille ans. Les anciens Egyptiens et les romains ont utilisés les différentes parties de la plante pour une variété de

problèmes de santé (Aissaoui, 2010). Hippocrate a recommandé son utilisation pour traiter les blessures et les inflammations (Meier et al., 1994). Pendant la période grecque, *Vitex agnus castus* constituait un symbole de chasteté, puisque la déesse grecque Héra est née sous un arbuste Agnus-castus. Dioscoride, un médecin grec, l'a recommandé sous forme de boisson pour réduire la libido. De plus, le fruit aurait été utile non seulement pour déclencher la menstruation et pour soulager les crampes utérines, mais aussi comme lactogène, anorexigène, hypnotique et pour traitement de la dyspepsie (Blumenthal et al., 2000; Mayer and Czygan, 1999).

Au Maroc, les fruits et les sommités fleuries sont utilisées sous forme d'infusion comme sédatif, antispasmodique et anaphrodisiaque (Sijelmassi, 1996). Dans la région d'Imouzzer Ida Outanane, les feuilles et les graines du gattilier sont utilisées pour les brûlures, les rhumes, les maux de tête et comme fumigant (Miguel et al., 2014). Selon une enquête ethnobotanique menée au Maroc en 2015, dans trois régions différentes : Meknes Tafilalet, Gharb Chrarda Bni Hssen, and Rabat Sale Zemmour Zaer, *Vitex agnus castus* est utilisé dans le traitement de plusieurs maladies notamment la constipation, les maladies rhumatismales, la régulation de la règle, la stérilité, les hémorroïdes, la thyroïde, ainsi que les maladies dermatologiques (taches noires sur le visage, perte de cheveux ...) (Berrani et al., 2017).

I.6. Composition chimique

Vitex agnus castus renferme plusieurs composées de nature différente :

- **Les flavonoïdes** comme la casticine, la vitexine et la lutéoline (Hajdú et al., 2008; Hoberg et al., 2001),
- **Les Diterpenes :** le rotundifuran et la vitexilactone ont été isolés à partir des fruits du *Vitex agnus castus* (Hoberg et al., 1999), la viteagnusine A , B,C,D et E. F, G,H (Ono et al., 2011, 2008).
- **Iridoids glycosides** : L'extrait méthanolique des tiges de *Vitex agnus-castus* est riche en iridoïdes (Kuruüzüm-Uz et al., 2003). Les feuilles contiennent également des iridoides glycosides comme l'aucubine et l'agnuside (Newall et al., 1996).
- **Huiles essentielles** : les différentes parties de *Vitex agnus castus* contiennent des huiles essentielles. les principaux constituants des huiles essentielles des feuilles et des fruits du gattilier sont les monoterpenes (1,8-cinéole, le β-citronellol) et les sesquiterpènes (Le β-caryophyllène, Limonène, sabinène) (Hamid et al., 2010; Toplan et al., 2015), Outre les composés cités précédemment, l'espèce vitex agnus castus renferme d'autres constituants,

tels que les acides gras, les acides aminés et quelques traces d'hormones (Sorensen and Katsiotis, 1999).

I.7. Activités biologiques

I.7.1. Activité hormonale

Les extraits du gattilier régulent la fonction des organes reproducteurs chez la femme en soignant les différents troubles gynécologiques ayant comme origine une hypersécrétion du prolactine ou une insuffisance du corps jaune (syndrome prémenstruel) ; ils diminuent la sécrétion du prolactine par l'intermédiaire de TRH, et augmente les taux d'hormone lutéinisante (LH) sans affecter l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Hussein, 2007; Meena et al., 2011).

I.7.2. Activité antitumorale

Les fruits de *Vitex agnus castus* peuvent , selon certains chercheurs, inhiber la prolifération de certaines lignées cellulaires responsables des cancers du sein, des ovaires, du col de l'utérus, de l'estomac, du colon , du poumon et du prostate et peuvent aussi induire l'apoptose de ces cellules cancéreuses (Ohyama et al., 2003; Weisskopf et al., 2005).

I.7.3. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse défensive qui induit des adaptations physiologiques pour limiter les lésions tissulaires et éliminer les infections pathogènes (Choudhary et al., 2009). Selon certains chercheurs, L'effet anti-inflammatoire de *Vitex agnus castus* est du à sa richesse en métabolites secondaires comme l'a-pinène, le sabinène, le limonène, le cinéole et la casticine qui exercent leur effet via la suppression des médiateurs de l'inflammation (Cossuta et al., 2008; Do Amaral et al., 2007; Liou et al., 2014).

I.7.4. Activité antibactérienne et antifongique

Plusieurs travaux ont démontré l'effet antibactérien des huiles essentielles et des extraits de feuilles et des fruits de *Vitex agnus castus* contre un large éventail de micro-organismes (Arokiyaraj et al., 2009; Dervishi-Shengjergji et al., 2014; Stojković et al., 2011). Récemment, une étude menée par Asdadi et al. a montré que les huiles essentielles des fruits de *Vitex agnus castus* peuvent être utilisées comme des agents antifongiques potentiels contre les espèces de Candida responsables d'infections nosocomiales (Asdadi et al., 2015).

I.7.5. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de *Vitex agnus castus* a été evaluée par diffrents tests. Les résultats obtenus montrent que les extraits des différentes parties de la plante sont dotés d'un pouvoir antioxydant important, qui est dû à la présence de phytoconstituants bioactifs comme les composés phénoliques (tanins et flavonoïdes) (Hajdú et al., 2008; Rashed, 2013; Sarikurkcu et al., 2009).

II. *Cymbopogon nardus L.*

II.1. Description de l'espèce

C'est une plante herbacée vivace (Fig. I.13), d'environ 1,5 à 2,1 m de haut, dotée d'un rhizome robuste, blanchâtre, parfois teinté de nœuds rouges violacé, souvent gonflés. Les feuilles étroites à nervure centrale blanche bien visible, et engainées à leur base ou elles forment une pseudo-tige de couleur rouge pourpre de 1 à 2 cm de diamètre. L'inflorescence est compacte constituée d'une panicule longue de 0,3 à 0,8 m qui comporte des épillets longs de 3 à 7 mm, disposés par paires sur deux racèmes. Le fruit est un caryopse typique de la famille de Poaceae (Kirtikar and Basu, 1994).



Figure I.13: *Cymbopogon nardus L.*

II.2. Classification

Le genre Cymbopogon appartient à la famille des Poaceae, caractérisée par des espèces qui présentent une grande variabilité morphologique et chimique. Ce genre est représenté par 55 à 140 taxons. La plupart des espèces du genre sont aromatiques et produisent des huiles volatiles d'une grande valeur commerciale (Tab. I.2). *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (CN) communément appelé citronnelle, originaire de Ceylan est l'une des espèces de Cymbopogon (Nath et al., 2002).

Tableau I.2: Classification botanique de *Cymbopogon nardus L.*

Règne	Plantae
Sous –règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Angiospermes
Sous classe	Commelinida
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
Genre	Cymbopogon
Espèce	Cymbopogon nardus

II.3. Répartition géographique

Cymbopogon nardus est distribuée dans les régions les plus chaudes de l'Inde, de Birmanie, de la péninsule malaise, de sirilanka, d'Asie tropicale, d'Afrique et d'Australie. Elle est cultivée en Java depuis 1890. En 1912, la plante est introduite à Formosa. Elle peut pousser dans les bois décidus, les prairies, mais aussi dans les friches et au bord des routes, même sur sols pauvres (Akhila, 2009).

II.4. Utilisations traditionnelles

Cymbopogon nardus est une plante médicinale largement utilisée dans la cuisine (Konvvar and Gohain, 1999) et la parfumerie (Furukawa, 1918). Les Chinois utilisaient les feuilles plus spécifiquement pour le traitement du rhumatisme, de la fièvre, des parasites intestinaux, des problèmes digestifs et menstruels (Regina et al., 2015). Les racines sont utilisées comme diurétique (Kirtikar and Basu, 1994) . Les huiles essentielles de C. nardus sont connus par leur effet répulsif contre les moustiques (Ansari and Razdan, 1995; Ranaweera, 1996).

II.5. Composition chimique

Le genre Cymbopogon comprend des espèces qui sont très variables de point de vue morphologique (*Cymbopogon nardus (L.)* Rendle, *Cymbopogon winterianus* Jowitt, *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Wats *et Cymbopogon citratus L*, mais qui sont riches en huiles essentielles commercialisées sous les appellations génériques de lemongrass et de citronella. Ces huiles se distinguent les uns des autres que par les proportions relatives de ces différents constituants majeurs (>80%) : citronellal, géraniol, citral, citronellol, acétate de géranyle et limonène, et aussi par leurs constituants mineurs (1-4 %) et de leurs constituants à l'état de traces (< 0,1 %). Par ailleurs, d'autres différences de composition chimique peuvent être remarquées pour les huiles essentielles extraites de *Cymbopogon nardus* de différentes régions ou extraites par différentes méthodes de distillation (Nitangam, 2012; Silou et al., 2017).

II.6. Activités biologiques

II.6.1. Activité antifongique

l'extrait hydroalcolique de CN s'est révélé très puissant comme fongistatique et fongicide, contre 31 isolats de *Microsporum canis* qui sont souvent impliqués dans les affections dermatophytiques des chiens et des chats (Kro et al., 2017). les huiles essentielles de la citronnelle possèdent un pouvoir antifongique important contre les espèces de champignons les plus fréquents qui infectent les céréales et les légumineuses (Regina et al., 2015).

II.6.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* a été étudiée par plusieurs chercheurs, les résultats ont montrés que ces huiles sont efficaces contre un large spectre de bactéries gram+ et gram-. qui sont responsables d'infections chez l'homme, (Hammer et al., 1999). et de contamination des aliments (Brugnera et al., 2011).

II.6.3. Activité cytotoxique

Les essais biologiques de cytotoxicité in vitro montrent que les huiles essentielles des feuilles de *Cymbopogon nardus* sont dotées d'une activité cytotoxique importante contre la lignée cellulaire épidermique humaine HaCaT (Koffi et al., 2009a).

II.6.4. Activité Analgésique

L'activité analgésique des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* du congo et du Benin a été étudiée par Abena et al. Les résultats montraient que ces huiles possèdent une activité analgésique dose dépendante sur les étirements induits par l'acide acétique chez les souris (Abena et al., 2007).

II.6.5. Activité antivirale

Une étude récente réalisée in vitro a confirmé que l'huile essentielle de *Cymbopopgon nardus* inhibe l'activité de la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 RT). Ces résultats confirment l'utilisation traditionnelle de cette huile contre le VIH en Afrique. Les médicaments contenant les huiles essentielles de C. *nardus* à une dose adéquate peuvent être utiles pour le traitement du SIDA (Mori et al., 2016).

Partie II : Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Les feuilles et les graines de *Vitex agnus castus L* ont été récoltées durant la période de floraison juin-octobre dans la région de Khenifra en 2015. Les feuilles de *Cymbopogon nardus L* ont été recoltées de Rabat pendant le mois d'Avril 2015. L'identification botanique des deux espèces a été confirmée au laboratoire de biotechnologie et preservation de ressources naturelles par professeur Amina Bari, Botaniste de la faculté de sciences Dhar Mehraz, Département de biologie, université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès-Maroc.

Parmi les critères de choix de ces deux plantes, figurent leur utilisation déjà dans la pharmacopée traditionnelle marocaine d'une part et le manque de travaux de recherche sur les propriétés biologiques de ces deux plantes d'autre part. Les différentes caractéristiques de ces deux plantes sont préalablement présentées dans la partie bibliographique.

I.2. Animaux

Nos expériences ont été réalisées sur des rats *Wistar* adultes mâles normaux ayant un poids corporel de 190 ± 40 g, élevés dans l'animalerie du laboratoire PPSE ou ils ont séjourné sous les conditions suivantes : une température de 25 ± 2°C, 55 ± 5% d'humidité et 12h/12h cycle lumière / obscurité. Les animaux ont libre accès à l'eau du robinet et la nourriture. Toutes les expériences sur les animaux ont été menées conformément aux principes internationalement acceptés pour l'utilisation et les soins des animaux de laboratoire, et l'approbation du Comité d'éthique de la Faculté des sciences de Fès (Maroc) a été obtenue.

I.3. Souches bactériennes

Les microorganismes utilisés pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des plantes étudiées sont composés de 5 bactéries responsables d'infections nosocomiales, qui ont été isolés à partir des nouveaux né dans les services de réanimation pédiatrique du centre hospitalier universitaire à Fès. Il s'agit de bactérie Gram positif (*Staphylococcus aureus) et* Gram négatif *(Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae).* Ces souches sont caractérisées par leur résistance aux différents antibiotiques Voici une description des souches étudiées :

- ***Staphylococcus aureus* :** *Staphylococcus aureus* est une bactérie appartenant au groupe des cocci à Gram positif, de forme sphérique, qui tend à se grouper en amas. *Staphylococcus aureus* est commensal de l'homme (Peacock et al., 2001) et se révèle être parmi les espèces les plus couramment isolées en milieux hospitalier. Elle tient aussi une place importante dans les infections communautaires (Vincenot et al., 2008; Wertheim et al., 2005).
- ***Escherichia coli*** est un bacille qui réagit négativement à la coloration de Gram (gram négatif), anaérobie facultative, mobile grâce aux flagelles péritriches. C'est une espèce prédominante de la flore aérobie-anaérobie facultative du tube digestif chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales. Certaines souches peuvent déclencher des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales en acquérant des facteurs de virulence (Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2012; Nataro and Kaper, 1998).
- ***Pseudomonas aeruginosa*** *est un* bacille aérobie, Gram négatif et très mobile grâce à un flagelle, de 1,5 à 3 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large. Ce type de bactéries représente 10 à 11% des bactéries responsables des infections nosocomiales et l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement, occupant le 3ème rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1er rang pour les infections pulmonaires basses et le 3ème rang pour les infections urinaires (Fritze and Pukall, 2011).
- ***Klebsiella pneumoniae* :** est un bacille Gram négatif, immobile, non sporulé et anaérobie facultatif. Ces bactéries sont des espèces pathogènes opportunistes, fréquemment rencontrée dans la nature (eaux, sol, du bois et des végétaux). Actuellement considéré comme l'un des agents pathogènes opportunistes les plus importants qui causent des infections nosocomiales et communautaires, en particulier chez les personnes immunodéprimées (El Fertas-Aissani et al., 2013).
- ***Proteus mirabilis :*** une bactérie de type bacille à Gram négatif appartenant aux entérobactéries. Elle est commensale du tube digestif des animaux. *Proteus* mirabilis est une cause fréquente des infections nosocomiales au niveau des voies urinaires à cause de sa capacité virulente qui lui permet d'échapper au système immunitaire (Fox-Moon and Shirtliff, 2014).

I.4. Antibiotiques

Des disques d'antibiotiques de différentes classes ont été utilisés comme témoins négatifs de la croissance bactérienne : Imipenème (IMP), Amoxicilline (AMX), Céfotaxime (CTX),

Kanamycine (K), Pénicilline (P), Ampicilline (AMP), Norfloxacin (NOR), Pristinamycine (PT) (Fig. II.1).



Figure II. 1: Disques imprégnés d'antibiotique pour réalisation d'antibiogramme.

II. Méthodes d'extraction

II.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielle de *Vitex agnus castus* et de *Cymbopogon nardus* a été réalisée au sein du laboratoire de la physiologie végétale à la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz de Fès, par un hydrodistillateur (Fig. II.2). Cette technique consiste à introduire 100g de chaque échantillon végétal dans un ballon et ajouter 500 ml d'eau distillée. Le mélange est ensuite porté à ébullition sur une chauffe ballon pendant 3 heures. On rajoute Quelques billes de verre dans le ballon afin de réguler la température du système. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles, en traversant le réfrigérant vont se condenser et chuter dans la burette graduée qui permet de lire directement le volume recueilli ; l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.



Figure II.2: Montage expérimental d'hydrodistillation.

II.1.1. Détermination du rendement

Le rendement en HE correspond à la quantité d'HE obtenue par rapport à la masse de matière sèche utilisée pendant l'extraction. Le rendement est calculé par la formule suivante :

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

Avec

R (%) : rendement en huile essentielle en g pour 100g de matière sèche ; m : masse d'huile essentielle récupérée en g ; m_0 : masse de matière sèche distillée en g.

II.1.2. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues sont conservées dans des flacons opaques et stockés à 4°C avant leurs utilisations.

II.2. Extraction par les solvants organiques

II.2.1. Par macération

Des quantités de 10 g de la poudre des feuilles et des fruits de VAC et des feuilles CN ont été macérées à température ambiante pendant 48h sous agitation avec 50 ml de solvants : l'acétate d'éthyle (AE), Méthanol (MeOH), Ethanol (EtOH) et l'eau. Ensuite, le mélange a été

filtré sur papier Whatman puis stocké à 4°C pour une utilisation ultérieure. Les rendements de différentes extractions ont été calculés.

II.2.2. Par soxhlet

La technique du Soxhlet (Fig. II.3) consiste à une extraction du type solide-liquide. C'est une méthode simple qui permet de répéter infiniment le cycle d'extraction avec des différents solvants jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Dans cette étude, l'extraction par soxhlet a été effectuée par épuisement du matériel végétal, en utilisant des solvants à polarité croissante : acétate d'éthyle (Ac Eth), méthanol (MeOH), éthanol (EOh) et l'eau (Aq).



Figure II.3: Montage expérimental de l'appareil Soxhlet.

Une cartouche contenant l'échantillon végétal (5g) est insérée dans l'extracteur, Le ballon placé au-dessous de l'extracteur contient le solvant. En chauffant le ballon, le solvant (50ml) est amené à l'ébullition et ces vapeurs passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant. Ensuite, le condensat tombe sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de composants solubles extraits. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en principes actifs. L'extraction continue pendant 8h. Les extraits obtenus ont été filtrés et séchés sous vide à 40°C à l'aide d'un rotavapeur (Fig.II.4), puis conservés dans un réfrigérateur à 4°C.

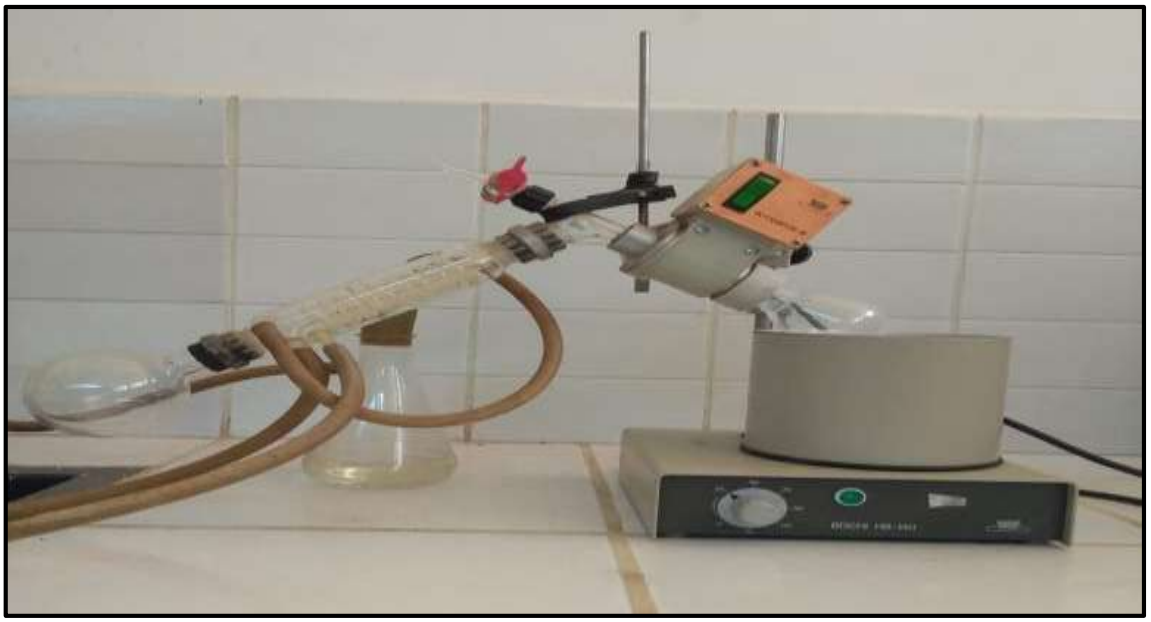


Figure II.4: Rotavapeur (Laboratoire LPPSE, FSDM)

III. Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été analysées qualitativement et quantitativement par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Fig. II.5), c'est une technique d'analyse qui couple la séparation de différentes substances d'un mélange complexe à la détection et l'identification de ces substances.

Dans ce travail, Les huiles essentielles ont été analysées par un CPG-SM de modèle Perkin Elmer Clarus MS 500 équipé d'une colonne capillaire en silice fondue ayant une phase stationnaire apolaire de type HP-5MS (60 m x 0,32 mm, 0,25 µm épaisseur de film). Un volume de 1µl du mélange HE-Hexane 10% a été injecté dans la colonne. L'helium et le gaz vecteur utilisé avec un débit de 1 ml/min.

Les conditions de fonctionnement de la température du four CPG-SM ont été maintenues comme suit : 40°C durant 2 minutes, puis 2°C/min jusqu'à 250°C et 10 minutes à 250°C. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur est de 260°C. On a appliqué un split de 10 : 100. Les spectres de masse sont enregistrés en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70eV. La caractérisation des composés a été réalisée en déterminant leurs indices de rétention (IR) par rapport à ceux d'une série homologue de n-alcanes (C8 à C20) (Fluka, Buchs/sg, Suisse) et en comparant leurs spectres de masse enregistrés à des données de littérature et des bibliothèques commerciales (Adams, 2007).



Figure II.5: Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (Cité d'innovation Fès).

IV. Méthodes d'activités biologiques

IV.1. In vitro

IV.1.1. Criblage phytochimique

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou précipitation, afin de déterminer de manière préliminaire les différentes classes phytochimiques contenues dans les plantes étudiées. Cette caractérisation a été réalisés suivant le protocole de (Bruneton, 2009; Harborne, 1973; Koffi et al., 2009b; Mogode, 2005).

- ✓ **Alcaloïdes**

Les alcaloïdes ont été caractérisés par le réactif de Dragendorff. Dans un tube à essai, on introduit 1 ml de filtrat (extrait issu de l'agitation et de la macération de l'acide sulfurique avec la poudre végétale séchée et filtré), et on ajoute 5 gouttes de réactif de Dragendorff dans tube. S'il y a apparition d'un précipité rouge orange, la présence d'alcaloïdes est confirmée.

- ✓ **Tanins**

La présence des tannins a été mise en évidence en ajoutant à 1 ml de chaque extrait, 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl3 diluée à 1%. L'apparition d'une coloration vert-foncée ou bleue verte indique la présence des tanins. L'apparition d'une coloration vert-foncée

indique la présence des tanins catéchiques. L'apparition d'une coloration bleue-verte indique la présence des tanins galliques.

- ✓ **Anthraquinones**

Pour la détection des anthraquinones libres, 1ml de l'ammoniaque dilué a été ajouté à l'extrait chloroformique obtenu. La présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

- ✓ **Terpènes**

Les stérols et les terpènes ont été recherchés par la réaction de Liebermann. Cinq (5) ml de chaque extrait ont été évaporés sur bain de sable. Le résidu est dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique ; nous avons ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré au triturât. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive.

- ✓ **Saponines**

2 g du matériel végétal sec broyé à tester sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. Après refroidissement et filtration, nous avons réparti successivement dans dix tubes à essai ,1 ml à 10 ml du décocté et on ajuste le volume dans chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube a été agité pendant 15s. Après un repos de 15 min en position verticale, on mesure la hauteur de la mousse produite dans chaque tube. L´indice de mousse (I) est calculé par la formule suivante :

$$I = \frac{1000}{N} \ (l)$$

Avec : N est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm. La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (Dohoo et al., 2003).

- ✓ **Flavonoïdes**

La recherche des flavonoïdes a été réalisée par la réaction à la cyanidine. Un volume de 5 ml de l'extrait aqueux (5%) a été repris dans 5 ml d'alcool chlorhydrique. Une coloration rose orangée ou violacée apparait en ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium. L'addition de 1 ml d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes.

- ✓ **Phénols**

Pour la détection des phénols, 1 ml d'une solution de chlorure ferrique à 1% a été ajouté à 2ml de l'extrait de plante. L'apparition d'une coloration bleue ou verte indique la présence des phénols (Sivaraj et al., 2011).

IV.1.2. Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs techniques peuvent évaluer le potentiel antioxydant des extraits de plantes in vitro. Ces techniques sont basées sur le mélange de substances oxydantes comme les radicaux libres avec un échantillon qui contient des antioxydants capables de neutraliser ces radicaux libres soit par transfert d'électron ou transfert d'un atome d'hydrogène (Prior et al., 2005).

Afin de refléter le profil antioxydant des différents échantillons, notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois différents tests chimiques : La réduction du phosphomolybdate (capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre (DPPH) et le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).

IV.1.2.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits a été évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} en molybdate Mo (V) MoO^{2+} pour former un complexe vert de phosphate /Mo(V) à pH acide (Prieto et al., 1999).

<u>Mode opératoire</u>

Brièvement, à 100µl de chaque échantillon, 1 ml de solution du réactif (0,6M acide sulfurique, 28mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium) a été ajouté. Les tubes sont incubés à 95C° pendant 90min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre le blanc qui est préparé dans les mêmes conditions. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard pour la réalisation de la courbe d'étalonnage et la capacité antioxydante totale a été exprimée en milligramme d'acide ascorbique équivalent par gramme de matière sèche (mg Eq Vit C/g Ms)

IV.1.2.2. Détermination du pouvoir réducteur

Cette technique est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique en fer ferreux. La réaction se manifeste par le passage de la coloration jaune au bleu vert.

Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des différents extraits a été évalué par la méthode décrite par Oyaizu (Oyaizu, 1986)**,** 100 µL de chaque échantillon a été mélangé avec 500 µL de tampon phosphate et 500 µL de Férrocianates de potassium. Après 20 minutes d'incubation à 50°C, 500 µL d'acide trichloracétique ont été ajoutés puis centrifugés 10min à 3000trs. Après 500 µL d'eau distillée ont été ajoutés à 500 µl du surnagent et à 100 µL de $FeCl_3$. L'absorbance a été mesurée à 700 nm (Jasco v-530). La Quercétine était utilisée comme standard. Les résultats ont été exprimés en CE50 (mg/ml), étant donné que La CE50 est définie comme la concentration qui correspond à 0,5 de l'absorbance.

IV.1.2.3. Piégeage du radical libre DPPH

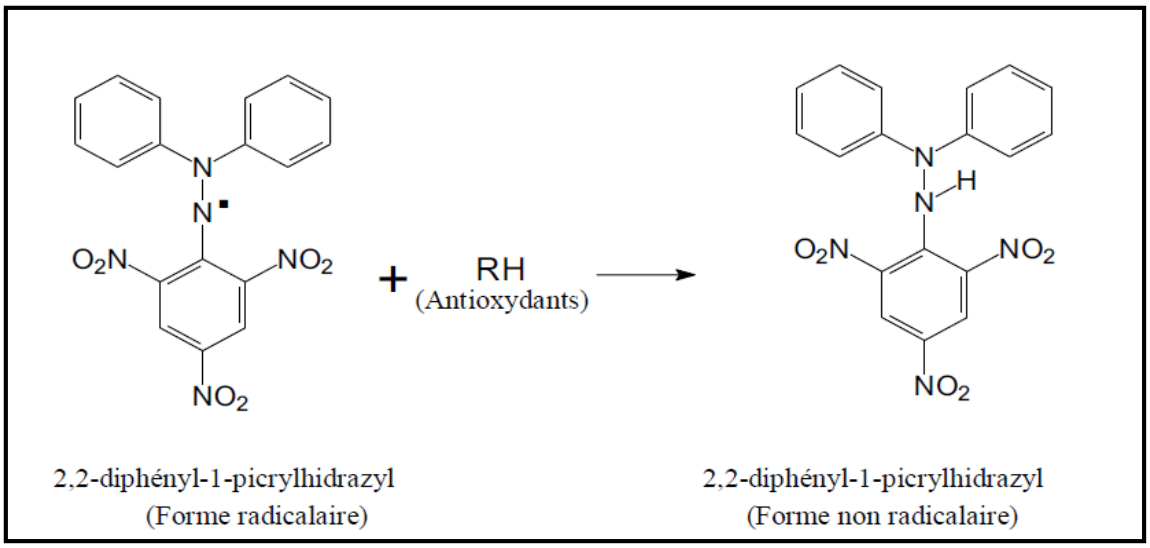


Figure II.6: Structure du DPPH et sa réduction par un antioxydant (RH).

Le principe du test consiste à évaluer la capacité des extraits à piéger le radical libre DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) (Fig. II.6). La solution de DPPH change sa couleur du violet au jaune en présence de substances antiradicalaires.

Mode opératoire :

La capacité des extraits à piéger le radical DPPH a été mesurée selon la méthode décrite par Wu, Chen et al (Wu et al., 2003), 100 µl de différentes concentrations de solutions échantillons et témoin sont ajoutées à 750 µl de la solution éthanolique de DPPH fraichement préparé (0,004%) et 650 µl d'éthanol à 96%. L'absorbance du mélange a été mesurée à 517 nm avec un spectrophotomètre (Jasco V-530) après 30 min d'incubation à température ambiante dans l'obscurité. Un témoin négatif a été préparé en parallèle avec les échantillons. Une solution de BHT a été préparée pour servir de témoin positif.

Présentation de résultats

- **Le pourcentage d'inhibition** a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

%I = (1 - Absorbance échantillon / Absorbance contrôle négatif) x 100

- **IC_{50}** est la concentration d'extrait de plante ou de la BHT responsable de l'inhibition de 50% de radicaux DPPH, elle est déterminée sur les graphiques représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits et de la BHT. Plus la valeur d'IC50 est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Popovici and Saykova, 2009) **.**

IV.1.3. Dosage de polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été déterminée par la méthode de réactif Folin-Ciocalteu (K. Slinkard and V. L. Singleton, 1977). Le principe de cette technique est basé sur la réduction de ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène par les groupements réducteurs des composés phénoliques. L'intensité de la coloration est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

Mode opératoire

Une prise de 0.5ml de chaque extrait d'une dilution connue est mise dans des tubes à essai contenant 2.5ml de réactif Folin-Ciocalteau à 10% (v/v). 2ml de la solution de carbonate de sodium à 7% ont été ajoutés après repos du mélange pendant 5 min. Après 2 h d'incubation à température ambiante dans l'obscurité, L'absorbance a été lue à 760 nm (Jasco v-530). La concentration des polyphénols dans différents extraits a été déterminée en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire établie avec l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes

conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 1g de matière végétale sèche **(**mgEq AG/gMs).

IV.1.4. Dosage de flavonoïdes totaux

Les concentrations de flavonoïdes totaux des différents extraits ont été déterminées par la méthode colorimétrique au le trichlorure d'aluminium (Zhishen et al., 1999). Cette technique est basée sur l'oxydation des groupements hydroxyle OH libres des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et la soude formant ainsi un complexe rose qui absorbe la lumière à 510.

Mode opératoire

Brièvement, 250 µL de chaque extrait ont été mélangé avec 75µl d'une solution d'$AlCl_3$ 10% et 75µl d'une solution d'acétate de sodium CH_3COONa 5%. Après agitation, le tout est incubé pendant 30min à l'obscurité et à la température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 510nm. Le Rutin a été utilisée comme standard pour la réalisation du courbe d'étalonnage et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg d'équivalent de Rutin par gramme de poids sec de chaque extrait (mg Eq Rutin/g MS).

IV.1.5. Dosage de flavons et flavonols

L'estimation du taux de flavonols présent dans les différents extraits a été réalisée par la méthode de Kosalec et al (Kosalec et al., 2004).

Mode opératoire

Mettre 100µl d'extrait de plante dans un tube à essai ; ajouter 100µl d'une solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 20% puis 100µl d'acétate de sodium et 2,5µl d'eau, laisser incuber une heure à température ambiante. L'absorbance a été lue à partir du spectrophotomètre UV à 420 nm. La concentration des flavones et flavonols contenue dans les extraits a été calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la Quercétine comme standard. Les résultats sont exprimés en (mg Eq Quercetine /g Ms).

IV.1.6. Evaluation de l'activité antibactérienne

Plusieurs techniques peuvent évaluer le pouvoir antibactérien in vitro d'un extrait donné, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Notre travail consiste à étudier l'activité

antibactérienne des huiles essentielles de VAC et CN par la méthode de diffusion sur disque de papier en milieu gélosé (aromatogramme) afin de déterminer le diamètre d'inhibition, et la méthode de microdillution pour calculer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

L'inoculum bactérien a été obtenu en prélevant des colonies à partir de cultures pures et jeunes après incubation de 18h à 37° C dans un milieu de gélose nutritive. Les colonies ont été mises en suspension dans une solution saline stérile (0,9% de NaCl) et homogénéisées à l'aide d'un vortex pendant 15 secondes. Les suspensions bactériennes ont été ajustées suivant la norme McFarland N° 0,5 Standard, ce qui correspond à une densité optique de 0,08–0,13 à une longueur d'onde de 625 nm (Fig. II.7). La concentration finale de l'inoculum sera approximativement de l'ordre de 10^8 ufc/ml (Da Silveira et al., 2014).

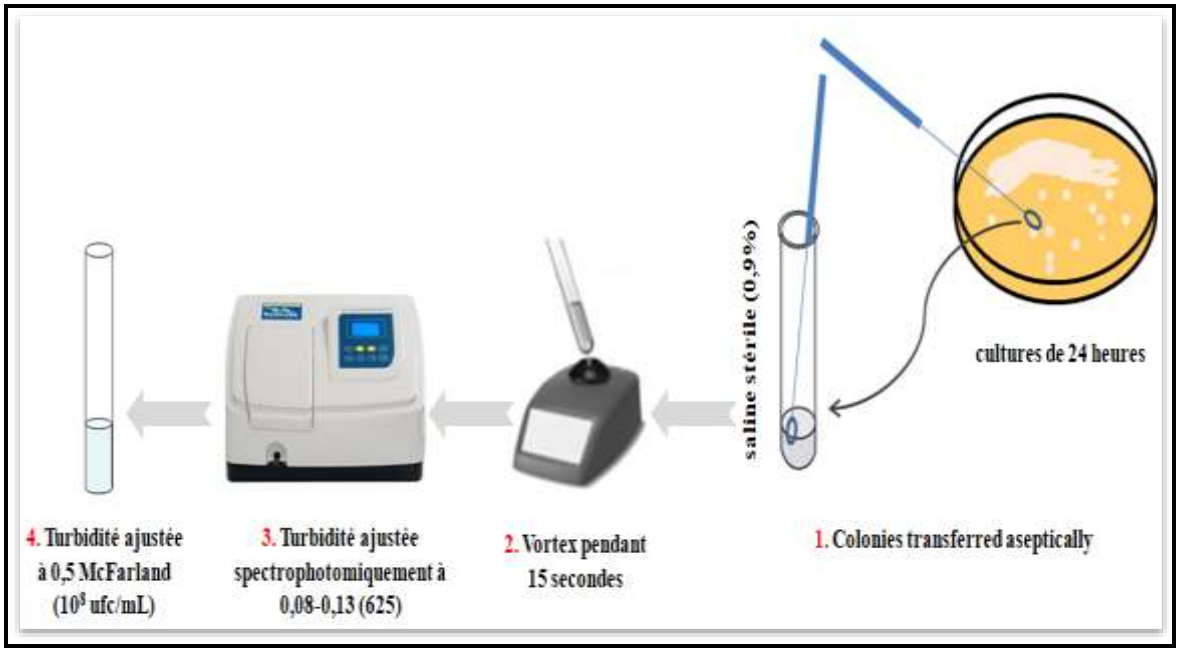


Figure II.7: Etapes de la préparation des suspensions bactériennes

IV.1.6.1. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

La méthode des aromatogrammes (Fig. II.8) est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, son principe consiste à utiliser des disques de papier stérile de 6mm imprégnés d'huiles essentielles sur la surface des géloses ensemencées par le germe à tester et de mesurer les diamètres d'inhibition en millimètre (mm) après incubation ; L'agar Muller-Hinton (MH) stérile a été coulé dans des boites de pétri stériles de 9 cm (20ml). 1 ml de l'inoculum préparé à partir de chaque souche est uniformément bien étalé à la surface de l'agar MH. À L'aide d'une pince stérile les disques (Whatman n°1, 6 mm de

diamètre) imprégnés de 15 µl de chaque huile essentielle sont déposés à la surface de gélose inoculée et incubée à 37°C. Après l'incubation pendant 24heures (Hayes and Markovic, 2002).

L'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondante à l'absence de la croissance. L'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 6 mm. La sensibilité est modérée pour un diamètre compris entre 6 et 13 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 13 mm le germe est très sensible.

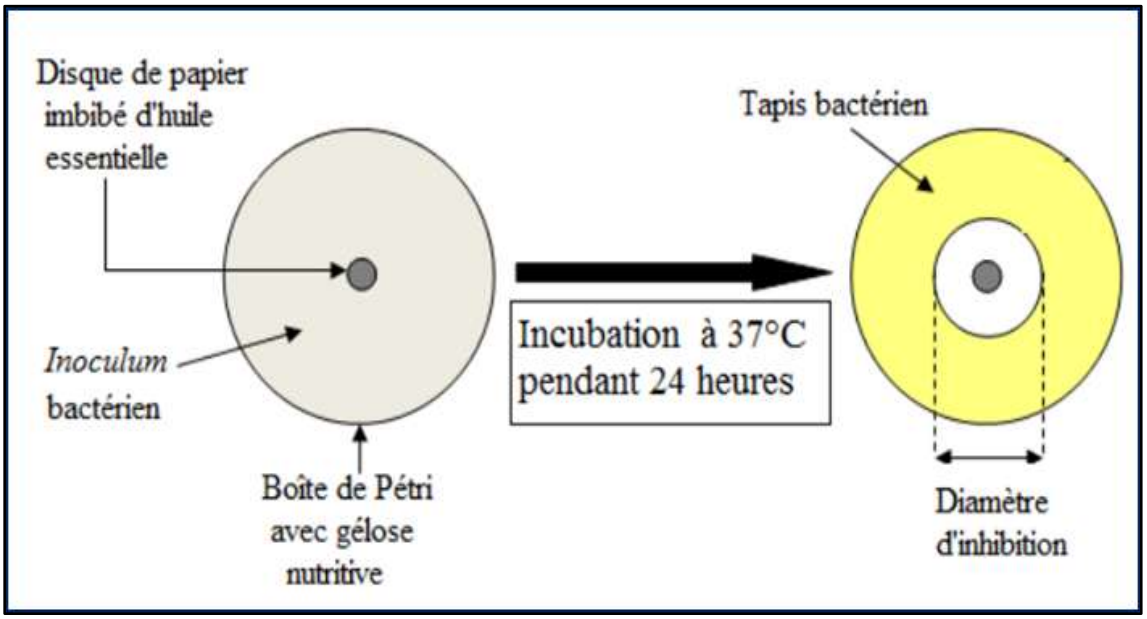


Figure II.8: Principe de la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme).

Des antibiogrammes sont effectués en parallèle avec les aromatogrammes. Des disques sans HE sont déposés sur gélose inoculée pour servir de témoin positif de croissance des bactéries et de s'assurer de l'état et de la conservation des souches testées.

IV.1.6.2. Méthode de macrodilution

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de a été déterminée selon la méthode rapportée par Remmal et al. (1993) avec quelques modifications. Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 % Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300 et 1/500

dans cette solution d'agar. Dans des tubes à essai contenant chacun 8ml du milieu solide LB, stérilisé à l'autoclave pendant vingt minutes à 120 °C et refroidis à la température ambiante, on ajoute aseptiquement 2ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000,1/3000 et 1/5000 (v/v). On agite convenablement les tubes afin de bien disperser l'huile essentielle dans le milieu de culture avant de les verser dans les boîtes de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2% seule, sont également préparés. Le dépôt des souches bactériennes se fait à l'aide de la micropipette.

IV.2. IN VIVO

IV.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L*

- **Activité anti-inflammatoire**

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de nos extraits aqueux a été menée suivant la méthode de Winter et al. (1962). Des lots de 5 rats ont été constitués. Les extraits ont été administrés par voie orale aux doses 150,300 et 500 mg/kg, les mêmes extraits ont été appliqués par voie locale (crèmes à base d'extraits) aux doses de 5% et 10%, 30 min et une heure respectivement avant l'injection de la carragénine 1% (NaCl 0.9%) sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite. La circonférence de la pâte est mesurée avant l'injection de la carragénine, puis au bout de chaque heure à partir de la troisième heure jusqu'à la sixième heure après l'administration de la carragénine. Deux références anti inflammatoires ont été utilisés l'un par voie orale (Diclofénac 1%) et l'autre par voie cutanée (Indométacine/ pommade).

Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation est ensuite calculé à partir de la formule :

% inhibition = ((S_t-S_0) Control – (S_t-S_0) Traité)/ ((S_t-S_0) Control) X 100

S_0= circonférence avant injection de la carragénine

S_t= circonférence à un temps donné après administration de la carragénine.

- **Activité analgésique**

Le test analgésique a été évalué suivant le nombre de contorsions abdominales induites par l'injection intrapéritonéale (I.P) de l'acide acétique (0,7%) (Test de torsion). Des lots de 5 rats ont été constitués. Une heure et demie après l'administration orale des extraits, les rats ont reçu

l'acide acétique 0,7% par voie I.P à la dose de 10 ml/kg. Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale. Après 5 minutes (temps de latence) de l'injection de la solution saline d'acide acétique, nous avons compté pour chaque rat le nombre de torsions pour les 30 minutes suivantes (Hernández-Pérez and Rabanal, 2002).

IV.2.2. Exploration de l'effet diurétique des extraits aqueux de graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L*

IV.2.2.1. Traitement aigu

Les animaux ont été placés chacun dans une cage métabolique adaptée à l'étude de l'activité diurétique pendant une période de 48 heures pour qu'ils puissent s'adapter aux conditions des cages avant l'expérimentation, pendant cette période, on gave les animaux seulement par l'eau distillée. Les rats ont été répartis au hasard en quatre groupes de six rats pour chacun.

Tableau II.1: Différents groupes de rats utilisés pour l'exploration de l'effet diurétique de *Vitex agnus castus L*.

Groupe	Traitement	Dose
1er groupe (n = 6)	Eau distillée (Témoin)	10ml/Kg
2ème groupe (n = 6)	Médicament de référence (Furosémide)	10mg/Kg
3ème groupe (n = 6)	Extrait aqueux des graines de VAC	150mg/Kg
4ème groupe (n = 6)	Extrait aqueux des feuilles de VAC	150mg/Kg

Après administration des substances testées, les échantillons urinaires ont été collectés dans des cylindres gradués après 1, 2, 4,6 et 24 h pour mesurer le volume des urines émises pour chaque rat.

IV.2.2.2. Traitement subchronique

Les extraits des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus*, le furosémide et l'eau distillée ont été administrés à trois groupes de rats pendant 16 jours à des doses similaires à celle de traitement aigu. Immédiatement après le gavage, les rats ont été placés individuellement dans les cages métaboliques avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. L'urine a été collectée le jour 1,4, 8, 12, et 16, puis filtrée, centrifugée et conservée jusqu'au dosage des différents paramètres.

Les prélèvements sanguins ont été effectués à la fin du traitement, par ponction rétroorbitale sur des animaux légèrement endormis au diéthyl éther. Après centrifugation à 3500 RPM pendant 15 minutes, le plasma recueilli est stocké à -20°C jusqu'au jour du dosage des différents paramètres.

IV.2.2.3. Dosages

- ✓ **Dosage du Na+, K+ et Cl-**

Les concentrations en Na^+, K^+ et Cl^- ont été déterminées dans les différents échantillons urinaires et plasmatiques par spectrophotométrie à flamme (FP10-FP20 FLAME PHOTOMETER, SEAC, Italy). 100 µl de l'échantillon sont aspirés par le photomètre à flamme, dilués dans le l'étalon interne puis vaporisés dans une flamme butane-air excitant les atomes de Na^+ K^+ et Cl^-. Les électrons de l'orbital périphérique de l'atome sont projetés à un niveau d'énergie plus élevé et reviennent ensuite à l'état fondamental en émettant des photons dont la longueur d'onde est caractéristique de l'atome. L'énergie produite sous forme de photons est proportionnelle au nombre d'atomes contenus dans l'échantillon vaporisé et donc à la concentration exprimée en mEq/l.

- ✓ **Dosage de la créatinine**

La concentration de la créatinine est estimée par une méthode colorimétrique à l'aide du spectrophotomètre (BioSystems BTS-310 photometer). Dans un milieu alcalin, la créatinine présente dans l'échantillon réagit avec le picrate pour donner un complexe coloré. On mesure la vitesse de formation de ce complexe dans des périodes initiales courtes, évitant ainsi l'interférence d'autres composés. L'augmentation de l'absorbance à 500nm, suite au développement de la coloration, est directement proportionnelle à la concentration en créatinine (Fabiny and Ertingshausen, 1971; Jaffe, 1980).

La clairance de la créatinine ($Clairance_{créat}$), qui nous permet de déterminer la filtration glomérulaire, a été calculée selon la formule suivante :

$$Clairance_{créat}(ml/min) = \left[\frac{U_{créat}}{P_{créat}}\right] \times V$$

Avec :

$U_{créat}$: concentration urinaire de la créatinine,

$P_{créat}$: concentration plasmatique de la créatinine,

V **:** débit urinaire (ml/min).

- ✓ **Dosage de l'urée** :

La teneur en urée est déterminée par le couplage de deux réactions successives. La première est catalysée par l'uréase, donnant lieu à la formation de CO_2 et deux molécules de NH_4^+. Dans la deuxième réaction catalysée par le nitroprussiate, chaque molécule de NH_4^+ réagit avec le salicylate et le NaClO pour former l'indophénol.

$$Urée + H_2O \xrightarrow{Uréase} 2NH_4^+ + CO_2$$

$$NH_4^+ + Salicylate + NaClO \xrightarrow{Nitroprusside} Indophénol$$

L'indophénol formé est un composé coloré quantifiable par spectrométrie, il est directement proportionnel à l'urée transformée, et par la suite, l'urémie sera déduite de l'augmentation de l'absorbance à 600 nm résultant de la production de l'indophénol (Tabacco et al., 1979).

IV.2.2.4. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés par leur moyenne ± S.E.M. Pour déterminer si les moyennes de deux groupes sont significativement différentes, un test t de Student est utilisé. Tandis que la comparaison de plusieurs groupes en même temps fait appel à un test ANOVA. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque la probabilité d'erreur est inférieure à 5% ($P < 0,05$).

Partie III : Résultats et discussion

Chapitre I : Composition chimique des huiles essentielles de *Vitex agnus castus L. et Cymbopogon nardus L.* et leurs activité antioxydante et antibactérienne

I. Introduction

Les infections nosocomiales sont responsables d'une mortalité importante, et posent un sérieux problème au système de santé public malgré les grands progrès dans la compréhension de la pathogenèse microbienne, Au Maroc, le ministère de la santé a élaboré une stratégie nationale de lutte contre les infections nosocomiales en 2004 (Lemsanni, 2016)**.** Cependant, malgré les efforts déployés, le taux d'incidence des infections nosocomiales chez les nouveaux nées reste élevé et il est évalué à 26% des patients admis à l'unité de réanimation néonatale du CHU Hassan II a Fès, durant l'année 2009 (El hammoumi J, 2011).

L'émergence des bactéries multi-résistantes rend la situation plus alarmante. Ainsi, selon un rapport de l'organisation mondiale de la santé, un enfant meurt Toutes les cinq minutes à cause d'une bactérie résistante aux médicaments dans la région de l'Asie du Sud-est (Singh, 2016). Les médicaments qui traitent les maladies mortelles perdent de plus en plus leur efficacité (Singh, 2016). La résistance aux antibiotiques devient la plus grande menace pour la santé publique. D'où la nécessité de se mobiliser en urgence pour chercher des alternatives naturelles pouvant faire face à la résistance bactérienne.

Par ailleurs, les radicaux libres sont impliqués dans l'étiologie d'un grand nombre de pathologie à savoir l'athérosclérose, l'arthrite, l'ischémie, la gastrite, le cancer, le SIDA et les lésions de nombreux tissus y compris le système nerveux central (El-Hela and Abdullah, 2010). Les antioxydants synthétiques (BHT et BHA) utilisés dans les domaines agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques qui devaient apporter une solution au phénomène de stress oxydant sont suspectés d'avoir des effets toxiques et/ou cancérigènes à haute dose (Grice, 1988, 1986; Witschi HP., 1986). L'enjeu scientifique consiste donc à chercher des substances naturelles dotées de pouvoirs antioxydant et antimicrobien et qui peuvent jouer un rôle bénéfique en terme d'action préventive très importante pour la santé humaine.

L'objectif de ce chapitre, est d'évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Vitex agnus castus L.* et *Cymbopogon nardus L.* par des méthodes spectrophotométriques, et

d'estimer leur activité antibactérienne contre des souches responsables des infections nosocomiales via deux méthodes : la méthode de diffusion sur agar qui permet de mesurer le potentiel antibactérien des huiles essentielles sur chaque bactérie en mesurant les diamètres d'inhibition et la méthode de macrodillution qui permet de déterminer leur concentration minimale inhibitrice CMI.

II. Résultats

II.1. Analyse chromatographique des huiles essentielles de *Vitex agnus castus L*

II.1.1. Rendement

Les huiles essentielles des graines et des feuilles sèches de *Vitex agnus castus* ont été extraites par un hydrodistilateur. L'huile essentielle obtenue des graines est de couleur jaune foncé avec un rendement de 1% alors que l'huile obtenue à partir des feuilles est de couleur jaune clair avec un faible rendement qui est de l'ordre de 0,35%.

II.1.2. Composition chimique

La composition de ces huiles essentielles a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Les pics des chromatogrammes des huiles essentielles ont été comparés à ceux des composés de références. Les chromatogrammes des deux huiles essentielles sont présentés dans les figures (III.1 et III.2). Les indices de rétention et les concentrations relatives à chaque composé ont été résumés dans le tableau (III.1).

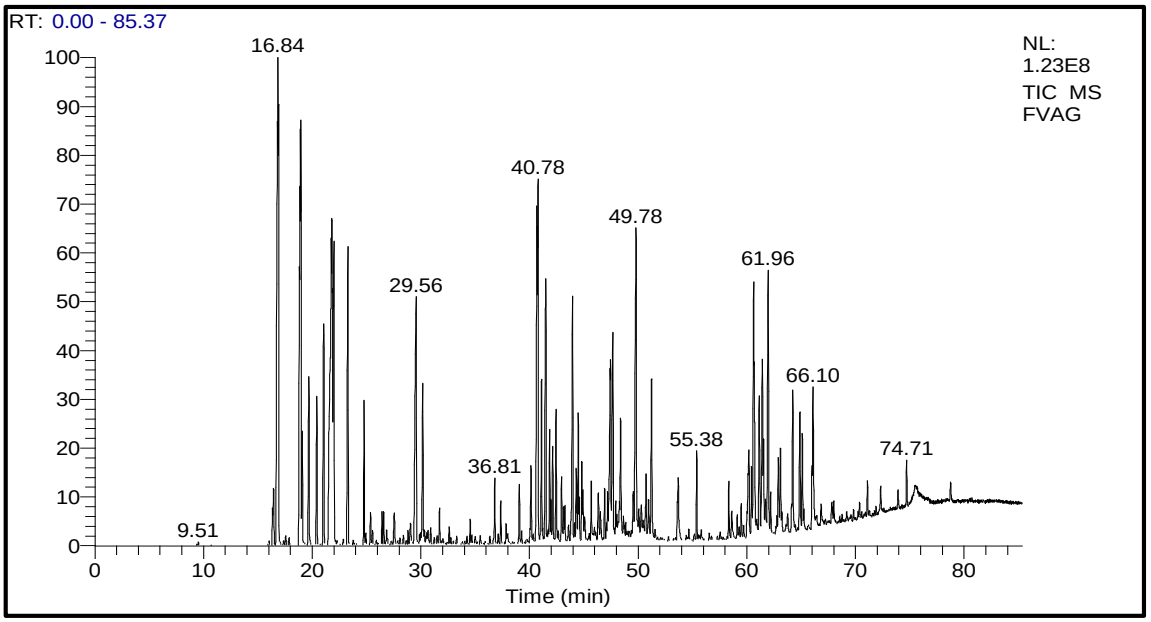


Figure III.1: Chromatogramme de CPG/SM d'huile essentielle des graines de *Vitex agnus castus*.

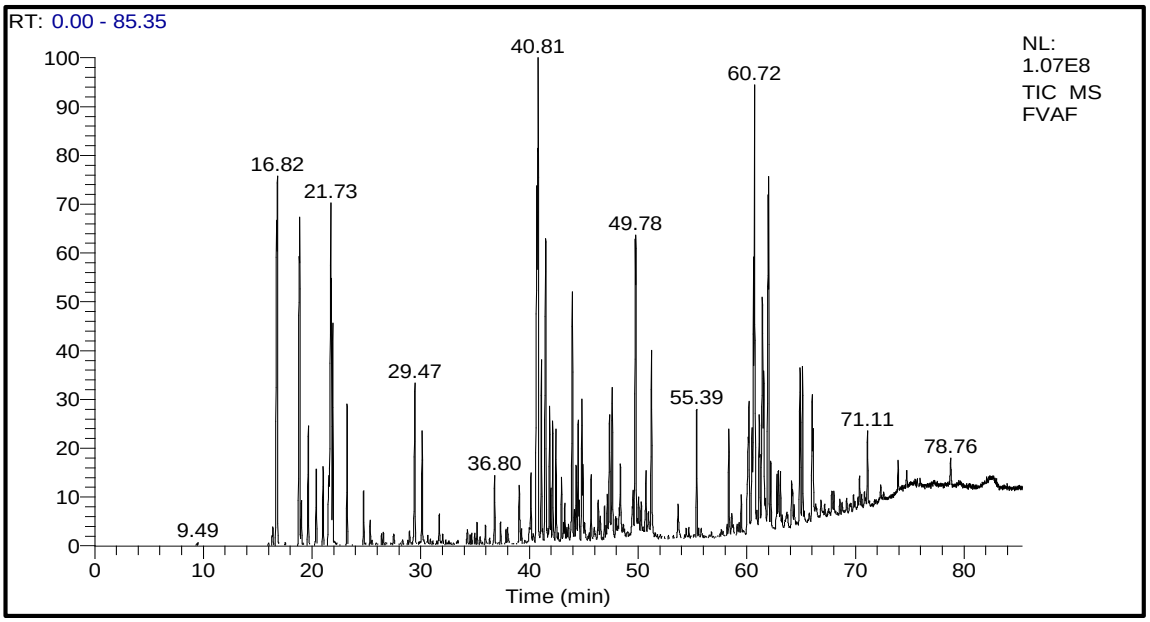


Figure III.2: Chromatogramme de CPG/SM d'huile essentielle des feuilles de *Vitex agnus castus*.

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a permet d'identifier Vingt-neuf composés dans l'huile des graines présentant un pourcentage de 93,1%. Les composés majoritaires de l'huile essentielle des graines sont le 1,8-Cinéole (11,6%), l'α-Thujène (9,3%), le Phyllocladène (8,2%), l'α-Pinène (7,9%), le Caryophyllène (5,9%) et le Cubénol (5 %). De plus, 28 composés ont été trouvés dans l'huile essentielle des feuilles représentant un pourcentage de 90,5%. Le composant majoritaire était le Caryophyllène (9,5%), suivi du 1,8-

Cinéole (8,7%), de l'oxyde de Manoyle (7,3%), de l'acétate d'Eugényle (7,1%), du Phyllocladène (6,8%) et de l'α-Pinène (5,2%). Il est à Noter que certains composés existent dans l'huile essentielle des graines (α-longipinène, globulol et docosène) mais ils sont absents dans l'huile essentielle des feuilles. De même, il existe d'autres composants dans l'huile essentielle des feuilles mais ils sont absents dans l'huile essentielle des graines (manool et sclaréol).

Tableau III.1: Composition chimique des huiles essentielles des feuilles et des graines de *Vitex agnus-castus L.*

Constituants	Indice de rétention (IR)	Feuilles (%)	Graines (%)
α-Thujène	921	6,4	9,3
α-Pinène	930	5,2	7,9
Sabinène	974	1,2	1,6
α- Phellandrène	1006	0,8	1,2
1,4-Cinéole	1017	0,7	2,1
1,8-Cinéole	1029	8,7	11,6
Fenchone	1092	1,1	2,7
Fenchol	1131	0,4	1,1
Estragol	1175	1,8	3,7
Carvone	1246	1,1	1,9
Caryophyllène	1366	9,5	5,9
α-Longipinène	1396	-	1,2
Acétate d'Eugenyl	1438	7,1	4,6
Oxyde de Caryophyllène	1489	5,0	2,2
Globulol	1521	-	1,8
Cedrol	1554	2,0	1,1
Cubénol	1588	3,5	5,0
Torreyol	1622	0,8	1,2
α-Santanol	1670	5,3	4,1
β-Santanol	1714	2,2	1,8
Santanol acetate	1766	1,2	0,8
Cedrane -diol	1822	1,1	0,4
epi – Manool	1883	2,3	1,1
Oxyde de manoyle	1919	7,3	3,5
Phyllocladène	1956	6,8	8,2
Manool	2058	4,6	-
β-Hydroxy isopimarene	2066	1,3	1,6
Docosene	2156	-	1,4
Docosane	2214	2,0	2,1
Sclaréol	2336	1,5	-
Totarol	2356	2,4	2,0

II.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus*

II.2.1. Rendement

Les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles sèches de *Cymbopogon nardus* de rabat sont de couleur jaune claire avec une odeur fraiche. Le rendement enregistré est de l'ordre de 1%.

II.2.2. Composition chimique

Les huiles essentielles de la citronnelle ont été était analysée par CPG-SM. Le chromatogramme est présenté dans la figure (III.3).

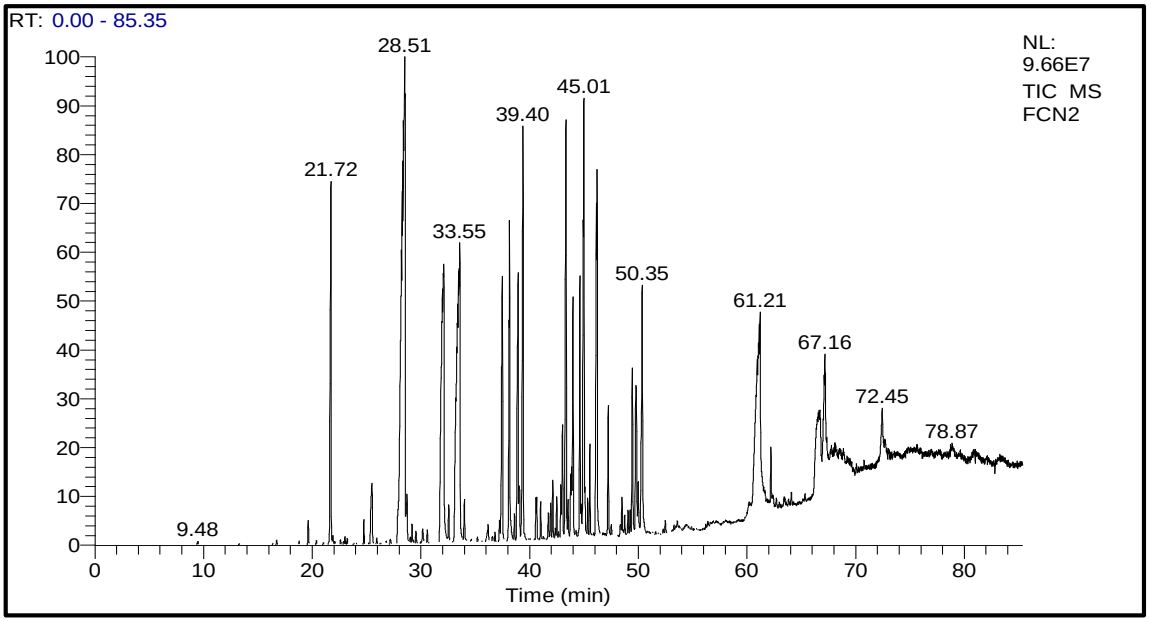


Figure III.3: Chromatogramme de CPG/SM d'huile essentielle des feuilles de *Cymbopogon nardus.*

Un total de treize composés chimiques a été identifié présentant un pourcentage de 90,4% de l'huile (Tab. III.2). Les principaux constituants de cette huile sont : le citronellal (16,9%), le citronellol (10,4%), l'élémol (9,1%), le nérol (8%), l'acétate de citronellyle (7,6%), le β - Cubinène (7,2%) et l'acétate de géranyle (7%).

Tableau III.2: Composition chimique des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus L.*

Composés	Pourcentage %	Indice de rétention
Limonène	3,5	1029
Citronellal	16,9	1155
Nérol	8	1229
Citronellol	10,4	1230
Néral	3	1242
Géraniol	3	1257
Citronellyl Acétate	7,6	1355
Eugénol	4,5	1359
Acétate de géranyle	7	1385
β-Elemene	4,8	1394
β -cubinène	7,2	1533
Elemol	9,1	1550
Germacrene-D-4-ol	5,4	1567

II.3. Activité antioxydante des huiles essentielles de *Vitex agnus castus* et *Cymbopogon nardus*

Plusieurs techniques peuvent évaluer la capacité antioxydante in vitro des huiles essentielles en se basant sur la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un agent antioxydant tels que les huiles essentielles. Dans la présente étude, Notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois tests différents : la capacité antioxydante totale (CAT), piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).

II.3.1. Le piégeage du radical libre DPPH·

C'est une technique très utilisée qui permet d'évaluer la capacité antioxydante d'un échantillon donné d'une manière simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical **DPPH •** (Villaño et al., 2007). Des dilutions en cascade des HE des deux espèces étudiées ainsi que le témoin (BHT) ont été préparées. Les densités optiques des différentes dilutions ont été mesurées à 517 nm. Les valeurs obtenues permettent de tracer des courbes qui présentent le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations croissantes (fig. III.4).

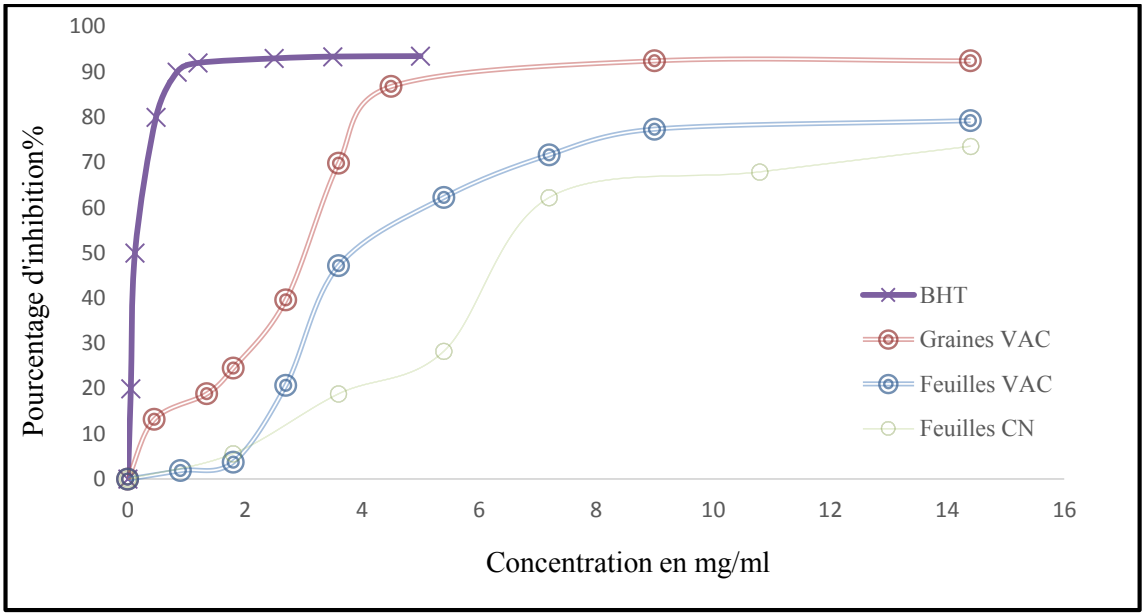


Figure III.4: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles étudiées et du BHT.

A partir de la figure (III.4), on constate que le potentiel antioxydant des échantillons augmente en fonction de la concentration. A partir des courbes, on peut déterminer la valeur de l'IC_{50} qui correspond à la concentration nécessaire pour neutraliser 50% du radical libre DPPH. (Tab. III.3).

Tableau III.3: Activités antioxydantes des huiles essentielles étudiées en comparaison avec les standards.

	DPPH (IC_{50} en mg/l)	FRAP (EC_{50} en mg/l)	AAT (mg Eq Vit C /g HE)
Feuilles VAC	$4,75 \pm 0,1^{b}$	$9,23 \pm 1,4^{b}$	$262,09 \pm 30,76^{c}$
Graines VAC	$3,11 \pm 0,13^{c}$	$6,88 \pm 0,8^{c}$	$443,21 \pm 38,42^{b}$
Feuilles CN	$6,62 \pm 0,21^{a}$	$13,04 \pm 1,03^{a}$	$125,90 \pm 17,90^{d}$
BHT	$0,12 \pm 0,01^{d}$	-	$540,62 \pm 40^{a}$
Quercétine	-	$0,03 \pm 00^{d}$	$512,70 \pm 15^{a}$

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD, les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,01$).

Le pouvoir antioxydant du BHT reste significativement supérieur à celui des huiles essentielles des deux espèces étudiées. Cependant, parmi les trois huiles essentielles, l'essence des graines VAC présente la plus grande activité antioxydante avec l'IC_{50} de l'ordre de 3.11 ± 0.13 mg/ml. L'essence des feuilles de la même plante possède également un pouvoir antioxydant modéré avec une IC_{50} de l'ordre de 4.75± 0.1 mg/ml. Le potentiel antioxydant

significativement le plus faible a été enregistré pour les huiles essentielles de *Cymbopogon nardus L.*

II.3.2. Pouvoir réducteur (FRAP)

L'évaluation du pouvoir réducteur de fer de nos composés est déterminée par rapport à la Quercétine. Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimé en absorbance en fonction de la concentration des huiles essentielles étudiées. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante (Fig. III.5)

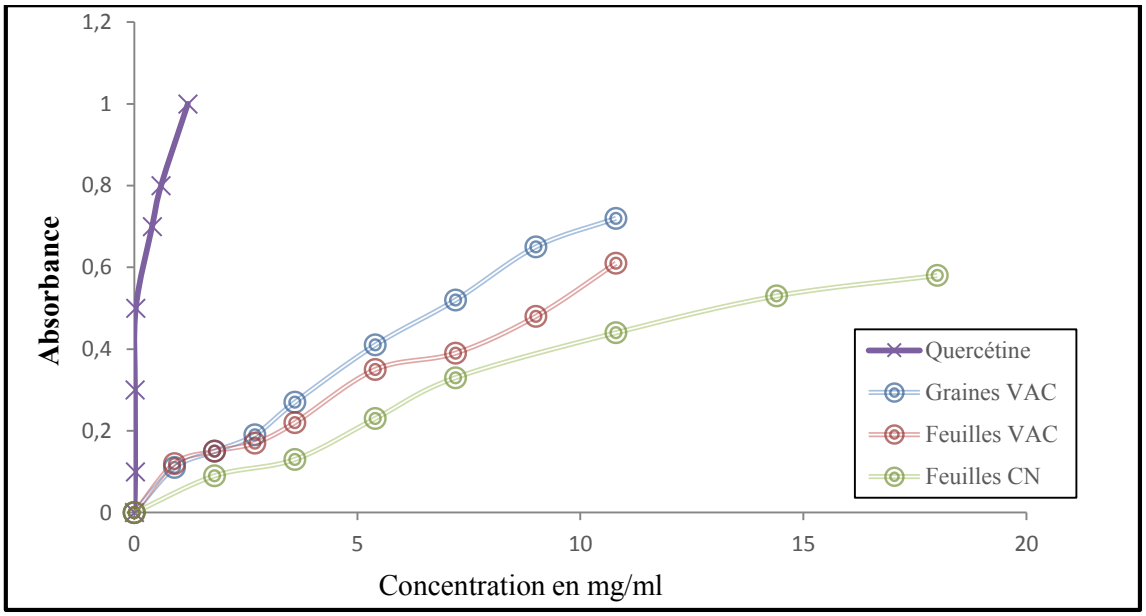


Figure III.5: Absorbance en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles étudiées et de la Quercétine.

Le pouvoir réducteur du fer des huiles essentielles a été comparé en se basant sur la concentration efficace EC_{50} qui est définie comme la concentration nécessaire de l'échantillon qui peut réduire 50 % du fer. Les résultats sont présentés dans le tableau (III.3). D'après ces résultats, on remarque un profil d'activité similaire à celui présenté dans le test de DPPH. Les graines VAC présente significativement le meilleur pouvoir réducteur avec une EC_{50} de 6.88 mg/ml suivi par les feuilles VAC et les Feuilles CN. Toutes les huiles testées présentent un pouvoir réducteur très significativement inférieur à celui de la Quercétine.

II.3.3. Capacité antioxydante totale

La Capacité antioxydante totale des huiles essentielles des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus* , de la citronnelle et des antioxydants de référence (la Quercétine et le BHT) ont été déterminés par la méthode du phosphomolybdène, qui est basée sur la réduction de Mo (VI)

en Mo (V) en présence d'un agent antioxydant (Prieto et al., 1999). Les résultats sont exprimés en (mg Eq Vit C /g HE) et sont présentés dans le tableau (III.3). La capacité antioxydante totale de l'huile essentielle des graines VAC était significativement meilleure par rapport à celle des feuilles VAC et des feuilles CN. Toutefois les capacités antioxydantes totales des différents échantillons restent significativement inferieures à celles du BHT et de la Quercétine.

II.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles

L'activité antibactérienne de nos huiles essentielles a été évaluée par la technique de diffusion sur disque vis-à-vis de 5 souches de bactéries responsables d'infections nosocomiales chez les nouveaux né dans les services de réanimation néonatale au centre hospitalier universitaire à Fès. Pour pouvoir confirmer et comparer l'effet antibactérien des huiles concernées, on s'est basé sur La détermination du CMI par la méthode de microdilution. La CMI est la concentration minimale inhibitrice qui correspond à la faible concentration d'un agent actif capable d'inhiber totalement la croissance d'une bactérie donnée. Les résultats sont présentés dans les tableaux (III.4 et III.5).

Tableau III.4: Activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées et des antibiotiques exprimés en diamètre d'inhibition.

Souches bactériennes	Zone d'inhibition (mm)			
	Huiles essentielles			Antibiotiques
	Feuilles VAC	Graines VAC	Feuilles CN	
S.aureus	16,3± 0,3	20 ± 0,43	14 ± 0,3	0(P), 16(K), 24(CTX), 39(IMP)
E.coli	14 ± 0,6	17,6 ± 00	18 ± 0,5	0(AMX) ,0(CTX) ,0(K), 37(IMP)
K.pneumoniae	13 ± 3	16 ± 00	10 ± 1,2	0(AMX) ,0(CTX) ,0(K), 26 (IMP)
P.aeruginosa	12 ± 0,3	15 ± 0,5	11 ± 0,7	0(AMP) ,0(CTX) ,0(NOR),14(IMP)
P.mirabilis	12,3 ± 0,3	13,6 ± 0,3	10 ± 0,4	0 (AMX), 0(PT), 18(K), 22(IMP)

Les résultats montrent clairement que toutes les souches bactériennes sont sensibles aux huiles essentielles testés avec des diamètres d'inhibition allant de 10 ± 1,2 mm à 20 ± 0,43mm. Ces valeurs sont inférieures à celles d'IMP qui est très recommandé par les cliniciens dans le cas des infections nosocomiales, Cependant ces valeurs sont supérieures à celles d'autres antibiotiques aux quels résistent fortement les bactéries testées ((AMX), (CTX), (K)). Généralement, ce sont les huiles des graines de *Vitex agnus castus* qui 'ont enregistrées les

meilleurs diamètres d'inhibition par rapport aux huiles des feuilles de la même plante et les feuilles de la citronnelle.

Une interprétation globale des résultats du tableau (III.5), montrent clairement que les valeurs des CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition, les huiles ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMI sur les souches correspondantes. C'est le cas des huiles essentielles des graines de *Vitex agnus castus* contre *S. aureus* (diamètre de 20 ± 0,43 et CMI de 0,703 mg/ml) et les huiles essentielles des feuilles CN contre *E. coli* (diamètre de 18 ± 0,5 et CMI de 0,703 mg/ml).

Tableau III.5: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles étudiées (en mg/ml).

Souches bactériennes	Feuilles VAC	Graines VAC	Feuilles CN
S.aureus	1,4	0,703	2,8125
E.coli	2,8125	0,703	0,703
K.pneumoniae	2,8125	1,4	5,625
P.aeruginosa	5,625	2,8125	5,625
P.mirabilis	5,625	5,625	5,625

III. Discussion

III.1. Rendement et composition des huiles essentielles de *Vitex agnus castus L.*

Nous rappelons que les huiles essentielles du *Vitex agnus castus L* ont été obtenues par un appareil d'hydrodistillation. L'huile essentielle obtenue des graines est de couleur jaune foncé avec un rendement de 1% .Ce rendement est plus important que ceux des graines récoltées en Serbie et en Grèce qui étaient respectivement de l'ordre de 0,72 % et 0,7 % (Ajdžanović et al., 2012; Sorensen and Katsiotis, 1999). Pour les huiles essentielles des feuilles de la même plante, le rendement obtenu est de l'ordre de 0,35%. Il est très faible en comparaison avec ceux cités dans la littérature (Hamid et al., 2010; Katiraee et al., 2015) (Tab.III.6).

Tableau III.6: Rendement en huiles essentielles selon l'origine géographique et la partie de la plante étudiée.

Origine géographique	Serbie	Grèce	Iran	Nigeria
Parties étudiées	Graines	Graines	Feuilles	Feuilles
Rendement	0,72%	0,7%	1,3%	0,8%
Références	Ajdžanović et al., 2012	Sorensen and Katsiotis, 1999	Katiraee et al., 2015	Hamid et al., 2010

Le tableau (III.6) montre une variation du rendement en huiles essentielles selon l'origine géographique et la partie de la plante étudiée. Cependant, d'autres facteurs peuvent affecter ce rendement tel que la méthode d'extraction et la période de la cueillette de la matière végétale. Les facteurs externes peuvent également influencer le rendement en huiles essentielles comme la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement et la composition du sol. (Bruneton, 1999b).

En ce qui concerne la composition chimique, Vingt-neuf composés ont été identifiés dans l'huile essentielle des graines après analyse par chromatographie en phase gazeuse, présentant un pourcentage de 93,1%. Les composés majoritaires de l'huile essentielle des graines sont le 1,8-Cinéole, l'α-Thujène, le Phyllocladène, l'α-Pinène, le Caryophyllène et le Cubénol. L'analyse des huiles des feuilles, a permet de détecter la présence de vingt-huit composés dont les majoritaires sont le Caryophyllène, le 1,8-Cinéole, l'oxyde de Manoyle l'acétate d'Eugényle, le Phyllocladène et l'α-Pinène.

La composition chimique des huiles essentielles des feuilles et des fruits du gattilier marocain obtenue dans cette étude a été comparée avec celle d'autres pays ; En Iran, l'analyse de la composition chimique a montré que l'oxyde de caryophyllène (24,9%), le n-hexadécane (12,5%) et l'acétate d'α-terpinyle (11,6%) constituent les principaux composants de l'huile essentielle des fruits de VAC (Ghannadi et al., 2012). Cependant, en Turquie, ce sont le sabinène et le 1,8-cinéole qui constituent les composants majeurs des fruits de VAC (Sarikurkcu et al., 2018). En 2014, les graines de *Vitex agnus castus* originaire de l'Albanie ont été analysé, les résultats ont montré que les composés majoritaires sont : le 1,8-cinéole (14,2%), le sabinène (8,2%) (Dervishi-shengjergji et al., 2014), le ß-farnésène (7,5%), l'acétate de terpényle (7,1%), le ß-caryophyllène (6,8%) et le sclaréol (6,3%) .

Stojković et al. 2011 ont aussi étudié la composition chimique des huiles essentielles des feuilles du gattilier provenant du Monténégro, ils ont montré que Les principaux constituants de cette huile sont le 1,8-cinéole (22,0%), le trans-β-farnésène (9,4%), l' α -pinène (9,4%), le trans-β-caryophyllène (8,2%) et le terpinène-4-ol (7,8%). Toutefois, Hamid et al, 2010 ont trouvé 34 composés dans l'huile essentielle des feuilles récoltés à Nigeria, représentant 98,5% de l'huile essentielle. Les composés majoritaires de cette huile sont le β-pinène (20,0%), l'a-pinène (9,1%), le cis-ocimène (8,4%), le 1,8-cinéole (6,7%), le terpinène-4-ol (4,2%), β-phellandrène (4,1%) et α-terpinéol (4,1%). Selon des résultats publiés récemment, les principaux composés de l'huile essentielle des feuilles d'Iran sont l'α-pinène (14,8%), le limonène (10,2%), le β-caryophyllène (6,9%), le sabinène (5,2%) et le β-farnésène (5,9%) (Khalilzadeh et al., 2015).

La composition de nos huiles essentielles est différente de celle des autres pays qualitativement et quantitativement. Ces variations dans la composition des huiles volatiles de VAC semblent dépendre à la fois des facteurs intrinsèques (génétiques) de la plante, des facteurs extrinsèques : Ecologiques et environnementaux. La partie de la plante distillée et Les méthodes de distillation peuvent également influencer la composition des huiles essentielles (Asdadi et al., 2015; Sorensen and Katsiotis, 1999). En outre, Les huiles essentielles des feuilles et des graines de VAC sont riches en monoterpènes par rapport aux sesquiterpènes. Ceci est en parfait accord avec des études publiées récemment qui ont démontré la richesse de différentes parties (feuilles, graines, et fleurs) de *Vitex agnus castus* en monoterpènes (Habbab et al., 2016; Neves and Da Camara, 2016).

III.2. Rendement et composition chimique des huiles essentielles de *Cymbbopogon nardus L.*

Les huiles essentielles obtenues par distillation des feuilles de *Cymbopogon nardus* ont été de couleur jaune claire avec un rendement de l'ordre de 1%. Ainsi, Nos échantillons sont riches en huile essentielle par rapport à ceux d'Ouganda, dont le rendement ne dépasse pas 0,36% (Ocheng et al., 2015). Cependant, Ce rendement reste inférieur à celui d'autres espèces du même genre comme *C. schoenanthus* L qui peut atteindre 2,6% (Khadri et al., 2008).

Un total de Treize composés chimiques a été identifié dont Les majoritaires sont : le citronellal (16,9%), le citronellol (10,4%), l'élémol (9,1%), le nérol (8%), l'acétate de citronellyle (7,6%), le β -Cubinène (7,2%) et l'acétate de géranyle (7%). Ces résultats ont été comparés avec ceux des études antérieurs ; Un pourcentage plus élevé de citronellal a été trouvé

dans les huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* de Togo (35,5%) (Koffi et al., 2009a) et du brésil (37,7%) (Trindade et al., 2015) par rapport à (16,9%) détectés dans la présente étude. Cependant, la concentration de différents composés était totalement différente dans l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* provenant de Thaïlande dont les composées majoritaires sont : le Geraniol (35,7%), le trans-citral (22,7%), le cis-citral (14,2%), géranyl acétate (5,8%), le citronellal (5,8%) et le citronellol (4,6%) (Nakahara et al., 2003). En outre, le limonène détecté dans nos échantillons avec un pourcentage de 3,5% est absent dans les huiles essentielles du Thaïlande, cependant le même composé est présent dans les huiles essentielles du Togo avec un pourcentage élevé de 10.7% (Koffi et al., 2009a). La variation qualitative et quantitative des métabolites secondaires est due à la présence de différents chémotypes ou races chimiques au sein de la même espèce, qui diffèrent principalement par le pourcentage du citronellal (Mahalwal and Mohd, 2003). Les conditions climatiques et les méthodes de distillation peuvent aussi influencer significativement la composition des huiles essentielles (Sørensen and Katsiotis, 2000).

III.3. Activité antioxydante des huiles essentielles de *Vitex agnus castus* L. et *Cymbopogon nardus L.*

L'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées a été évaluée par trois tests différents mais complémentaires. Les résultats montrent que les graines de *Vitex agnus castus* possèdent significativement le meilleur potentiel antioxydant par rapport aux autres échantillons, Cependant, ce potentiel reste modéré et significativement inférieur à celui de l'antioxydant de référence (BHT et Quercétine).

Une étude récente menée par Asdadi et al. 2015 a évalué l'activité antioxydante des graines de *Vitex agnus castus* qui poussent dans l'arganeraie du Maroc par le test de DPPH. Les résultats ont révélé que ces huiles possèdent une activité antioxydante modérée, avec une IC_{50} qui est de l'ordre de 1,072 mg/ml, mais plus importante que celle des huiles qui font objet de la présente étude (IC_{50} = 3,11 ± 0,13 mg/ml)**.** D'autres résultats ont montré que les huiles essentielles des feuilles de *Vitex agnus castus* de la Türkiye possèdent une activité antioxydante très importante avec une valeur d'IC_{50} de l'ordre de 27,16 µg/ml (Katiraee et al., 2015). Il semble que l'activité soit liée à la présence de certains composés dans les HE. Le rôle principal de tels composés comme réducteurs de radicaux libres a été mis en évidence dans plusieurs rapports (Villaño et al., 2007). α-pinène et le sabinène, possèdent une activité antioxydante importante (Bae et al., 2012; Lesjak et al., 2014) Nos huiles essentielles contiennent un pourcentage important d' 'α-

pinène (7,9% dans les graines et 5,2% dans les feuilles). Cependant, le pourcentage du sabinène est faible (1,2% dans les feuilles et 1,6% dans les graines), ceci peut expliquer en partie l'activité antioxydante modérée de nos échantillons.

Les propriétés antioxydantes des espèces de Cymbopogon n'ont pas été suffisamment évaluées. Cependant, les huiles essentielles du *Cymbopogon schoenanthus* L. de trois régions différentes de la Tunisie ont démontré une activité antioxydante importante surtout celle récoltée du désert , et elle est donc considérée comme un antioxydant puissant (Khadri et al., 2008). L'infusion et la décoction des feuilles de *Cymbopogon citratus* possèdent aussi effet puissant de réduction les radicaux libres DPPH (Cheel et al., 2005). Dans la présente étude, les huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* présentent le pouvoir antioxydant le plus faible par rapport aux feuilles et aux graines de *Vitex agnus castus* avec un IC 50 de l'ordre 6,62 ± 0,21 mg/ml.

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP, montrent que les huiles essentielles étudiées possèdent un pouvoir réducteur très significativement faible en comparaison avec la quercétine, Cependant, l'huile essentielle des graines possède une bonne affinité à l'ion Fe^{2+} par rapport aux autres échantillons avec une valeur d'EC_{50} de l'ordre de 6,88 ± 0,8 mg/ml. Cette valeur est largement supérieure à celle trouvée par Sarikurkcu et al. 2009 qui est de l'ordre de 1mg/ml en étudiant l'activité réductrice des huiles essentielles des graines de *Vitex agnus castus* récolté en Türkiye**.** Plusieurs Travaux de recherche ont confirmé la présence d'une forte corrélation entre le pouvoir réducteur des extraits de plantes et leurs richesses en flavonoïdes et en polyphenols (Sarikurkcu et al., 2018; Tangjitjaroenkun, 2018).

III.4. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Un extrait est considéré actif, lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10mm (Tekwu et al., 2012). Ainsi, toutes les huiles testées sont actives comme des agents antibactériens. D'après les résultats, on peut remarquer que *S. aureus* est la bactérie la plus sensible aux huiles essentielles des feuilles et des fruits du gattilier avec un diamètre d'inhibition respectivement de l'ordre de 16mm et 20mm et des CMI de l'ordre de 1,4 et 0,703mg/ml. Ce résultat est en parfait accord avec les travaux antérieurs qui ont montré que les huiles essentielles sont plus efficaces contre les bactéries gram+ par rapport aux bactéries gram-. Ceci peut être dû d'une part à l'action de certains composés volatiles de l''huile essentielle étudiée et d'autre part à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez

les bactéries gram- qui pourrait fonctionner comme une barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule (Bagamboula et al., 2004; Hammer et al., 2003; Upadhyay and Ahmad, 2010). Toutefois, *E. coli* s'est avérée très sensible, aux huiles essentielles des graines et des feuilles avec des diamètres d'inhibition respectivement de l'ordre de 17mm et 14 mm bien qu'elle est gram négatif. Il a été suggéré que les huiles essentielles actives contre les bactéries gram- contiennent des composants de petite taille qui peuvent franchir les protéines membranaires et accéder au cytoplasme des bactéries pour déclencher la lyse cellulaire (Dorman and Deans, 2000). D'autre part, l'activité inhibitrice démontrée des huiles essentielles de *Vitex agnus castus* contre certaines souches antibactériennes semble plus forte comparée aux mêmes bactéries testées dans des études précédentes. En effet, pour les deux huiles des feuilles et des graines de VAC, les diamètres d'inhibition enregistrés pour *Staphylococcus aureus*, *klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* se sont avérés plus importants que ceux trouvés pour les mêmes souches comme a été rapporté dans certains travaux (Habbab et al., 2016).

Le diamètre d'inhibition le plus faible de l'huile essentielle des feuilles de *Vitex agnus castus* a été enregistré contre *Pseudomonas aeruginosa,* ceci est probablement dû à la capacité de cette bactérie à former un biofilm contre les différents agents antimicrobiens (Abi-Ayad et al., 2011).

Concernant les huiles essentielles de *Cymbopogon nardus*, les résultats étaient aussi prometteurs. A l'exception de la souche *E. coli*, Ces huiles ont témoigné d'une activité inhibitrice moindre par rapport à ceux des feuilles et des graines du gattilier contre les autres souches bactériennes. Néanmoins, leur activité antibactérienne demeure non négligeable appuyée par les travaux antérieurs réalisés sur un ensemble de bactéries gram- et gram +. Selon une étude réalisée par Hammer et al., 2003, les huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* inhibait la croissance de divers types d'agents pathogènes humains tels que *Acinetobacter baumanii, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Serratia marcescens* et *Staphylococcus aureus*. En outre, Wei and Wee, 2013 ont démontré que cette huile était capable d'inhiber la croissance des 36 isolats bactériens provenant d'animaux aquatiques d'élevage.

En général, les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont été principalement attribuées à leur composés majoritaires tel que les monoterpènes C_{10} et les sesquiterpènes C_{15}, qui sont capables de former des liaisons hydrogène avec les sites actifs des enzymes cibles, bien que d'autres terpènes actifs, ainsi que des alcools, des aldéhydes et des esters puissent contribuer à l'effet antimicrobien global des huiles essentielles (Belletti et al., 2004). Les huiles

essentielles de *Vitex agnus castus* sont riches en monoterpènes : *α*-Thujene, *α*-Pinene, et le 1,8 cinéol. Ce dernier composé est très connu par leur activité antimicrobienne contre un large éventail de bactérie et de champignons. Néanmoins, les huiles de *Cymbopogon nardus* sont riches en citronellol, citronellal et Elemol. Il est possible que d'autres composés mineurs présentent également un effet antibactérien d'où un effet de synergie entre les divers composants de l'huile essentielle est possible (Saranya and Gowrie, 2018).

La plupart des travaux antérieurs cités dans la littérature qui s'intéressent à l'activité antibactérienne des huiles essentielles, s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de cette activité sans préciser leur mécanisme d'action. Etant donné que les huiles essentielles sont des mélanges complexes de plusieurs métabolites secondaires, un certain nombre de mécanismes d'action peuvent intervenir dans cet effet antibactérien. Selon plusieurs chercheurs, les huiles essentielles pénètrent dans la bicouche lipidique de la membrane bactérienne grâce à leur caractère hydrophobe, ce qui modifie la perméabilité membranaire et perturbe le processus de transport ionique. Ces changements aboutissent à la destruction du matériel génétique conduisant ainsi à la mort de la cellule bactérienne (Bajpai et al., 2012; Moreira et al., 2005; Sikkema et al., 1995) .

Les résultats de ce travail montrent que les huiles essentielles de *Vitex agnus castus* et de *Cymbopogon nardus* sont efficaces comme agents antibactériens contre les différentes souches responsables d'infections nosocomiales chez les nouveaux nés dans les services de réanimations néonatales à l'hôpital CHU de Fès. Une étude récente à évaluer pour la première fois, l'efficacité de certaines huiles essentielles dans la réduction de la contamination microbienne dans un établissement de santé composé de deux étages. La contamination dans les salles et les couloirs a été surveillée pendant 5 mois. Les résultats ont montré une réduction importante de la contamination bactérienne et fongique entre les pièces nettoyées à l'aide d'une désinfection standard utilisée seule et les pièces nettoyées à l'aide d'une désinfection standard en association avec la nébulisation d'huiles essentielles. Les chercheurs qui ont entamés cette étude ont remarqué une diminution moyenne de 90% pour les levures et les moisissures, une diminution des prescriptions d'antibiotiques (70%),des mucolytiques (100%), des bronchodilatateurs (100%), des anti-inflammatoires stéroïdiens (67%) et non stéroïdiens (33%) sans aucun effet indésirable chez les patients (Gelmini et al., 2016). Ainsi, Le mélange d'HE choisit par Gelmini et al, (*Lavandula angustifolia , Melaleuca cajuputii , Abies sibirica , Myrtus communis* et *Pelargonium graveolens*), possèdent un potentiel important pour réduire à la fois

la contamination microbienne et la consommation de médicaments dans un environnement hospitalier.

Nos huiles essentielles peuvent être utilisées dans des diffuseurs d'arômes en tant qu'outil de purification et de désinfection dans les établissements de santé et principalement les unités de réanimation néonatales, ceci peut réduire l'incidence des infections nosocomiales chez les nouveaux nés et faire face à la mortalité à cause des germes multirésistants.

IV. Conclusion

Les résultats de ce travail montrent que les huiles essentielles des plantes étudiées possèdent une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis des souches bactériennes résistantes responsables des infections nosocomiales dans les services de réanimation néonatale, et sont dotées aussi de propriétés antioxydantes. Ainsi, Ces huiles peuvent être utilisées comme désinfectant dans les établissements de soins afin de prévenir les infections nosocomiales, et comme des antioxydants naturels dans le domaine pharmaceutique et agroalimentaire. Néanmoins, des études supplémentaires doivent êtres entamés pour confirmer la sécurité de ces huiles et purifier le ou les composées responsables de leurs effets.

Chapitre II : Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitex agnus castus L.* et *Cymbopogon nardus* L.par deux techniques différentes : soxhlet et macéré

I. Introduction

La technique dite Soxhlet est une méthode conventionnelle d'extraction qui permet le traitement de la matière végétale en grande quantité avec les différents types de solvants. Elle possède de nombreux avantages tels que la durée d'extraction, et le nombre d'échantillons à traiter pendant la même manipulation. Cependant, quelques substances qui sont sensibles à la température peuvent être détruites au cours de l'extraction (Berrghioua, 2016)

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple qui se base sur l'affinité des molécules pour différents solvants. Elle consiste à mettre en place le matériel végétal avec le solvant d'extraction avec ou sans agitation. Elle nous permet d'obtenir des extraits riches en molécules d'intérêt. Toutefois, elle peut présenter certains inconvénients tels que la perte de certains composés pendant la concentration des échantillons ainsi que des problèmes écologiques comme l'élimination des solvants d'extraction (Azmir et al., 2013; Ibáñez et al., 1998).

Dans ce chapitre, on a procédé aux dosages des différents métabolites secondaires présents dans quatre extraits (éthanol, méthanol, eau et acétate d'éthyle) des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus L*, ainsi que les feuilles de *Cymbopogon nardus L*, et a l'évaluation de leur activité antioxydante et antiradicalaire à froid par la technique du macérée et à chaud par la technique du soxhlet.

II.Résultats

II.1. Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitex agnus castus L.* et *Cymbopogon nardus L.* par la technique de soxhlet

II.1.1. Rendement des extraits

Les rendements des extractions ont été calculés par rapport au poids sec total et ils sont reportés dans le tableau (III.7). A partir des résultats, on constate que quelle que soit la plante

etudiée, c'est l'extrait aqueux qui donne le rendement le plus élevé, suivi par l'extrait méthanolique et l'extrait ethanolique. Cependant l'extrait d'acétate d'éthyle donne le rendement le plus faible ; 2,04% pour les graines VAC, 4,2% pour les feuilles VAC et 4,33% pour les feuilles CN.

Tableau III.7: Rendements d'extraction obtenus à partir de *Vitex agnus castus* (graines et feuilles) et *Cymbopogon nardus* (Feuilles) par les différents solvants (Ethanol, méthanol, acétates d'éthyle et l'eau).

Extraits	Rendement (%)		
	Graines VAC	Feuilles VAC	Feuilles CN
Eau	24	28	34
Méthanol	6,3	12	16
Ethanol	7,2	18	12
Acétate d'éthyle	2,04	4,2	4,33

II.1.2. Résultats de l'analyse qualitative (Criblage phytochimique)

Les tests phytochimiques consistent à identifier les différents métabolites secondaires présents dans les deux espèces étudiées (*Vitex agnus castus et Cymbopogon nardus),* et ceci par une caractérisation qualitative. Ces tests sont basés essentiellement sur des phénomènes de précipitation ou de coloration à l'aide des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (III.8).

D'après les résultats du tableau (III.8) on note que :

- Les alcaloïdes sont présents dans tous les extraits des graines de *Vitex agnus castus*. Cependant, ils ne sont extraits que dans l'acétate d'éthyle pour les graines et les feuilles de *Vitex agnus castus* et les feuilles de *Cymbopogon nardus.* Les anthraquinones sont abondantes dans l'extrait aqueux des graines VAC et des feuilles CN, tandis qu'ils sont absents dans les extraits de l'acétate d'éthyle et du méthanol.
- Les terpènes sont présents avec des quantités plus importantes dans l'extrait méthanolique des graines et des feuilles VAC. Cependant ils ne sont présents que dans l'extrait aqueux des feuilles de CN.
- Les extraits éthanoliques et aqueux des deux plantes sont généralement riches en saponines. On note une absence de ces métabolites secondaires dans les extraits métanoliques et d'acétate d'éthyle.
- Les graines et les feuilles de *Vitex agnus castus* ainsi que les feuilles *de Cymbopogon nardus* sont riches en flavonoïdes et en polyphénols. Le meilleur rendement d'extraction est obtenu

par l'extraction éthanolique et aqueuse. Alors que le faible rendement est obtenu par l'acétate d'éthyle.

Tableau III.8: Résultats de criblage phytochimique des différents extraits des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* L. et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*

Tests	Extraits	Graines VAC	FeuillesVAC	Feuilles CN
Alkaloides	Ethanol	+	-	-
	Méthanol	+++	-	-
	Aqueux	+++	-	-
	Acétate d'éthyle	+	+	+
Tanins	Ethanol	++	-	-
	Méthanol	+	+	-
	Aqueux	+	-	++
	Acétate d'éthyle	+	++	++
Anthraquinones	Ethanol	+++	+	+
	Méthanol	-	-	-
	Aqueux	++	-	++
	Acétate d'éthyle	-	-	-
Terpènes	Ethanol	+	-	-
	Méthanol	+++	++	-
	Aqueux	++	-	+
	Acétate d'éthyle	+	+	-
Saponines	Ethanol	+++	++	++
	Méthanol	-	-	-
	Aqueux	++	+	++
	Acétate d'éthyle	-	-	-
Flavonoides	Ethanol	+++	+++	++
	Méthanol	++	++	++
	Aqueux	++	+++	+
	Acétate d'éthyle	+	++	+
Polyphenols	Ethanol	+++	++	++
	Méthanol	++	++	+
	Aqueux	++	+++	+
	Acétate d'éthyle	+	+	+

+++ : Fortement abondant ; ++ : Moyennement abondant ; + : Faiblement abondant ; - : Négatif

II.1.3. Résultats de l'analyse quantitative

- **Détermination de la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes**

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué selon des méthodes spectrophotométriques. Les quantités de polyphénols et de flavonoïdes ont été déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage, qui ont été réalisées avec

des solutions d'étalons à différentes concentrations : L'acide gallique pour les polyphénols et le Rutin pour les flavonoïdes (figure III.6 et III.7).

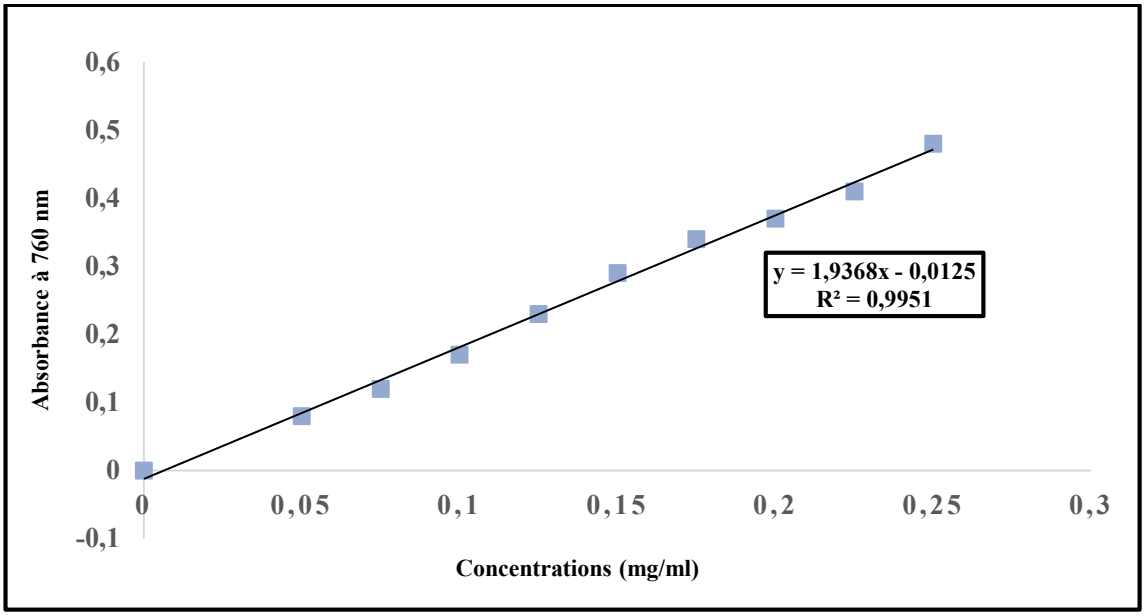


Figure III.6: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

Concernant la teneur en polyphénols, Les résultats sont exprimés en mgEq AG/gMs et la teneur en flavonoïde a été exprimée en mg Eq Rutin/g Ms. Les résultats sont représentés dans les figures (III.8 et III.9).

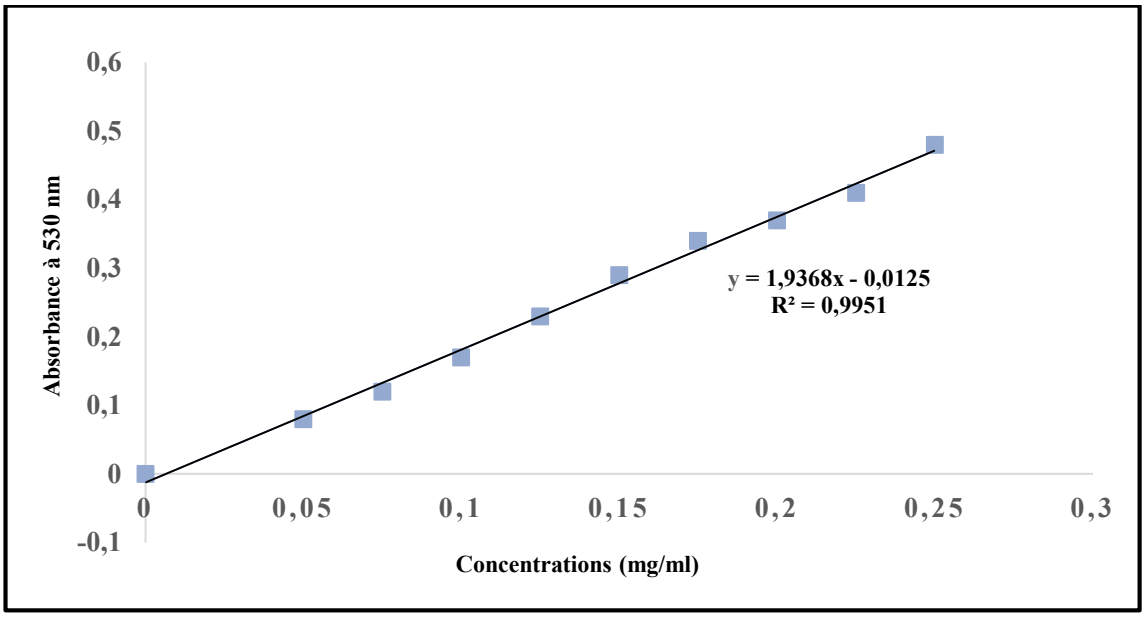


Figure III.7: Courbe d'étalonnage de Rutin pour le dosage des Flavonoïdes.

La distribution des composés phénoliques chez les feuilles et les graines de *Vitex agnus castus* a montré que les extraits aqueux et éthanolique contiennent les quantités les plus élevées

de polyphénols (Fig.III.8). Le contenu phénolique le plus faible a été observé dans l'extrait d'acétate d'éthyle pour les deux plantes ; les graines et les feuilles de *Vitex agnus castus* avec des valeurs respectivement de l'ordre de 21,50 ± 1.80 mgEq AG/g Ms et 19,60 ± 0,90 mg Eq AG/gMs et les feuilles de *Cymbopogon nardus* avec une valeur de 8,31±1,95 mg Eq AG/gMs. Concernant les organes, les teneurs en composés phénoliques étaient généralement plus élevées chez les graines VAC par rapport aux feuilles VAC. Cependant, Pour les quatre types de solvants, ce sont les feuilles de citronnelle qui contiennent la teneur significativement la plus faible en polyphénols.

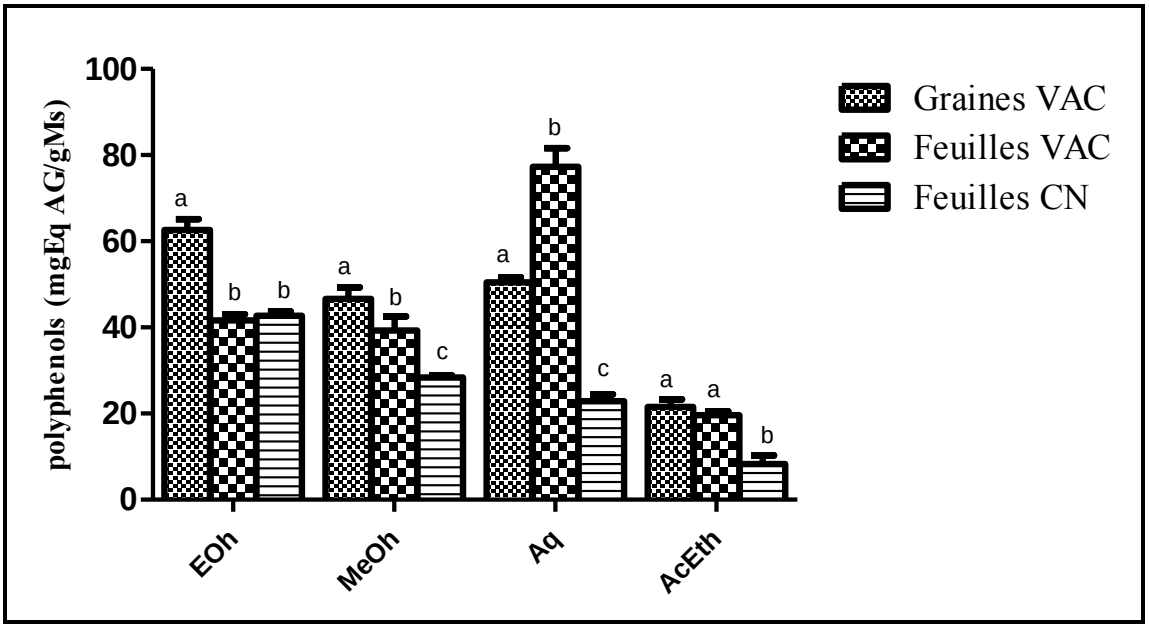


Figure III.8: Teneur en polyphénols dans les différents extraits des feuilles, des graines de *Vitex agnus castus L* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*

Les résultats ont été exprimés en mgEq AG/gMs. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,001$).

Les résultats du contenu de flavonoïdes présentés dans la figure (III.9), montrent que Les teneurs les plus basses de flavonoïdes ont été obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle quelle que soit la plante ou l'organe étudié avec des valeurs respectivement de l'ordre de 17,36± 1,2 mgEq AG/gMs pour les feuilles VAC, 12,08 ± 1,1 mgEq AG/g Ms pour les graines VAC et 6,54± 1,03 mgEq AG/gMs pour les feuilles CN.

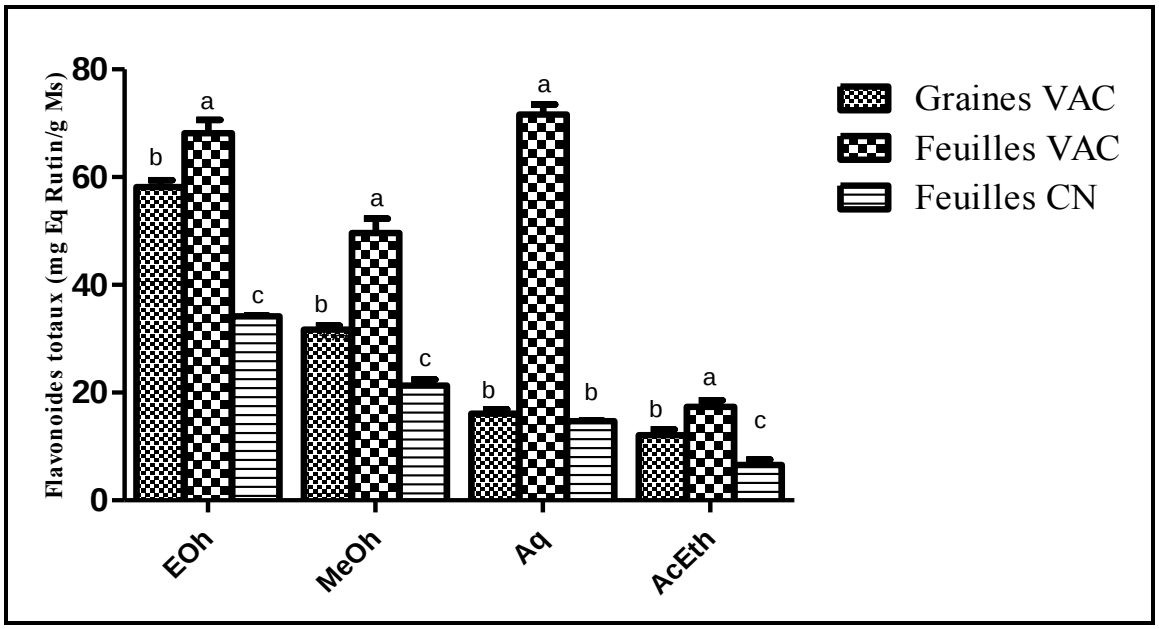


Figure III.9: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des feuilles, des graines de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L*.

Les résultats ont été exprimés en mg Eq Rutin/g Ms. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD. Les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction *(*p <0,001).

Tous les extraits présentaient une concentration en flavonoïdes significativement supérieure dans les feuilles VAC par rapport aux graines VAC et aux feuilles CN. En ce qui concerne le solvant d'extraction, l'éthanol reste le meilleur solvant d'extraction des flavonoïdes pour les deux espèces étudiées.

- **Dosage des flavones et flavonols**

Le dosage des flavonols dans les différents extraits a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl3) et l'étalon été la quercétine. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de la quercétine par milligramme de matière sèche (mg EqQ/mg MS), à partir de la courbe d'étalonnage (Figure III.10 et III.11).

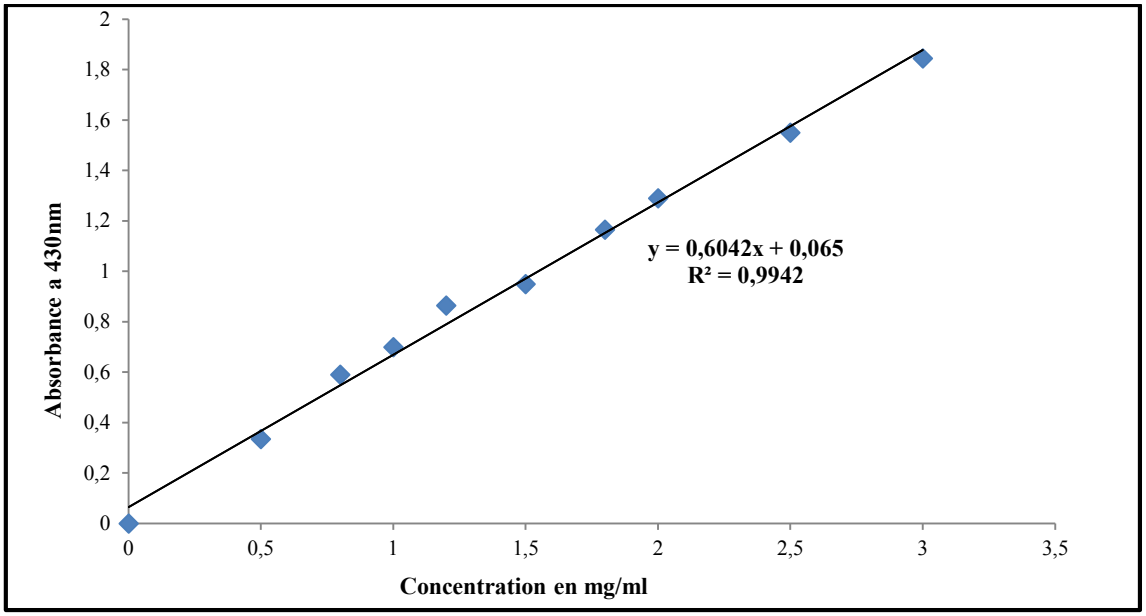


Figure III.10: Courbe étalon pour le dosage des flavonols.

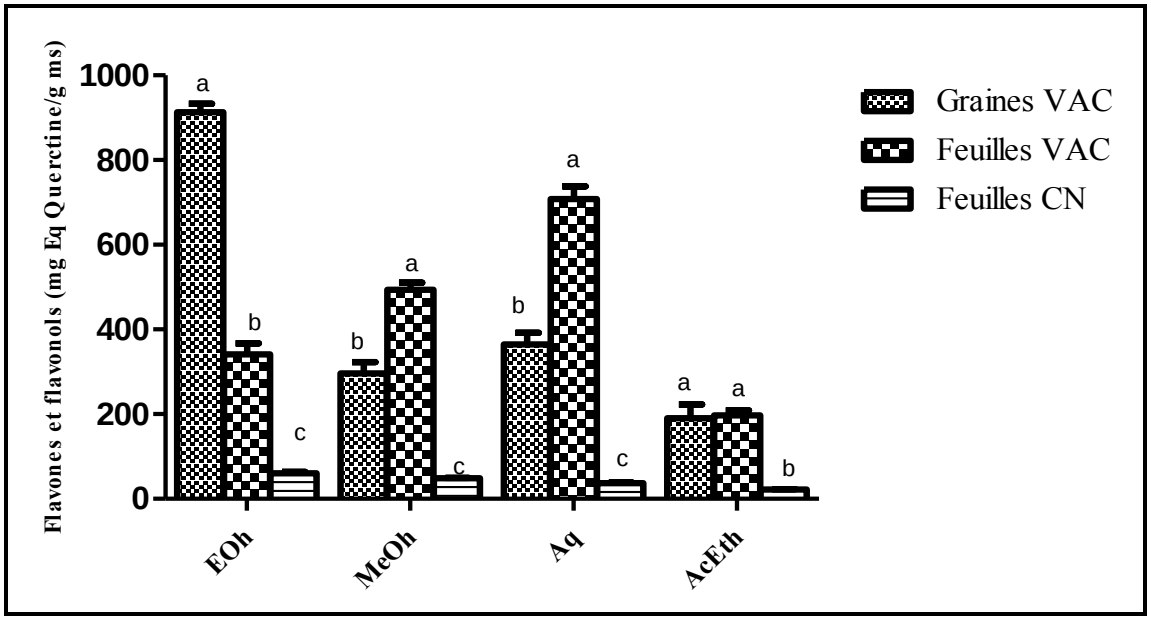


Figure III.11: Teneur en flavonols dans les différents extraits des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*

Les résultats ont été exprimés en mg Eq Quercetine /g Ms. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD, Les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0,001$).

Les résultats abrégés dans la figure (III.11) montrent que les flavonols sont présents dans tous les extraits des deux plantes étudiées avec des concentrations qui varient de 22,31± 0,89 à 913,33 ± 19,20 mg Eq Quercétine/g Ms selon la partie de la plante et le solvant d'extraction. La quantité la plus élevée des flavonols extraite à partir des graines de *Vitex agnus castus* est obtenue lorsque l'ethanol est utilisé comme solvant d'extraction. Par ailleurs, c'est l'extrait

aqueux qui a enregistré la teneur la plus élevée des flavonols pour les feuilles de la même plante avec une valeur de 708,33 ± 29,33 mg Eq Quercetine /g Ms. le rendement le plus faible en flavonols a été enregistré dans l'extrait de l'acétate d'éthyle pour les graines et les feuilles VAC et aussi pour les feuilles de CN. Pour les quatre types de solvant d'extraction, les feuilles de *Cymbopogon nardus* contiennent des quantités significativement très faibles de flavonols en comparaison avec les feuilles et les graines de *Vitex agnus castus*.

II.1.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

Le potentiel antioxydant des différents extraits peut être estimé en combinant les résultats obtenus de différents tests, du fait qu'un seul test n'est pas suffisant pour caractériser le pouvoir antioxydant d'un échantillon donné. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois tests différents : la capacité antioxydante totale (CAT), piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).

II.1.4.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

Les résultats obtenus de la capacité antioxydante totale des différents extraits sont exprimés en mg équivalent de la vitamine C par mg de la matière sèche de l'échantillon végétal, à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant la vitamine C comme étalon (Fig. III.12).

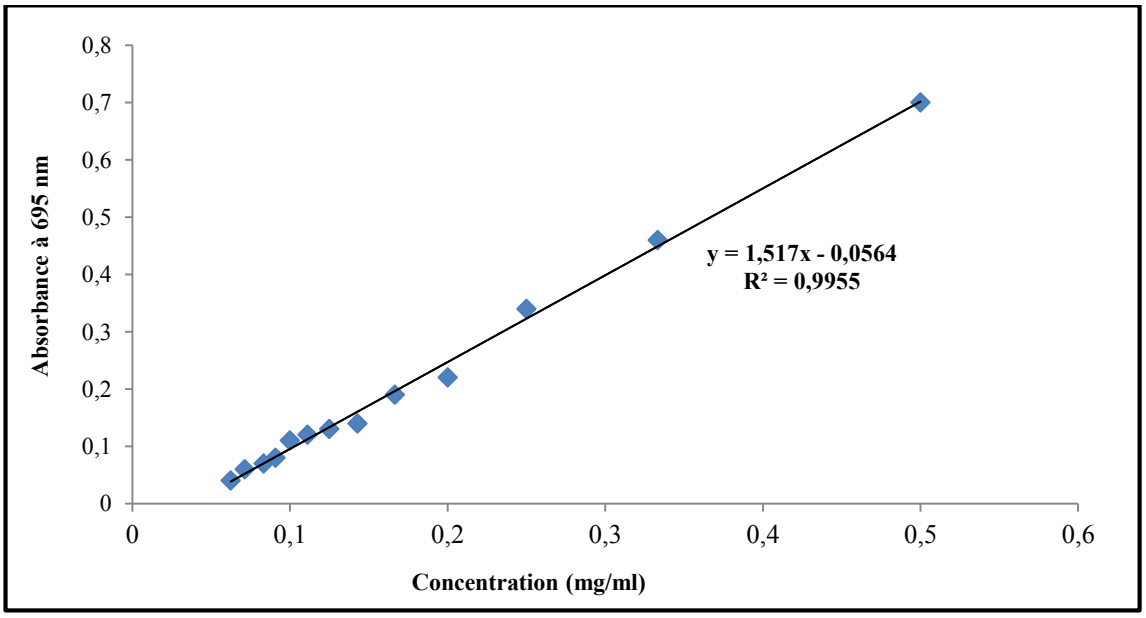


Figure III.12 : Courbe étalon de la vitamine C pour la mesure de la capacité antioxydante totale.

L'estimation de la capacité antioxydante totale a montré que tous les extraits présentent des activités antioxydantes différentes (Tab. III.9). L'extrait éthanolique des graines de *Vitex agnus castus* possède la meilleure capacité antioxydante totale qui est de l'ordre de 408,33 ± 4,33 mg Eq Vit C /g Ms suivi par l'extrait aqueux des feuilles VAC avec une valeur de 355,33 ± 23,36 mg Eq Vit C /g Ms. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle possède la capacité antioxydante la plus faible pour les feuilles et les gaines VAC et les feuilles CN. On note une variabilité significative de cette activité en fonction du solvant et de l'organe étudié.

Tableau III.9: Capacité antioxydante totale des différents extraits en mg Eq Vit C /g Ms.

Plantes	Extraits			
	Aq	MeOh	EOh	AcEth
Graines VAC	210,33 ± 4,85^{b}	248,33 ± 6,94^{a}	408,33 ± 4,33^{a}	147,40 ±2,04 ^{a}
Feuilles VAC	355,33 ± 23,36^{a}	213 ± 1,88^{b}	189,66 ± 8,17^{b}	86,83 ± 3,51 ^{b}
Feuilles CN	22 ± 0,18^{c}	42,20 ± 4,36^{c}	78 ± 4,22^{c}	18±0,2 ^{c}

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD, Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction (p <0,001). Aq : Extrait aqueux ; MeOh : Extrait méthanolique ; EOh : Extrait éthanolique ; Ac Eth : Extrait d'acétate d'éthyle.

II.1.4.2. Piégeage du radical libre DPPH :

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts des plantes a été faite en comparaison avec celle de la BHT (Fig. III.13, III.14 et. III.15).

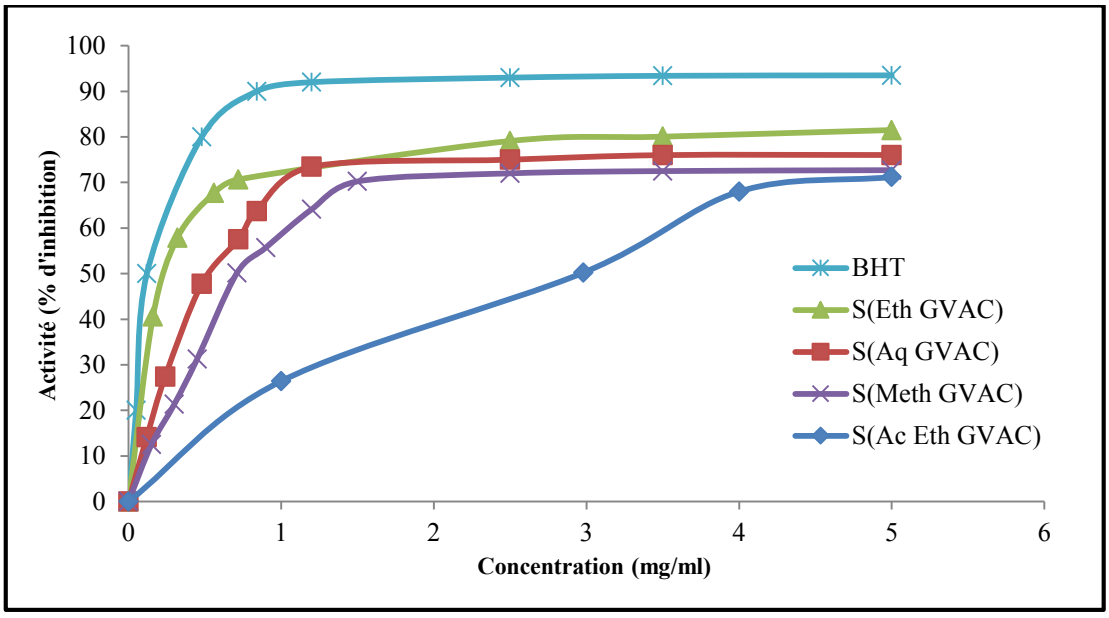


Figure III.13: Activité antioxydante des différents extraits des graines de *Vitex agnus castus L.* préparés par la technique du soxhlet et du BHT.

S (Eth GVAC) : Extrait éthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; S (Aq GVAC) : Extrait aqueux des graines du *Vitex agnus castus* ; S (Meth GVAC) : Extrait méthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; S (Ac EthGVAC) : Extrait d'acétate d'éthyle des graines *Vitex agnus castus*. BHT : Hydroxytoluène butylé.

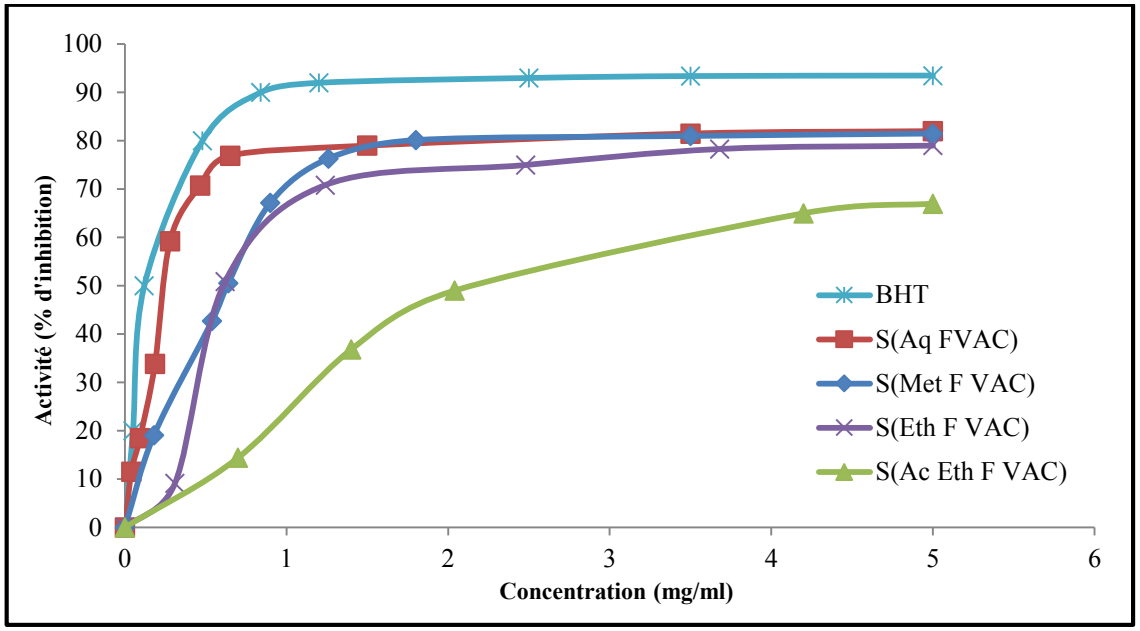


Figure III.14: Activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Vitex agnus castus L.* préparés par la technique du soxhlet et du BHT.

S (Eth F VAC) : Extrais éthanolique des feuilles du *Vitex agnus castus* ; S (Aq F VAC) : Extrait aqueux des Feuilles du *Vitex agnus castus* ; S (Meth F VAC) : Extrait méthanolique des feuilles du *Vitex agnus castus* ; S (Ac Eth F VAC) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles *Vitex agnus castus*. BHT : Hydroxytoluène butylé.

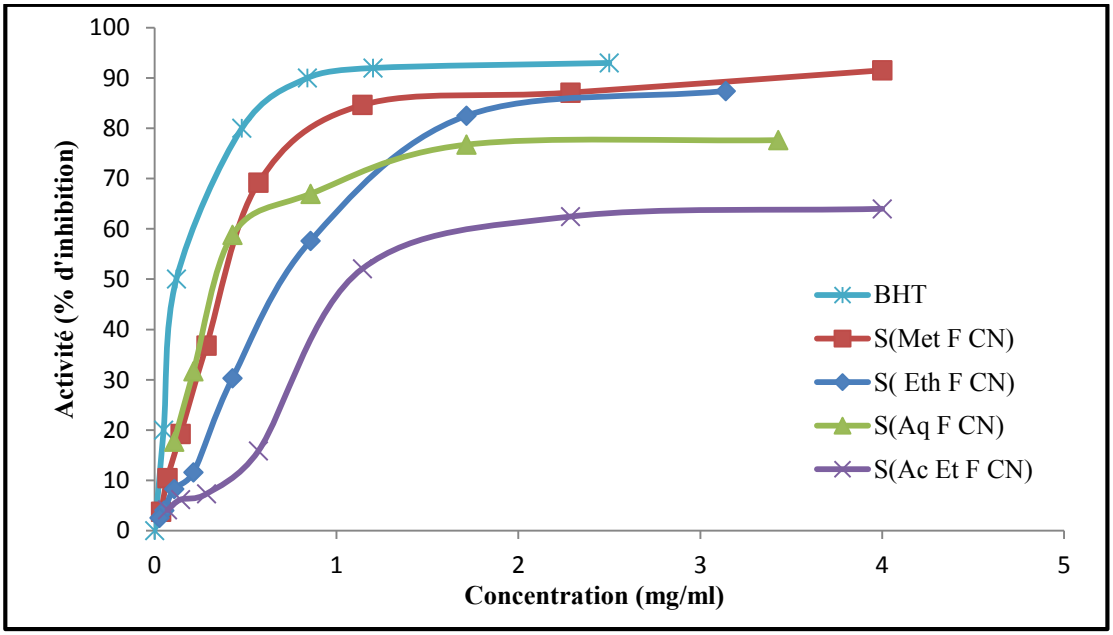


Figure III.15: Activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Cymbopogon nardus L.* préparés par la technique du soxhlet et du BHT.

S (Eth F CN) : Extrait éthanolique des feuilles du *Cymbopogon nardus* ; S (Aq F CN) : Extrait aqueux des Feuilles du *Cymbopogon nardus* ; S (Meth F CN) : Extrait méthanolique des feuilles du *Cymbopogon nardus* ; S (Ac Eth F CN) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Cymbopogon nardus*. BHT : Hydroxytoluène butylé.

Pour pouvoir comparer le potentiel antioxydant des différents extraits, il faut calculer le paramètre IC_{50}, qui est une mesure quantitative définie comme la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire 50 % de la concentration initiale du DPPH$^{\cdot}$. Pour chaque extrait l'IC_{50} est déduite à partir de la droite d'étalonnage correspondante. Une faible valeur IC_{50} signifie une forte activité antioxydante.

Tableau III.10: Les valeurs des IC_{50} pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3).

Plantes	IC $_{50}$ extraits (mg/ml)			
	Aq	MeOh	EOh	AcEth
Graines VAC	0,52 ± 0,02 ^{a}	0,71 ± 0,33^{a}	0,36 ± 0,07 ^{a}	2,98 ± 0,11^{a}
Feuilles VAC	0,33 ± 0,04 ^{a}	0,64 ± 0,04$^{a, b}$	0,62 ± 0,03$^{a, b}$	2,04 ± 0,21^{b}
Feuilles CN	0,35 ± 0,10 ^{a}	0,42 ± 0,01^{b}	0,71 ± 0,02^{a}	1,12 ± 0,22^{c}

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0,001$). Aq : Extrait aqueux ; MeOh : Extrait méthanolique ; EOh : Extrait éthanolique ; AcEth : Extrait acétate d'éthyle.

Les valeurs des IC_{50} des différents extraits sont présentées dans le tableau (III.10). Les résultats montrent l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH d'extraits des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus*. En général, les valeurs d'IC_{50} de tous les échantillons testés lors du test sont comprises entre 0,33 et 2,97 mg/ml, et tous les extraits inhibaient le radical DPPH.

On constate que l'extrait aqueux des feuilles VAC possède la plus grande capacité du piégeage des radicaux libres par rapport aux autres échantillons avec une valeur d'IC_{50} de 0,33 ± 0,04 mg/ml suivi par l'extrait aqueux des feuilles CN et l'extrait éthanolique des graines VAC dont les valeurs d'IC_{50} sont respectivement de l'ordre de 0,35 ± 0,10 mg/ml et 0,36 ± 0,07 mg/ml. Cependant, tous les extraits testés présentent une activité antioxydante significativement plus faible en comparaison avec l'antioxydant de référence BHT dont l'IC_{50} est égale à 0,11 ± 0,01 ($p < 0,05$). Quel que soit l'organe étudié, il est à noter que ce sont Les extraits d'acétate d'éthyle des deux espèces, qui possèdent le pouvoir antioxydant le plus faible puisqu'ils ont les IC_{50} les plus élevées.

II.1.4.3. Pouvoir réducteur de fer

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés a été évalué par le test FRAP. La capacité de réduction est généralement associée à la présence d'agents antioxydants qui exercent leur effet en transformant le Fe^{3+} en Fe^{2+}.

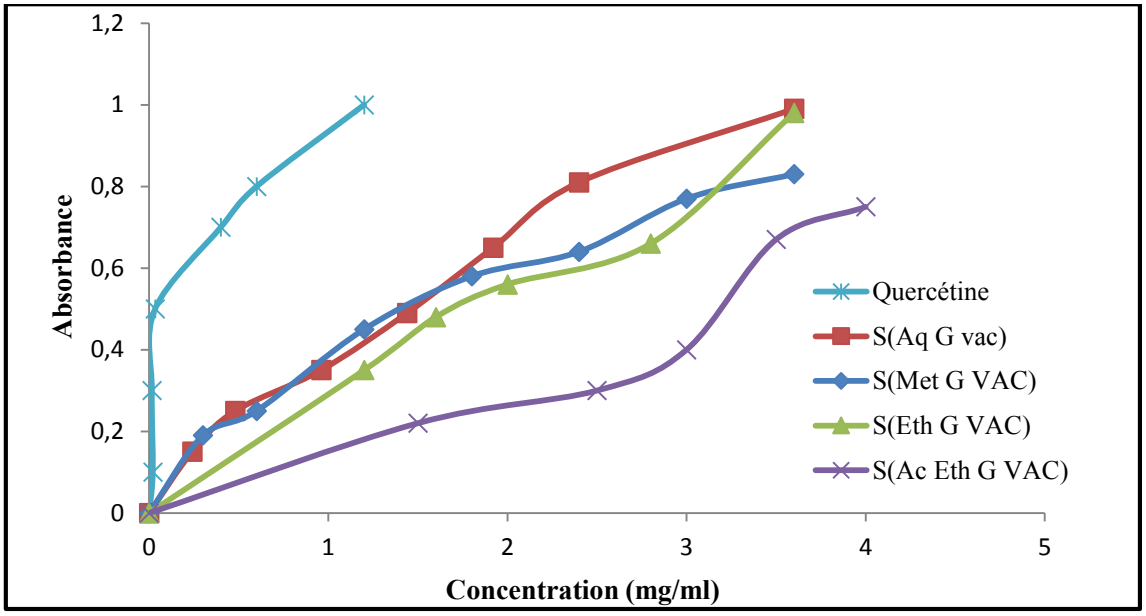


Figure III.16: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des Graines de VAC préparés par soxhlet et la quercétine.

S (Eth GVAC) : Extrait éthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; S (Aq GVAC) : Extrait aqueux des graines du *Vitex agnus castus* ; S (Meth GVAC) : Extrait méthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; S (Ac Eth G VAC) : Extrait d'acétate d'éthyle des graines *Vitex agnus castus*.

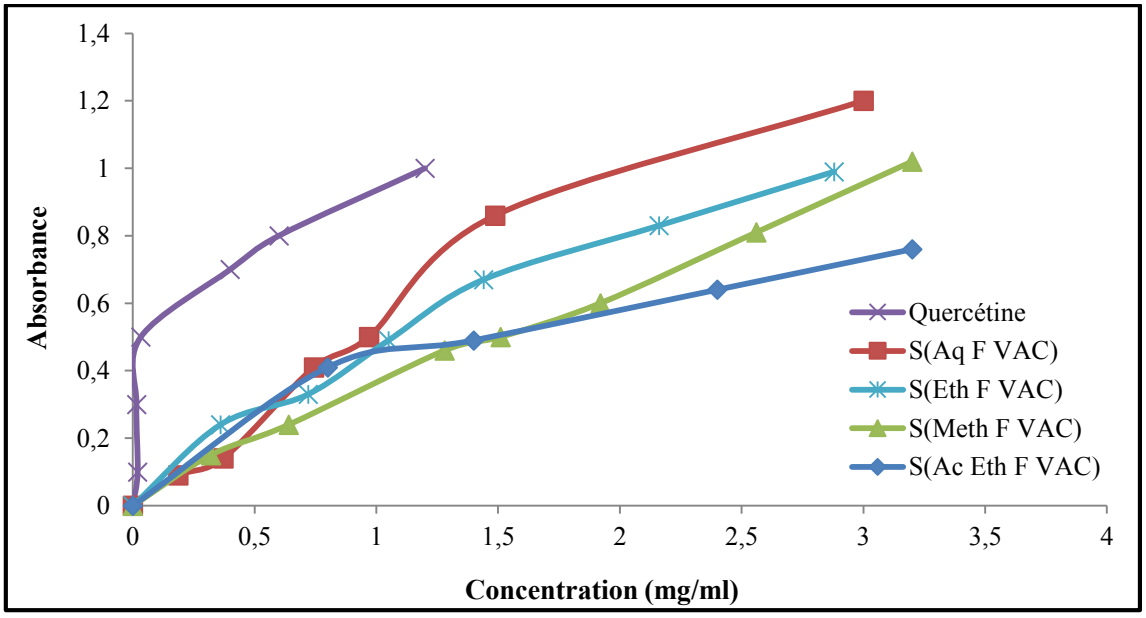


Figure III.17: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des feuilles de VAC préparés par soxclet et la quercétine.

S (Eth F VAC) : Extrait éthanolique des feuilles du *Vitex agnus castus* ; S (Aq F VAC) : Extrait aqueux des Feuilles du *Vitex agnus castus* ; S (Meth F VAC) : Extrait méthanolique des feuilles du *Vitex agnus castus* ; S (Ac Eth F VAC) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Vitex agnus castus*.

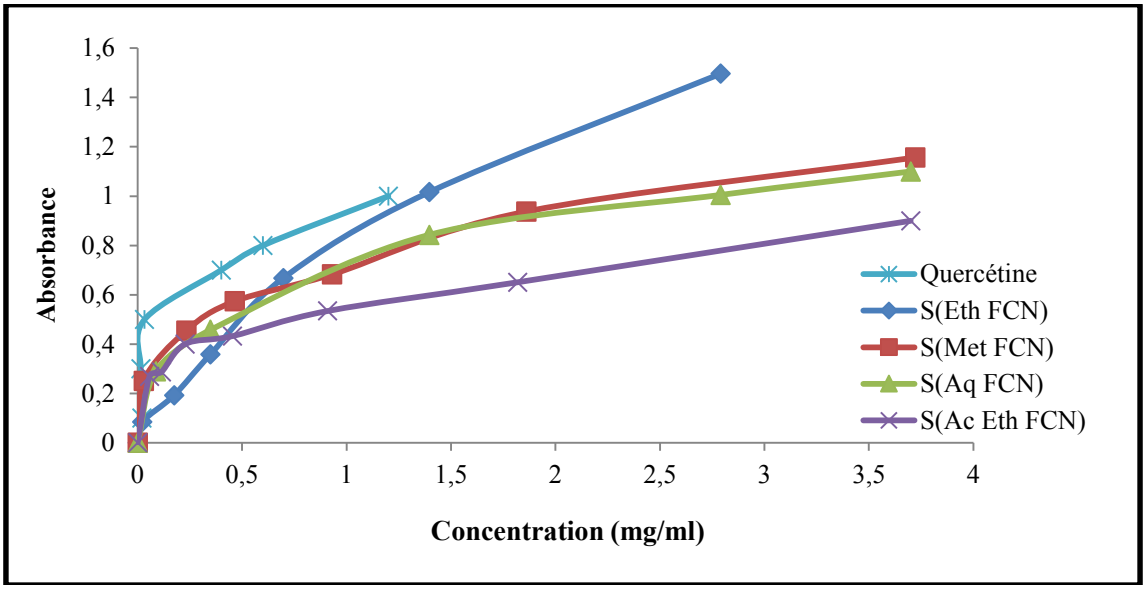


Figure III.18: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des feuilles de *Cymbopogon nardus L.* préparés par soxhlet et la quercétine.

S (Eth F CN) : Extrait éthanolique des feuilles du *Cymbopogon nardus* ; S (Aq F CN) : Extrait aqueux des Feuilles du *Cymbopogon nardus* ; S (Meth F CN) : Extrait méthanolique des feuilles du *Cymbopogon nardus* ; S (Ac Eth FCN) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Cymbopogon nardus*.

A partir des valeurs de l'absorbance qui correspondent aux concentrations croissantes des différents extraits et de la Quercétine, on a pu tracer les courbes illustrées dans les figures (III.16, III.17 et III.18).

Tableau III.11 : Les valeurs des EC_{50} pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3).

Plantes	Extraits			
	Aq	MeOh	EOh	AcEth
Graines VAC	1,33 ± 0,07 [a]	1,02 ± 0,03 [b]	1,68± 0,01[a]	3,14 ± 0,09 [a]
Feuilles VAC	0,97 ± 0,04 [b]	1,52 ± 0,00 [a]	1,05 ±0,02[b]	1,40 ± 0,02[b]
Feuilles CN	0,54 ± 0,02[c]	0,31 ± 0,03[c]	0,51 ± 0,03 [c]	0,81 ±0,11 [c]

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0,001$). Aq : Extrait aqueux ; MeOh : Extrait méthanolique ; EOh : Extrait éthanolique ; AcEth : Extrait acétate d'éthyle.

La capacité réductrice des extraits a été comparée en se basant sur la concentration efficace EC_{50} qui est définie comme la concentration nécessaire qui peut réduire 50 % du fer. Les résultats des différents extraits sont présentés dans le tableau (III.11).

La comparaison des résultats a révélé une variabilité significative corroborée à l'effet du solvant d'extraction et à la partie de la plante étudiée. En effet, tous les extraits des feuilles CN présentent une activité réductrice significativement plus importante que celle des graines et des feuilles VAC. L'extrait méthanolique des feuilles CN présente le pouvoir réducteur le plus élevé avec une valeur d'EC_{50} égale à 0,31 ± 0,03mg/ml suivi par l'extrait ethanolique avec une valeur d'EC_{50} de l'ordre de 0,51 ± 0,12 mg/ml, l'extrait d'acétate d'éthyle des graines VAC possède la capacité réductrice la plus faible avec une EC_{50} de 3,14 ± 0,09 mg/ml. En comparaison avec la Quercétine (EC_{50}=0,033 ± 0.0004 mg/ml), tous les extraits testés sont significativement moins actifs.

II.1.4.4. Corrélations

Dans le but de chercher la relation entre la teneur des extraits en différentes composées et l'activité antioxydante, on a calculé le coefficient de corrélations Pearson. Les résultats sont regroupés dans le tableau (III.12).

Tableau III.12 : Coefficients de corrélation de Pearson entre les composés et le pouvoir antioxydant par différents tests

	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Flavones et Flavonols
CAT	0,80**	0,73**	0,93***
DPPH	-0,54	-0,44	-0,29
FRAP	-0,037	-0,055	0,30

* P< 0,05 ; ** : P< 0,01 ; *** : P< 0,001.

- **Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols) et la CAT :**

En établissant la relation entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols et la capacité antioxydante totale des différents extraits des plantes étudiées, On remarque que la capacité antioxydante est fortement liée à la teneur en flavonols (R^2 = 0,93) et en polyphenols (R^2 = 0,80). Une forte corrélation existe aussi entre la capacité antioxydante totale et la teneur en flavonoïdes avec une valeur de (R^2 = 0,73).

- **Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, flavonols) et les EC_{50} :**

Dans le but d'établir la relation entre la réduction de fer et les teneurs en différents composés, on a calculé le coefficient de corrélation (Pearson). On remarque une faible corrélation entre les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et flavonols des différents extraits étudiées et les concentrations EC_{50}.

➢ **Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, flavonols) et les IC_{50} :**

Les résultats illustrés dans le tableau (III.12) montrent qu'il y a une faible corrélation entre le paramètre IC50 et la teneur en phénols totaux à raison de 0,54, et entre l'IC50 et la teneur en flavonoïdes à raison de 0,44. Le coefficient de corrélation le plus faible R^2=0,29 a été observé entre la capacité du piégeage du radical DPPH et la teneur en flavonols.

II.2. Dosage de Polyphenols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Vitex agnus castus* et *Cymbopogon nardus* préparés par macération

II.2.1. Rendement des extractions

Tableau III.13: Rendements d'extraction obtenus à partir de *Vitex agnus castus L.* (graines et feuilles) et *Cymbopogon nardus L.* (Feuilles) par les différents extraits (Ethanol, méthanol, acétate d'éthyle et l'eau.).

Extraits	Rendement (%)		
	Graines VAC	Feuilles VAC	Feuilles CN
Eau	22	24	28
Méthanol	19,5	22,44	16,5
Ethanol	8	10,02	5
Acétate d'éthyle	7,22	6,12	4,5

La préparation des extraits à partir des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus*, ainsi que les feuilles de *Cymbopogon nardus*, a été réalisée par des solvants de polarités différentes, il s'agit de l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétate d'éthyle. Cette extraction a permis d'obtenir quatre extraits : l'extrait aqueux (Aq), l'extrait éthanolique (Eoh), l'extrait méthanolique (Me Oh), l'extrait d'acétate d'éthyle (Ac Eth).

Exprimé en pourcentage par rapport au poids sec total, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait aqueux quelle que soit la plante étudiée, suivi par l'extrait méthanolique et ethanolique. Enfin, l'extrait d'acétate d'éthyle enregistre le rendement le plus faible : 7,22% pour les graines VAC, 6,12 % pour les feuilles VAC et 4,5 % pour les feuilles CN. Les extraits obtenus sont d'aspects et de couleurs différentes.

II.2.2. Résultats de l'analyse quantitative

❖ **Détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes**

Les plolyphénols totaux ont été déterminé par la méthode de folin cicaleutou. Le dosage des flavonoides a été réalisé par la méthode de trichlorure d'aluminum. L'acide gallique a été utilisé comme standard pour les polyphenols et le Rutin pour les flavonoïdes. Les résultats sont représentés dans les figures (III.19 et III.20).

Selon les résultats exprimés en mgEq AG/g Ms dans la figure (III.19), les teneurs en polyphénols totaux varient significativement en fonction du solvant d'extraction et de la plante étudiée, avec des valeurs allant de 53,33 ± 1,38 mg Eq AG/g Ms enregistré chez l'extrait éthanolique des feuilles VAC à 8 ± 0,05 mg Eq AG/g Ms trouvé dans l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de VAC. A l'exception de l'extrait éthanolique, c'est la citronnelle qui contient la quantité la plus élevée des polyphénols dans les différents extraits. Le contenu phénolique le plus faible a été observé dans l'extrait d'acétate d'éthyle pour les graines VAC et les feuilles de CN.

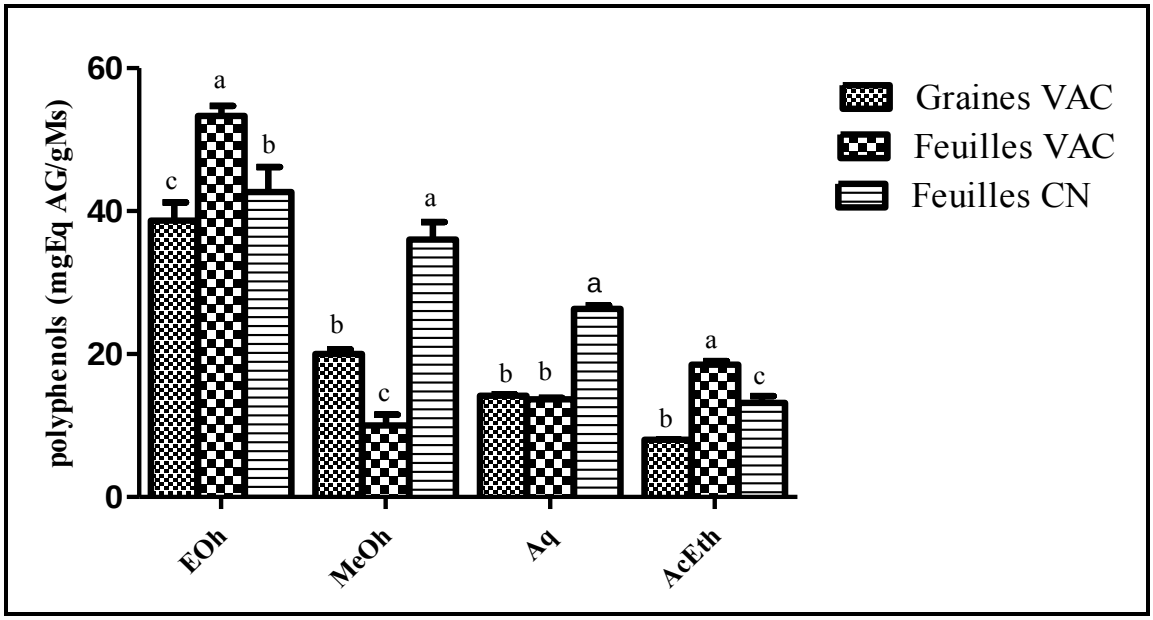


Figure III.19: Teneur en polyphénols dans les différents extraits des feuilles, des graines de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L*.

Les résultats ont été exprimés en mg Eq AG/g Ms. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,001$). EOh : Extrait d'éthanol ; MeOh : Extrait méthanolique ; Aq : Extrait aqueux ; Ac Eth : Extrait d'acétate d'éthyle.

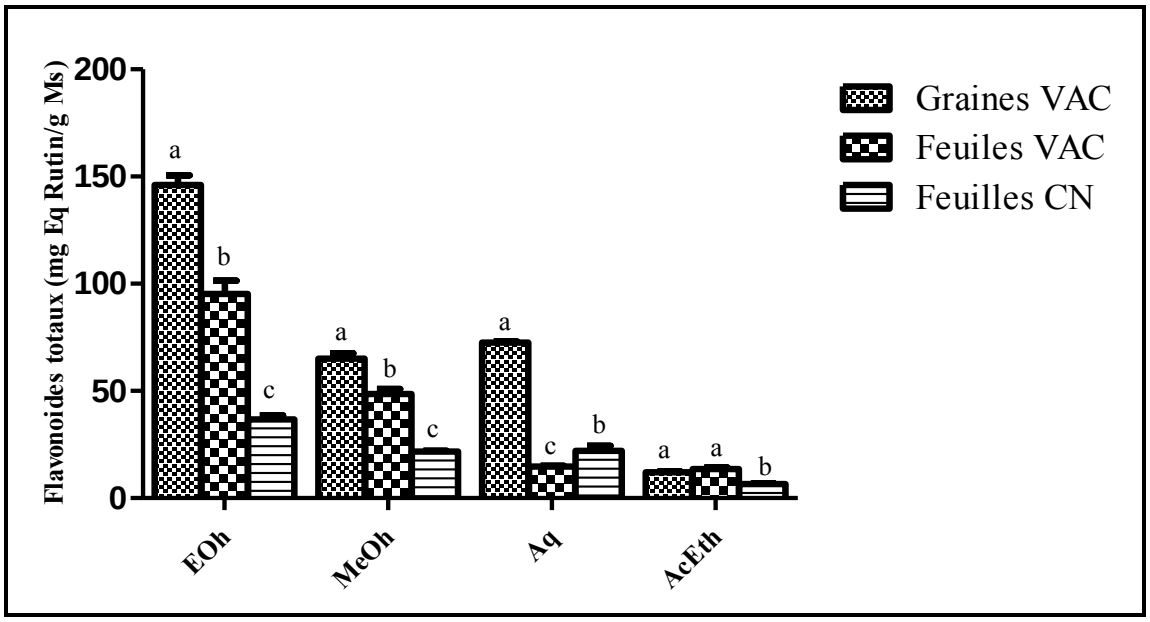


Figure III.20: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des feuilles, des graines de *Vitex agnus castus L.* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*
Les résultats ont été exprimés en mgEq Rutin/gMs. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD. Les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction *(*p <0,001). EOh : Extrait d'éthanol ; MeOh : Extrait methanolique ; Aq : Extrait aqueux ; AcEth : Extrait acétate d'éthyle.

Selon les résultats présentés dans la figure (III.20), on remarque que l'éthanol a pu extraire les quantités les plus importantes des flavonoïdes à partir des deux plantes, avec des valeurs qui sont de l'ordre de 146 ± 4,5 mg Eq Rutin /g Ms pour les graines VAC, 95,33 ± 6,16 mg Eq Rutin /g Ms pour les feuilles VAC et 36,67 ± 1,85 mg Eq AG/g Ms pour les feuilles de *Cymbopogon nardus.* Généralement, ce sont les graines VAC qui contiennent significativement les quantités les plus importantes en flavonoïdes par rapport aux feuilles VAC. Les teneurs les plus faibles en flavonoïdes sont obtenus par l'acétate d'éthyle pour les deux plantes étudiées.

- **Dosage des flavones et flavonols**

Les teneurs des différents extraits en flavons et flavonols ont été exprimés en mg Eq Quercétine/g Ms. les résultats sont présentées dans la figure (III.21). L'extrait ethanolique des feuilles de *Vitex agnus castus* enregistre la teneur la plus élevée en flavones et flavonols qui est de l'ordre de 874 ± 19,5 mg Eq Quercetine /g Ms. Cependant, les teneurs les plus faibles ont été obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle des deux plantes étudiées. Tous les extraits présentaient une concentration en flavones et flavonols significativement inférieure dans les feuilles CN par rapport aux feuilles VAC. En ce qui concerne les solvants d'extraction, l'éthanol et le méthanol constituent les meilleurs solvants d'extraction des flavonols pour les deux espèces étudiées.

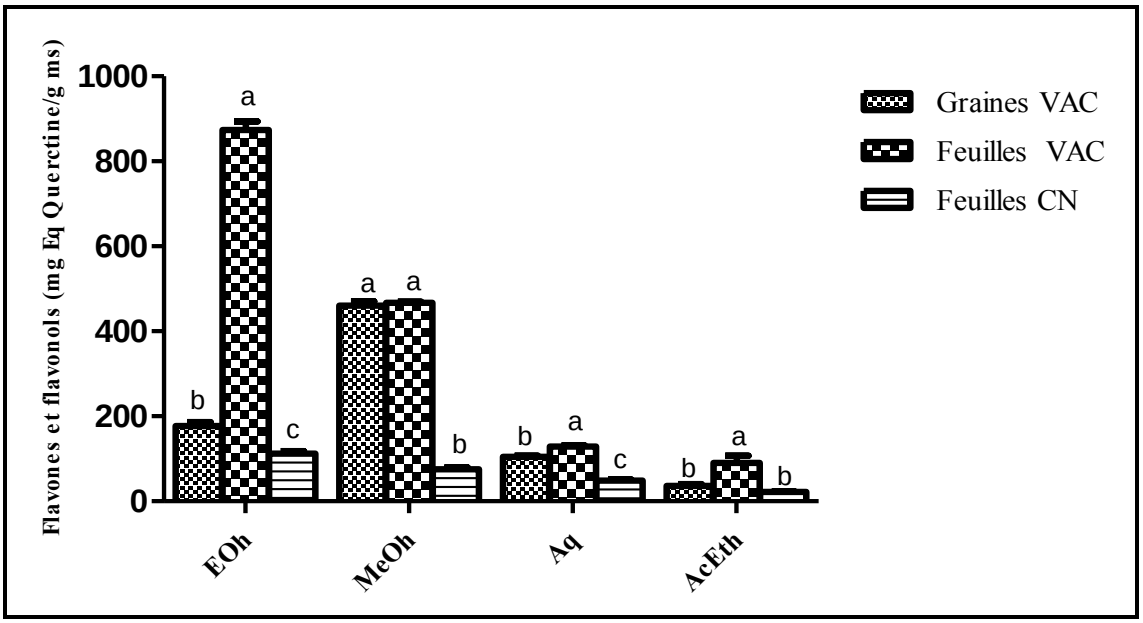


Figure III.21: Teneur en flanones et flavonols dans les différents extraits des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus L., et* les feuilles *de Cymbopogon nardus L.*
Les résultats ont été exprimés en mg Eq Quercétine /g Ms. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD, Les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0,001$). EOh : Extrait d'éthanol ; MeOh : Extrait méthanolique ; Aq : Extrait aqueux ; AcEth : Extrait d'acétate d'éthyle.

II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

II.2.3.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

Les résultats obtenus de la capacité antioxydante totale des différents extraits sont exprimés en équivalent de la vitamine C par mg de la matière sèche de l'échantillon végétal (Fig. III.22).

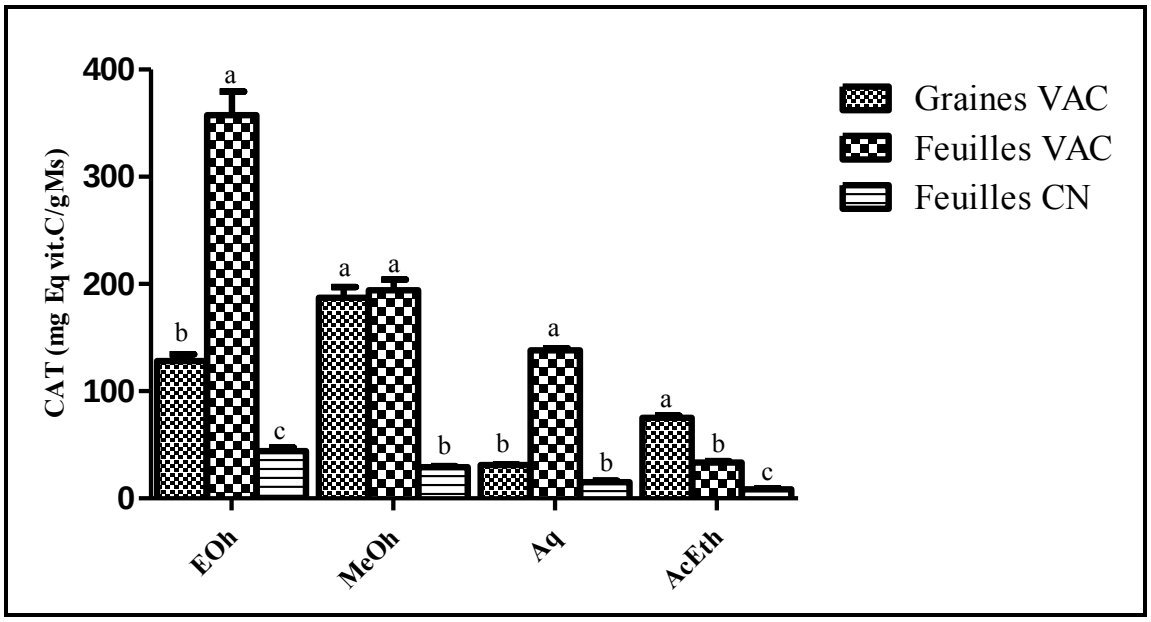


Figure III.22: Capacité antioxydante totale (CAT) des différents extraits en mg Eq Vit C /g Ms. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD.
Les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0,001$).
EOh : Extrait d'éthanol ; MeOh : Extrait méthanolique ; Aq : Extrait aqueux ; AcEth : Extrait d'acétate d'éthyle.

La figure (III.22) montre que tous les extraits présentent une capacité antioxydante. Toutefois, Cette capacité antioxydante diffère selon le solvant d'extraction, l'organe et la plante étudiée. L'extrait ethanolique des feuilles VAC possède la capacité antioxydante significativement la plus élevée avec une valeur de 357,66 ± 22 mg Eq Vit C /g Ms. Les extraits methanolique des feuilles VAC et des graines VAC révèlent aussi une activité antioxydante totale importante avec des valeurs qui sont de l'ordre de 187± 10,33 mg Eq Vit C /g Ms pour les graines VAC et 194 ± 10,25 mg Eq Vit C /g Ms pour les feuilles VAC. Pour les quatre types de solvant, ce sont les feuilles de *Cymbopogon nardus* qui possèdent la capacité antioxydante la plus faible par rapport aux feuilles et aux graines VAC.

II.2.3.2. Piégeage du radical libre DPPH :

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts des plantes a été faite en comparaison avec celle de l'antioxydant de synthèse BHT (Figures III.23, III.24 et III.25).

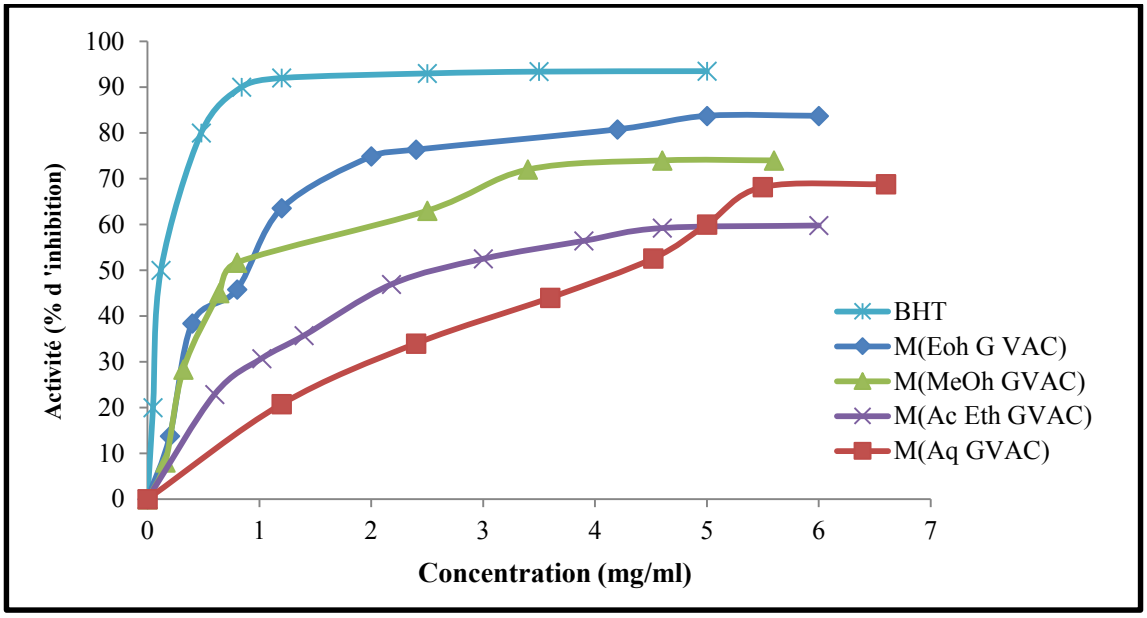


Figure III.23: Activité antioxydante des différents extraits des graines de *Vitex agnus castus L.* préparés par macération et du BHT**.**

M (Eth GVAC) : Extrait éthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Aq GVAC) : Extrait aqueux des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Meth GVAC) : Extrait méthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Ac Eth GVAC) : Extrait d'acétate d'éthyle des graines de *Vitex agnus castus*. BHT : Hydroxytoluène butylé.

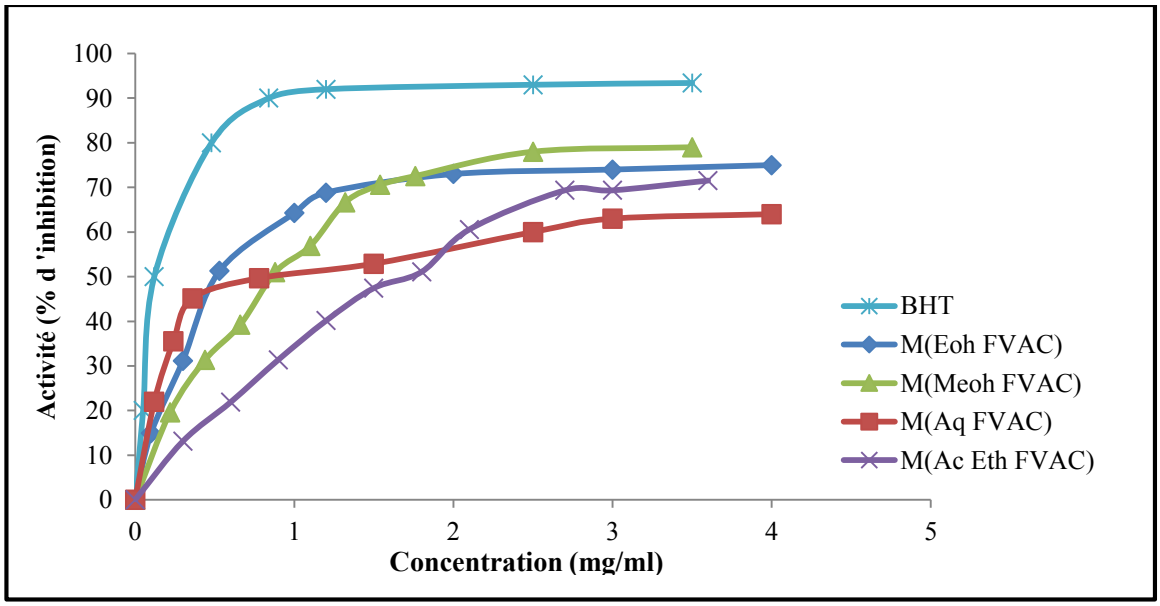


Figure III.24: Activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Vitex agnus castus L.* préparés par macération et du BHT.

M (Eth GVAC) : Extrait éthalolique des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Aq GVAC) : Extrait aqueux des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Meth GVAC) : Extrait méthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Ac EthGVAC) : Extrait d'acétate d'éthyle des graines *Vitex agnus castus*. BHT : Hydroxytoluène butylé.

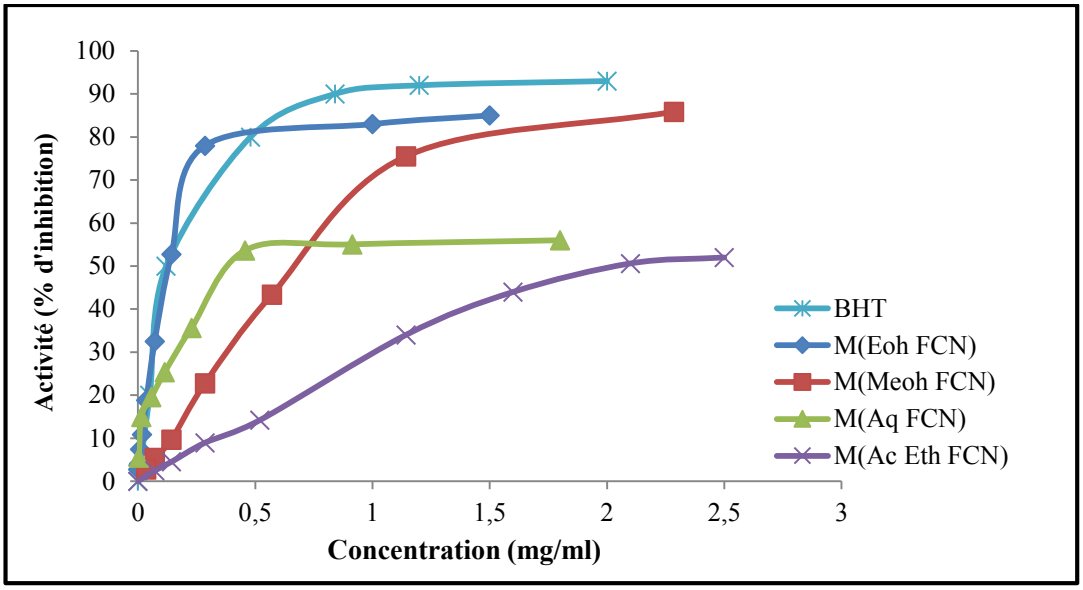


Figure III.25: Activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Cymbopogon nardus L.* préparés par macération et du BHT.

M (Eth F CN) : Extrait ethalolique des feuilles du *Cymbopogon nardus* ; M (Aq F CN) : Extrait aqueux des Feuilles du *Cymbopogon nardus* ; M (Meth F CN) : Extrait méthanolique des feuilles du *Cymbopogon nardus* ; M (Ac Eth FCN) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Cymbopogon nardus*. BHT : Hydroxytoluène butylé.

Pour chaque extrait l'IC_{50} est déduite à partir de la droite d'étalonnage correspondante. Les résultats sont présentés dans le tableau (III.14).

Tableau III.14 : Les valeurs des IC_{50} pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3).

Plantes	Extraits			
	Aq	Meoh	EOh	Ac Eth
Graines VAC	4,52 ± 1,01[a]	0,78 ± 0,1[a]	0,83 ± 0,05 [a]	2,18 ± 0,95[a]
Feuilles VAC	0,78±0,02[b]	0,66 ± 0,01[a]	0,53 ± 0,06 [a]	1,01±0,08[b]
Feuilles CN	0,41± 0,03[b]	0,71 ± 0,33[a]	0,13 ± 0,02 [a]	2,17± 0,88[a]

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction ($p < 0,001$). Aq : Extrait aqueux ; MeOh : Extrait méthanolique ; EOh : Extrait éthanolique ; AcEth : Extrait d'acétate d'éthyle.

A partir des figures (III.23, III.24 et III.25), on remarque que Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation des concentrations des différents extraits. Les résultats du tableau (III.14) montrent l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH d'extraits des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus* exprimée en IC_{50}. Les valeurs d'IC_{50} de tous les échantillons testés lors du test sont comprises entre 0,13± 0,02 et 4,52 ±1,01 mg / ml, et tous les extraits inhibaient le radical DPPH.

On constate que l'extrait éthanolique des feuilles CN possède la plus grande capacité du piégeage des radicaux libres par rapport aux autres échantillons avec une valeur d'IC_{50} de 0,13 ± 0,02 mg/ml suivi par l'extrait aqueux des feuilles CN et l'extrait méthanolique des feuilles VAC dont les valeurs d'IC_{50} sont respectivement de l'ordre de 0,41± 0,03 mg/ml et 0,66 ± 0,01 mg/ml. Cependant, tous les extraits testés présentent une activité antioxydante significativement plus faible en comparaison avec l'antioxydant de référence BHT dont l'IC50 est égale à 0,11 ± 0,01 ($p < 0,05$).

II.2.3.3. Pouvoir réducteur du fer

Les résultats de l'activité réductrice des différents extraits des plantes étudiées, sont représentés dans les figures (III.26, III.27 et III.28), on constate que l'activité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration.

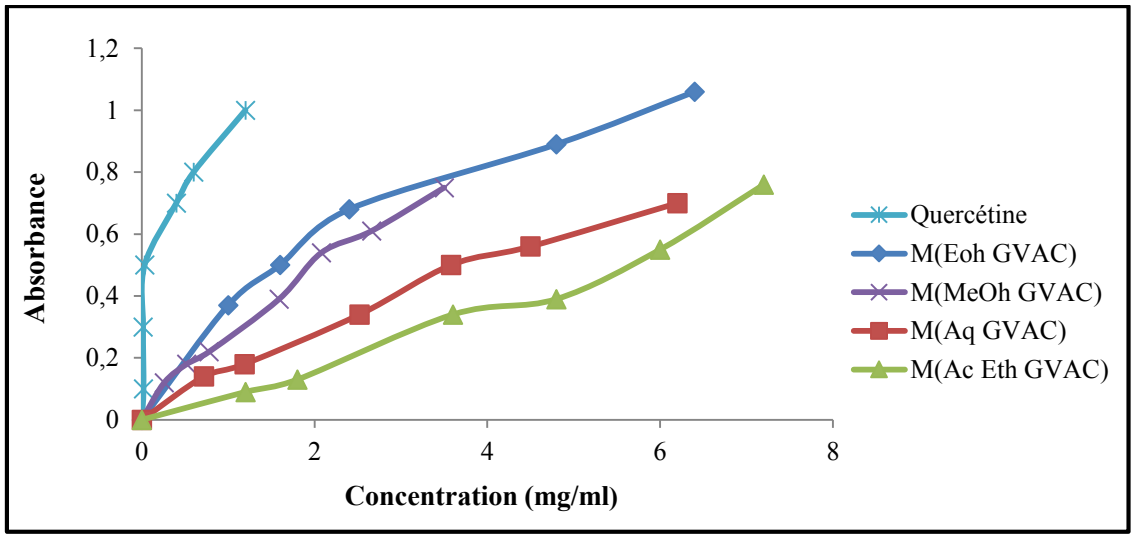


Figure III.26: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des Graines de *Vitex agnus castus L.* préparés par macération et la Quercétine.
M (Eth GVAC) : Extrait éthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Aq GVAC) : Extrait aqueux des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Meth GVAC) : Extrait méthanolique des graines du *Vitex agnus castus* ; M (Ac Eth GVAC) : Extrait d'acétate d'éthyle des graines de *Vitex agnus castus*.

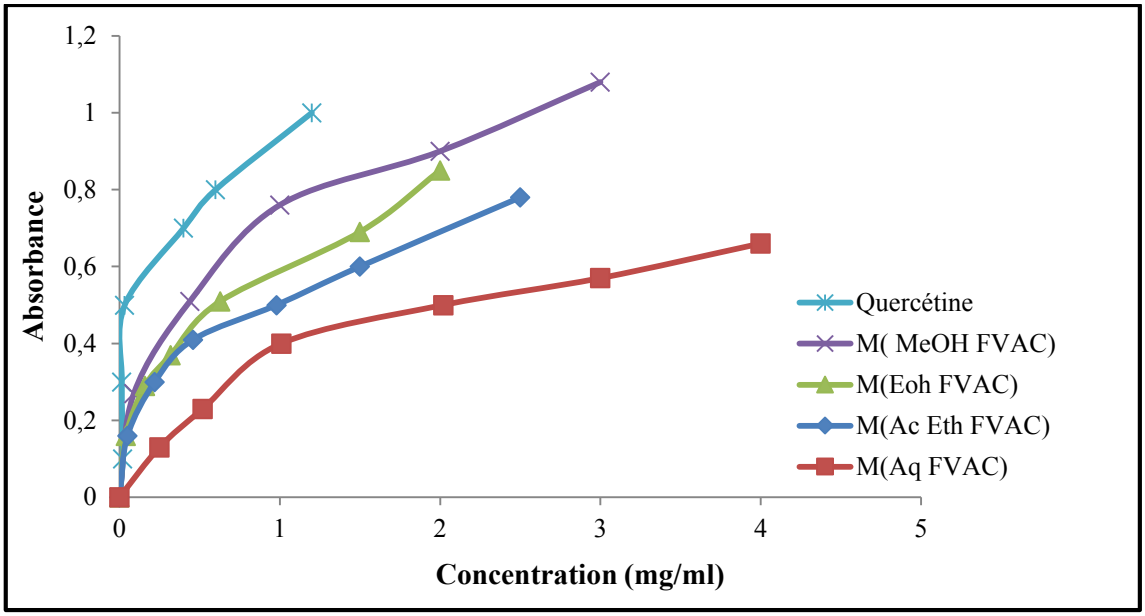


Figure III.27: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des feuilles de VAC préparés par macération et la Quercétine.

M (Eth F VAC) : Extrait éthanolique des feuilles du *Vitex agnus castus* ; M (Aq F VAC) : Extrait aqueux des Feuilles du *Vitex agnus castus* ; M (Meth F VAC) : Extrait méthanolique des feuilles du *Vitex agnus castus* ; M (Ac Eth F VAC) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles *Vitex agnus castus*.

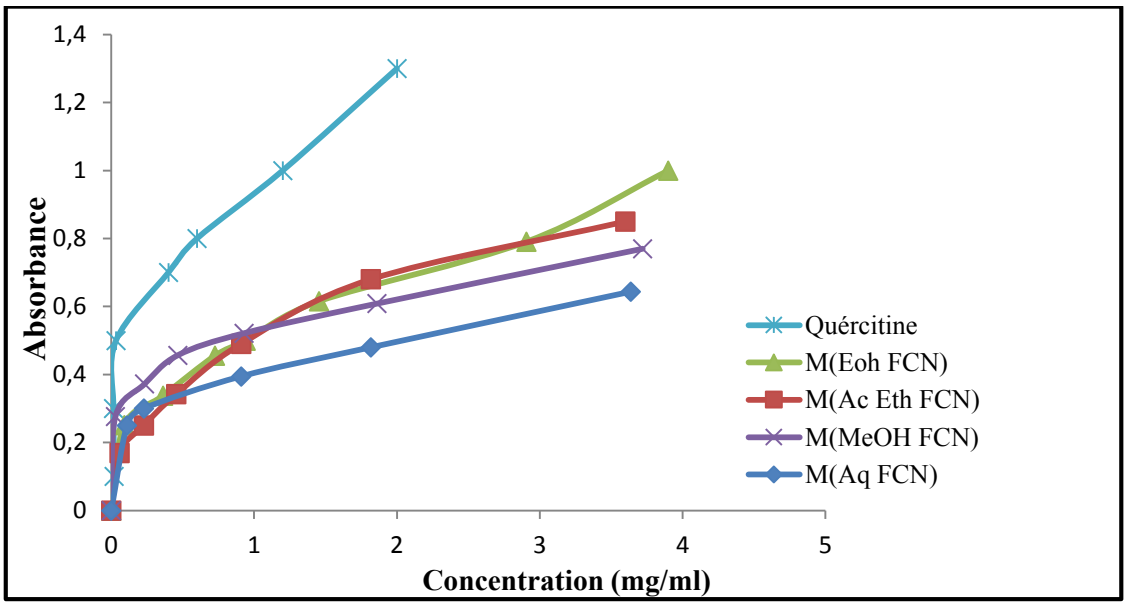


Figure III.28: Absorbance en fonction de différentes concentrations des extraits des feuilles de la citronnelle préparés par macération et la Quercétine.

M (Eth F CN) : Extrais ethalolique des feuilles du *Cymbopogon nardus* ; M (Aq F CN) : Extrait aqueux des Feuilles du *Cymbopogon nardus* ; M (Meth F CN) : Extrait méthanolique des feuilles du *Cymbopogon nardus* ; M (AcEth FCN) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Cymbopogon nardus*.

Pour pouvoir comparer le pouvoir réducteur, on a calculé les EC_{50} à partir des différentes courbes. Les résultats sont exprimés dans le tableau (III.15).

Tableau III.15: Les valeurs des EC_{50} pour les différents extraits exprimées en moyenne ± SD (n = 3).

Plantes	EC_{50}Extraits			
	Aq	MeOh	EOh	Ac Eth
Graines VAC	85,3 ±15,0[a]	05,1±1510[a]	151±0.08 [a]	,508±15,, [a]
Feuilles VAC	2512±1521[b]	1500±1510[b]	15,8±1510[a]	15,3±1510[b]
Feuilles CN	251,±1523[b]	1530±1520[b]	15,0±1510[a]	050±15,3 [b]

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction (p <0,001). EOh : Extrait d'éthanol ; MeOh : Extrait methanolique ; Aq : Extrait aqueux ; AcEth : Extrait acétate d'éthyle.

L'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à l'EC_{50}. L'extrait méthanolique des feuilles VAC enregistre la meilleure capacité réductrice avec une valeur d'EC_{50} qui est égale à 1,00 ± 1,10 mg/ml, suivi par l'extrait éthanolique des feuilles VAC dont la valeur d'EC_{50} est de l'ordre de 1, ,8 ± 1,10 mg/ml. Quel que soit le type de solvant, ce sont les graines VAC qui possèdent le pouvoir réducteur le plus faible. En comparaison avec la Quercétine (EC_{50}=0,033 ± 0,0004 mg/ml), tous les extraits testés sont significativement moins actifs.

II.2.3.4. Corrélation

- **Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols) et la CAT**

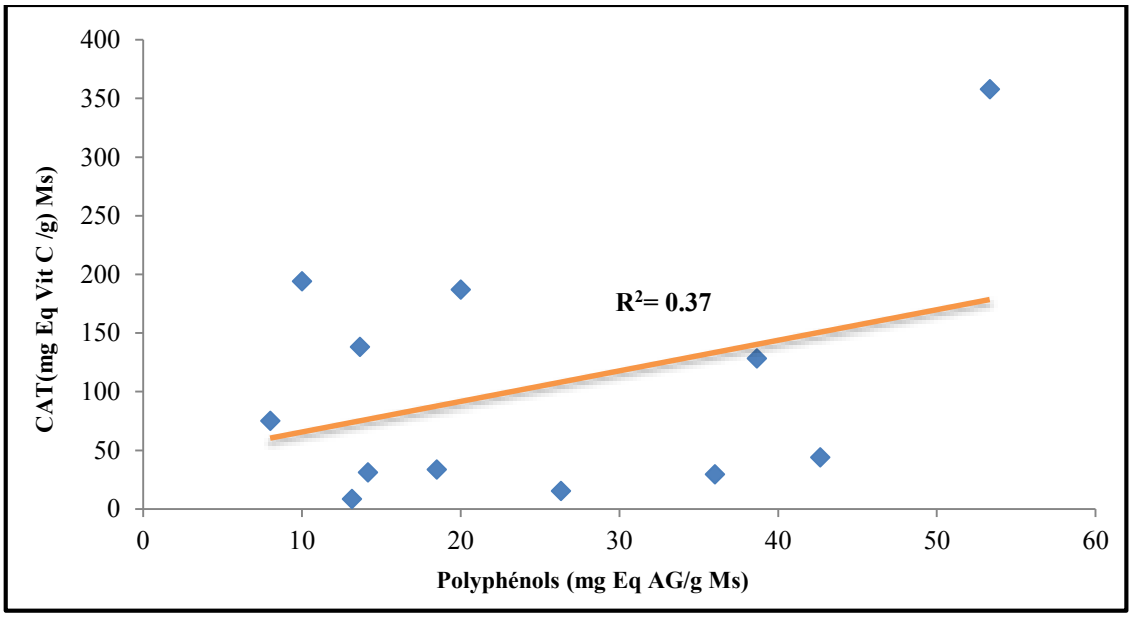


Figure III.29: Corrélation entre la capacité antioxydante totale et la teneur des extraits en polyphénols totaux.

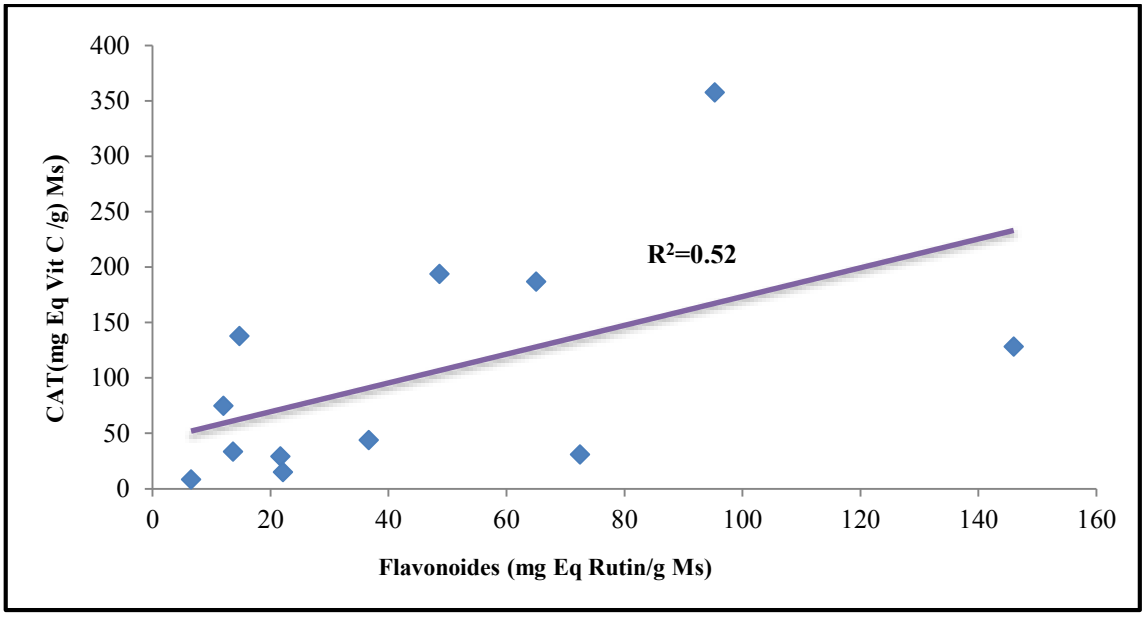


Figure III.30: Corrélation entre la capacité antioxydante totale et la teneur des extraits en flavonoïdes.

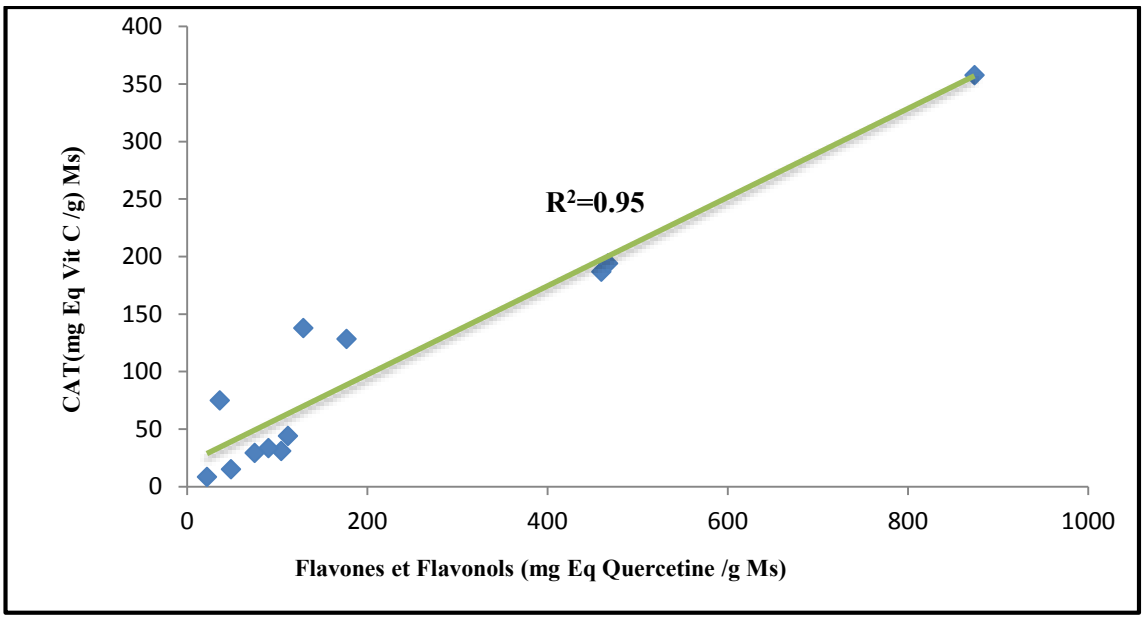


Figure III.31: Corrélation entre la capacité antioxydante totale et la teneur en Flavones et Flavonols.

Dans le but d'établir une corrélation entre la capacité antioxydante totale et la teneur en polyphenols, flavonoïdes, flavones et flavonols, nous avons calculé le coefficient de corrélation. Les résultats sont représentés dans les figures (III.29, III.30, III.31). On remarque l'absence d'une corrélation significative entre la CAT et la teneur en polyphénols. Cependant, une corrélation importante est remarquée entre la CAT et les flavonoïdes. Une forte corrélation a été également enregistré entre la CAT et la teneur en flavones et flavonols (R^2=0,95).

➢ **Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, flavonols) et les IC_{50}**

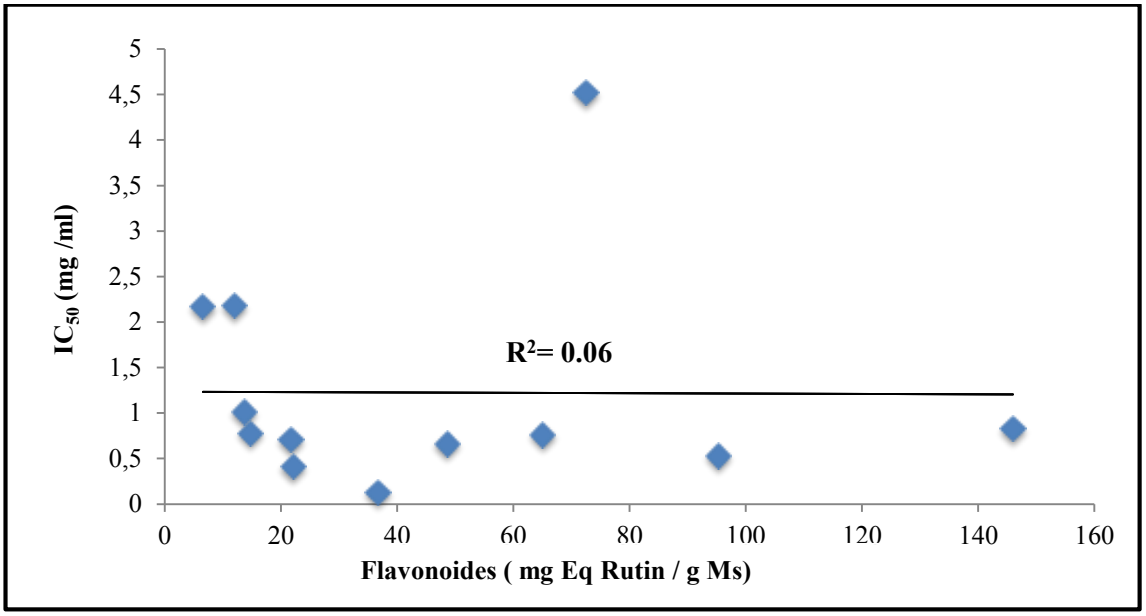


Figure III.32 : Corrélation entre les valeurs d'IC_{50} et la teneur des extraits en flavonoïdes.

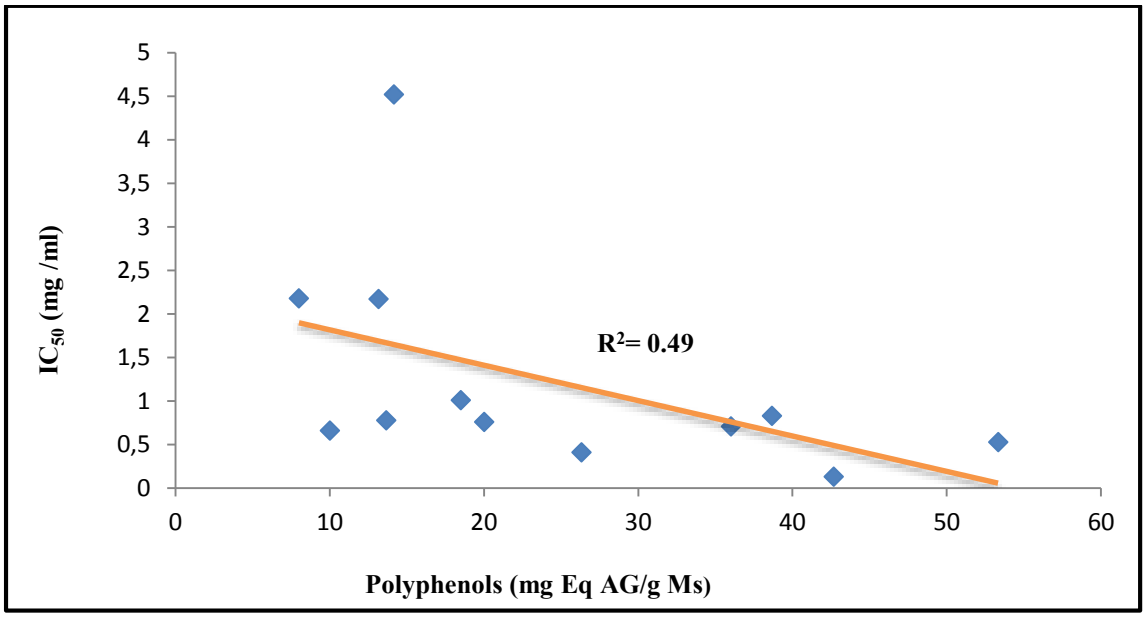


Figure III.33: Corrélation entre les valeurs d'IC_{50} et la teneur des extraits en polyphénols totaux.

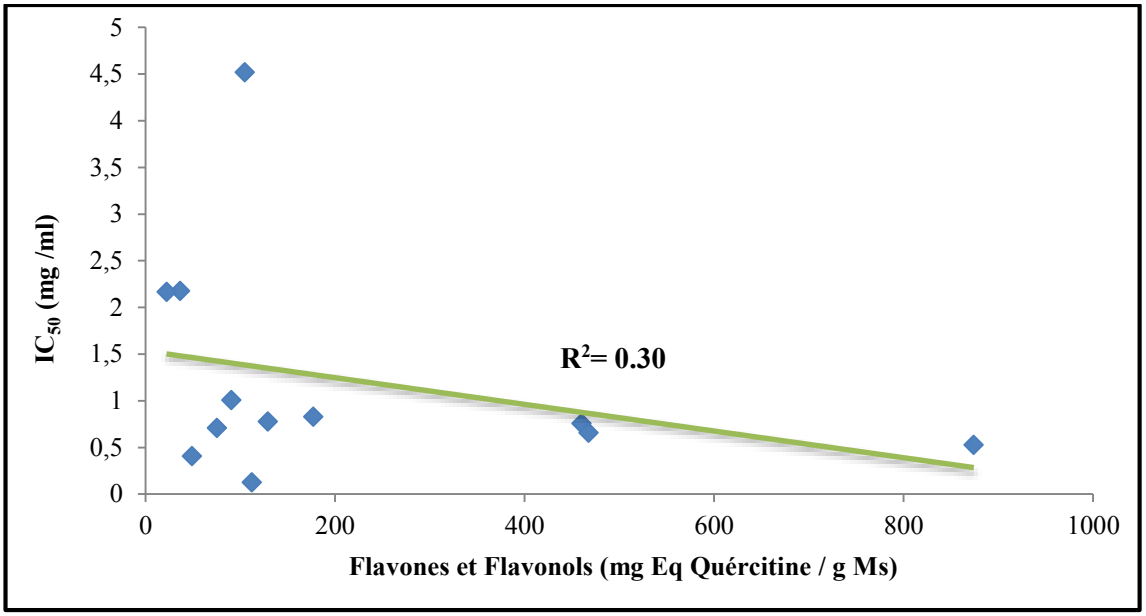


Figure III.34: Corrélation entre les valeurs d'IC_{50} et la teneur en Flavones et Flavonols.

Les résultats illustrés dans les différentes figures (III.32, III.33 et III.34) montrent une absence de corrélation significative entre la capacité de piégeage de radical libre DPPH et la teneur en différents métabolites secondaires. Les coéfficients de corrélation sont de l'ordre de R^2=0,06 pour les flavonoïdes, R^2= 0,49 pour les polyphénols et R^2= 0,37 pour la teneur en flavones et flavonols.

- **Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, flavonols) et les EC_{50} :**

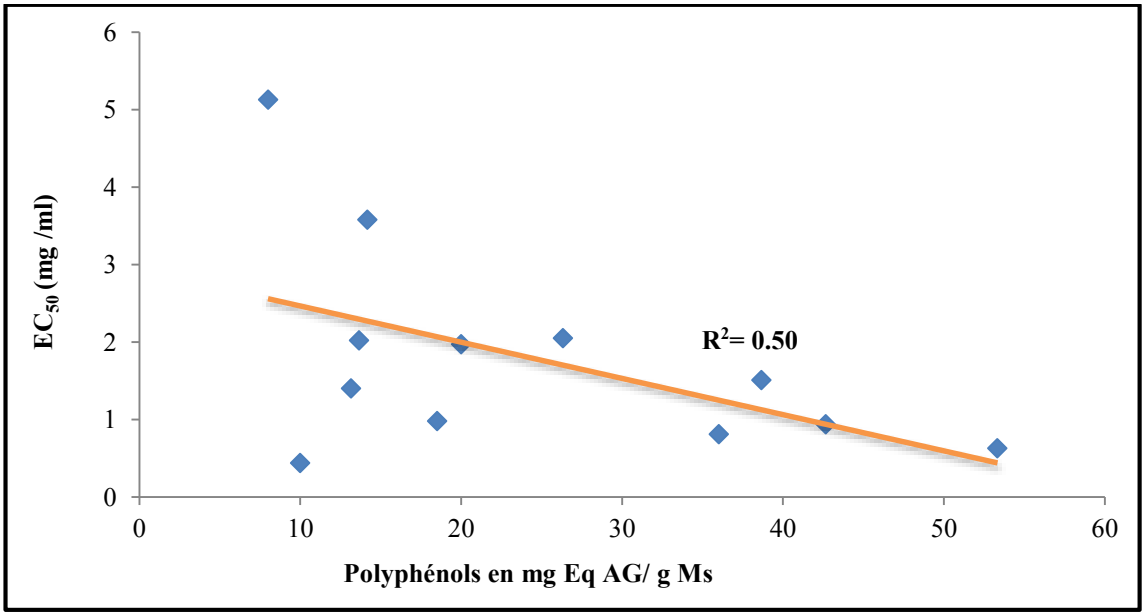


Figure III.35: Corrélation entre les valeurs d'EC_{50} et la teneur des extraits en polyphénols totaux.

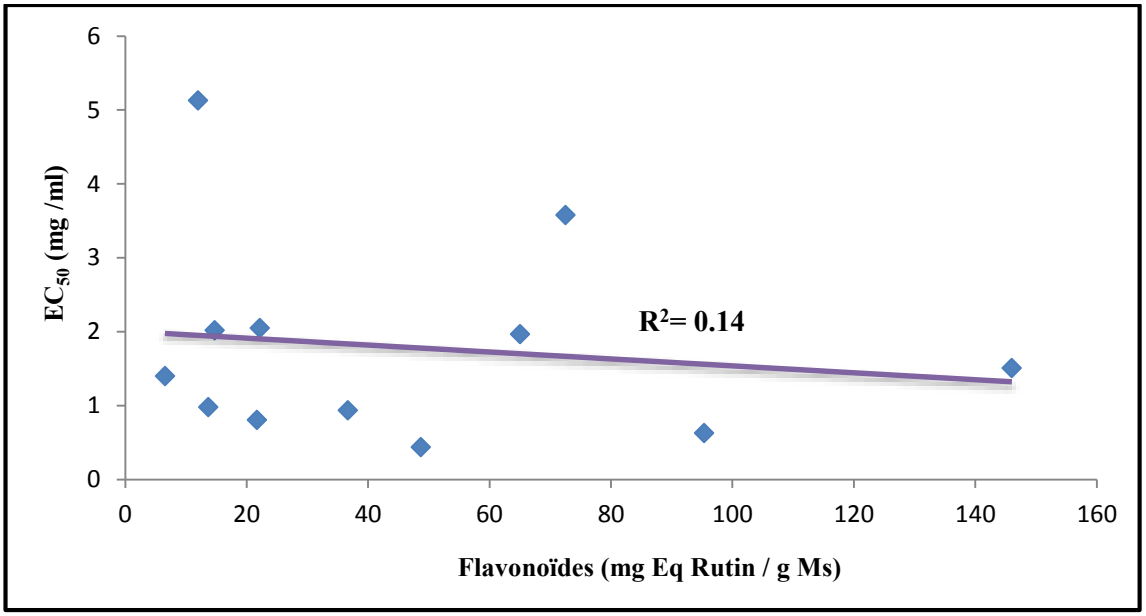


Figure III.36: Corrélation entre les valeurs d'EC_{50} et la teneur des extraits en flavonoïdes.

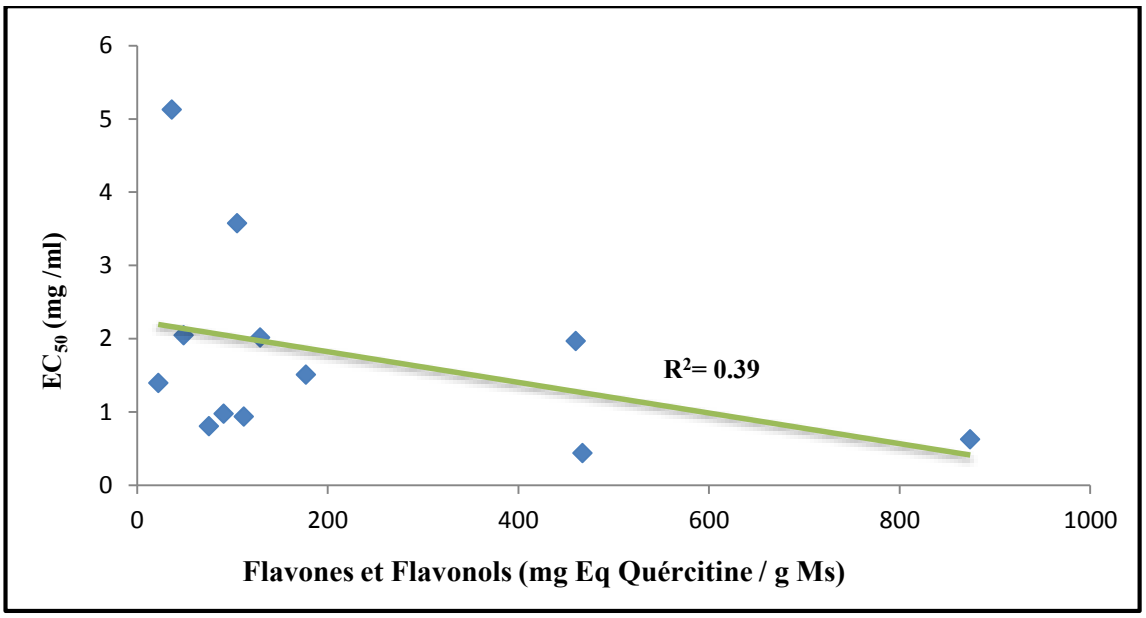


Figure III. 37: Corrélation entre les valeurs d'EC_{50} et la teneur en Flavones et Flavonols.

Les résultats obtenus montrent l'absence d'une corrélation significative entre le paramètre EC50 et la teneur en différents composées. La valeur la plus faible a été observée entre la capacité de réduction de fer et la et la teneur en flavonoïdes (R^2= 0,14).

III. Discussion

III.1. Rendement d'extraction

Les rendements des extractions ont été calculés par rapport au poids sec total. Les résultats montrent que quelle que soit la plante ou l'organe concerné, c'est l'extrait aqueux qui donne le

rendement le plus élevé, suivi par le méthanol et l'éthanol pour les deux méthodes d'extraction : soxhlet et macéré. Cependant l'acétate d'éthyle donne le rendement le plus faible pour les deux plantes étudiées. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par Sağlam et al. (2007*)* qui ont rapporté que l'eau donnait le meilleur rendement (38,06%) par rapport aux extraits à l'éthanol et au n-hexane des feuilles et graines de *Vitex agnus-castus* Cette observation est également soutenue par les résultats obtenus lors de l'extraction à partir de la racine de *Paramignya trimera* où les solvants polaires, le méthanol et l'eau donnaient les meilleurs rendements d'extraction (Nguyen et al., 2016). En effet, plusieurs paramètres peuvent influencer le rendement, telle que la méthode d'extraction, les conditions d'extraction (le temps et la température), ainsi que le volume et le type de solvant utilisé (Chew et al., 2011; Chigayo et al., 2016).

III.2. Criblage phytochimique

L'analyse qualitative des extraits de *Vitex agnus castus* et de *Cymbopogon nardus* a révélé la présence de différents métabolites secondaires avec des degrés d'abondance qui différent selon la plante ou l'organe étudié et selon le type de solvant utilisé. En effet, une analyse faite sur *Vitex agnus castus* récolté à Agadir, rapporte que les extraits méthanolique des feuilles est des fruits sont riches en alkaloides, saponines, terpènes, flavonoïdes et polyphénols (Hamdouch et al., 2018). Ceci concorde parfaitement avec nos résultats qui montrent la richesse des extraits méthanolique et aqueux des deux parties de la plante en métabolites secondaires.

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'espèce *Cymbopogon nardus*, pour pouvoir comparer nos résultats qui révèlent une teneur importante de cette espèce en métabolites secondaires. Cependant, l'analyse phytochimique de l'extrait methanolique de *Cymbopogon citratus* a révélé sa richesse en alcaloïdes, saponines, tanins, anthraquinones, stéroïdes, phénols et flavonoïdes (Asaolu et al., 2009). La richesse des espèces étudiées en différentes classes de métabolites secondaires, peut expliquer en partie ces différentes activités biologiques observées.

III.3. Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols

La teneur en polyphénols a été exprimée en mg Eq AG/g Ms. Les résultats de La distribution des composés phénoliques chez les feuilles et les graines de *Vitex agnus castus* ont montré que les extraits aqueux et éthanolique préparés par les deux techniques macérée et Soxhlet, contiennent les quantités les plus élevées de polyphénols par rapport aux autres extraits. Ceci

confirme les résultats rapportés par Latoui et al., (2012) qui ont démontré que l'éthanol se comportait comme le meilleur solvant pour extraire les polyphénols totaux à partir des graines de *Vitex agnus castus*, dont les concentrations sont 3 à 5 fois supérieures que celles obtenues avec du méthanol**.** Concernant les organes, le contenu phénolique été généralement répartit d'une manière inégale dans les graines VAC par rapport aux feuilles VAC. Cette inégalité de répartition de polyphénols dans les différents organes de la même plante a été rapportée par plusieurs auteurs (El-Haci et al., 2012; N'Guessan et al., 2011).

Pour les quatre types d'extraits préparés par la technique de Soxhlet, ce sont généralement les feuilles de citronnelle qui contiennent les teneurs significativement les plus faibles en polyphénols. Toutefois, les extraits méthanolique et aqueux de la citronnelle préparés par macération montrent des quantités plus importantes en polyphénols par rapport aux graines et aux feuilles de *Vitex agnus castus*. Concernant les solvants d'extraction, c'est l'acétate d'éthyle qui donne le rendement le plus faible en composés phénolique pour les deux techniques, quel que soit l'organe ou la plante étudiée. Nos résultats sont cohérents avec plusieurs publications qui ont montré que la quantité de polyphénols dans les plantes dépend des facteurs biologiques, ainsi que des conditions édaphiques et environnementales (température, salinité, stress hydrique et intensité lumineuse). De plus, la solubilité des composés phénoliques dépend du type de solvant utilisé, de la technique d'extraction , du degré de polymérisation des composés phénoliques et de leur interaction (Ksouri et al., 2008).

Les résultats du contenu flavonoïdique, montrent que Les teneurs les plus basses en flavonoïdes ont été obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle quelle que soit la plante étudiée ou la technique utilisée. D'après une étude réalisée par Sarikurkcu et al. sur les graines de *Vitex agnus castus* récoltées en Turquie, Le rendement minimal d'extraction des flavonoïdes a été également obtenu dans l'extrait d'acétate d'éthyle (7,12 ± 0,08 µE QEs / mg d'extrait) en comparaison avec le méthanol, l'hexane, le dichlorométhane et l'eau (Sarikurkcu et al., 2009).

Selon certains rapports, les différentes parties de *Vitex agnus castus* y compris les fruits, les fleurs et les feuilles de VAC sont riches en flavonoïdes, en tanins, en iridoïdes et en diterpénoïdes (Antolić and Maleš, 1997; Wollenweber and Mann, 1982).

Tous les extraits préparés par Soxhlet, possèdent des concentrations en flavonoïdes significativement supérieures dans les feuilles VAC par rapport aux graines VAC et aux feuilles CN. Cependant, ce sont généralement les extraits des graines qui contiennent les quantités les

plus importantes en flavonoïdes s'ils sont préparés par macération. En ce qui concerne le solvant d'extraction, l'éthanol reste le meilleur d'extraction des flavonoïdes pour les deux espèces étudiées. Ainsi, la concentration en flavonoïdes dans les extraits de plantes dépend de la polarité des solvants utilisés, plus un solvant est polaire, plus le rendement en flavonoïdes est important (Gao and Liu, 2005).

III.4. Activité antioxydante

Jusqu'au présent, il n'ya pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (Prior et al., 2005). C'est la raison pour laquelle notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois tests différents : la capacité antioxydante totale (CAT), piégeage du radical libre (DPPH) et le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).

L'estimation de la capacité antioxydante totale a montré que tous les extraits présentent des activités antioxydantes. Toutefois, Cette capacité antioxydante diffère selon le solvant d'extraction, l'organe et la plante étudiée. Généralement, ce sont les extraits des feuilles et des graines de VAC qui enregistrent les meilleures capacités antioxydantes par rapport à ceux de la citronnelle. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antioxydante totale des extraits de ces deux espèces, il est difficile donc de comparer nos résultats avec les données de la littérature scientifique.

III.4.1. DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts des plantes a été faite par la technique du DPPH, en comparaison avec celle d'un antioxydant de synthèse, le BHT. Pour pouvoir comparer le potentiel antioxydant des différents extraits, il faut calculer le paramètre IC_{50}, qui est une mesure quantitative définie comme la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire 50 % de la concentration initiale du DPPH. Pour chaque extrait l'IC_{50} est déduite à partir de la droite d'étalonnage correspondante. Une faible valeur IC_{50} signifie une forte activité antioxydante.

Un extrait est considéré comme actif contre les radicaux libres si la IC_{50} est inférieure à 5 mg /ml (Abdillah et al., 2015).Tous nos extraits ont une valeur de IC_{50} inférieure à 5 mg / ml. Par conséquent, les deux plantes étudiées constituent une bonne source d'antioxydants. En outre, nous avons comparé nos résultats avec ceux des études antérieures ; L'activité

antioxydante de l'extrait méthanolique des fruits et des feuilles du gattilier collectées à Antalya a été étudiée par la technique de DPPH, les résultats ont montré que ces extraits possèdent une forte activité antioxydante avec des IC_{50} de l'ordre de 0,449±0,001 mg/ml pour les feuilles et 0,612±0,004 mg/ml pour les graines (Gökbulut et al., 2010). Ces données corroborent parfaitement avec les résultats de la présente étude en terme de la forte activité antioxydante obtenue par les extraits méthanoliques des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* marocaine préparé par soxhlet dont les IC_{50} sont de l'ordre de 0,71 ± 0,33 mg / ml pour les graines et 0,64 ± 0,04 mg / ml pour les feuilles.

Sarikurkcu et al., (2009) ont également évalué l'activité antioxydante des différents extraits des fruits et des feuilles de *Vitex agnus castus* preparés par la technique de soxhlet. Les résultats de ce travail supportent ceux de la présente étude, le meilleur pourcentage d'inhibition du radical DPPH est obtenu par l'extrait aqueux (82,72% ± 0,07) suivi de l'extrait méthanolique (46,65% ± 0,62)

Ce test est basé sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. Il a été rapporté que les polyphénols et les flavonoïdes sont des donateurs efficaces d'atomes d'hydrogène au radical DPPH en raison de leurs structures chimiques idéales (Erol et al., 2010; Shimoi et al., 1996). Ainsi, les résultats des études antérieures ont montré la richesse de l'espèce *Vitex agnus castus* en certains composés phénoliques connus comme agents antioxydants tels que la casticine, l'acide caféique et l'acide chlorogénique (Hoberg et al., 2001, 2000; Şarer and Gökbulut, 2008). Une étude récente a également rapporté la présence d'une quantité importante de la Vitexine qu'est une substance antioxydante dans les feuilles (0,252 ± 0,0089%) et les fruits (0,342 ± 0,0153%) de *Vitex agnus castus* (Gökbulut et al., 2010). Donc, la richesse de nos extraits en polyphenols et en flavonoïdes peut probablement expliquer leur effet antioxydant (Sarikurkcu et al., 2009).

En ce qui concerne *Cymbopogon nardus,* on remarque que les extraits éthanolique et aqueux possèdent une forte capacité de balayage du radical DPPH bien qu'ils enregistrent les valeurs les plus faibles de la capacité antioxydante totale. Ce résultat est corroboré avec ceux obtenus par Miliauskas et al., (2004) qui ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre.

III.4.2. FRAP

L'efficacité de réduction de fer est inversement proportionnelle à l'EC_{50}, La comparaison des résultats a révélé une variabilité significative corroborée au type du solvant d'extraction, la partie de la plante étudiée et la technique d'extraction. En effet, tous les extraits des feuilles CN préparés par la technique du soxhlet présentent une activité réductrice significativement plus importante que celle des graines et des feuilles VAC. Tandis que dans le cas des autres extraits préparés par macération, c'est plutôt l'extrait méthanolique des feuilles VAC qui enregistre la meilleure capacité réductrice avec une valeur d'EC_{50} qui est égale à 1,00 ± 1,10 mg/ml, suivi par l'extrait éthanolique des feuilles VAC dont la valeur d'EC_{50} est de l'ordre de 1,,8 ± 1,10 mg/ml.

Le pouvoir réducteur des deux espèces étudiées est probablement dû à la présence de groupements hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju and Becker, 2007).

Les résultats de ce travail révèlent la richesse des deux plantes en polyphénols, ceci peut expliquer la capacité de ces différents extraits à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+}. Toutefois, d'autres composés tels que les Anthraquinones peuvent intervenir comme des agents réducteurs du fer (Yen and Chuang, 2000).

III.5. Corrélations

Pour les deux méthodes d'extraction, nous enregistrons l'absence d'une corrélation entre les deux techniques du pouvoir antioxydant (Test DPPH, FRAP) et les teneurs en polyphénols, en d'autres termes, un extrait qui possède une forte teneur en polyphénols n'est pas nécessairement très actif comme agent antioxydant. Ce résultat est confirmé par d'autres groupes de chercheurs (Moure et al., 2001; Sun and Ho, 2005). L'absence de cette corrélation est due probablement à la synergie de ces molécules avec d'autres métabolites secondaires. Il n'est exclu que le pouvoir antioxydant serait dépendant aussi de la structure des polyphénols.

Une très forte corrélation existe entre la CAT et la teneur en flavones et flavonols (R2=0.93) et (R2= 0.95). Ces molécules sont connues par leurs activités antioxydantes puissantes essentiellement due à la présence de double liaison et de groupe hydroxyle dans leur structures (Cai et al., 2004).

IV. Conclusion

L'analyse quantitative des différents extraits de *Vitex agnus castus* et *Cymbopogon nardus* montre la richesse de ces deux plantes en polyphénols, flavonoïdes, flavone et flavonols .il s'agit de composés connus par leurs diverses propriétés biologiques. De plus, l'évaluation de l'activité antioxydante de ces mêmes extraits par différents tests (DPPH, FRAP, CAT) montre que les deux plantes étudiées sont dotées d'un pouvoir antioxydant puissant. Ainsi, *Vitex agnus castus* et *Cymbopogon nardus* peuvent constituer une source importante d'antioxydants naturels qui remplacent les antioxydants de synthèse, à condition que le solvant et la technique d'extraction soient appropriés.

.

Chapitre III : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux de *Vitex agnus castus L.* et de *Cymbopogon nardus L*

I. Introduction

L'inflammation et la douleur sont deux phénomènes fréquents dans un grand nombre de maladies surtout les maladies chroniques y compris le cancer. Le traitement de l'inflammation consiste à l'utilisation des médicaments anti-inflammatoires. Cependant l'utilisation des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens peut être associée à de nombreux effets secondaires tels que l'ulcère gastro-intestinale et l'insuffisance rénale. Il s'impose alors un besoin urgent de développer de nouveaux agents thérapeutiques permettant le traitement de l'inflammation et de la douleur afin d'établir l'homéostasie tissulaire sans effets indésirables.

Grâce a leur richesse en métabolites secondaires, les plantes aromatiques et médicinales constituent une source inépuisable de nouvelles molécules qui peuvent servir comme principe actif pour le développement de nouveaux anti-inflammatoires et antalgiques ayant mois d'effets secondaires.

L'objectif de cette partie est basé sur l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus L.* et des feuilles de *Cymbopogon nardus L.*

II. Résultats

II.1. Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus* ainsi que les feuilles de *Cymbopogon nardus* a été réalisée par la méthode de l'œdème induite par la carraggénine décrite par Winter et al. (1962). Les extraits de plantes ont été administrés par voie orale avec trois doses différentes avant l'injection de la carragénine, et ont été appliqués localement sur l'œdème par le biais des crèmes à base de nos extraits à raison de 5% et 10%.

L'injection de la carragénine à raison de 1% (NaCl 0.9%) sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite induit l'œdème. La circonférence de la pâte est mesurée avant l'injection

de la carragénine, puis au bout de chaque heure à partir de la troisième heure jusqu'à la sixième heure. Deux références anti inflammatoires ont été utilisés l'une par voie orale (Diclofénac 1%) et l'autre par voie cutanée (Indométacine/ pommade).

II.1.1. Voie orale

L'estimation de l'effet anti-inflammatoire des extraits et des médicaments de référence est basée sur le calcul du % d'inhibition de l'œdème. Les résultats sont présentés dans les figures (III.38, III.39 et III.40).

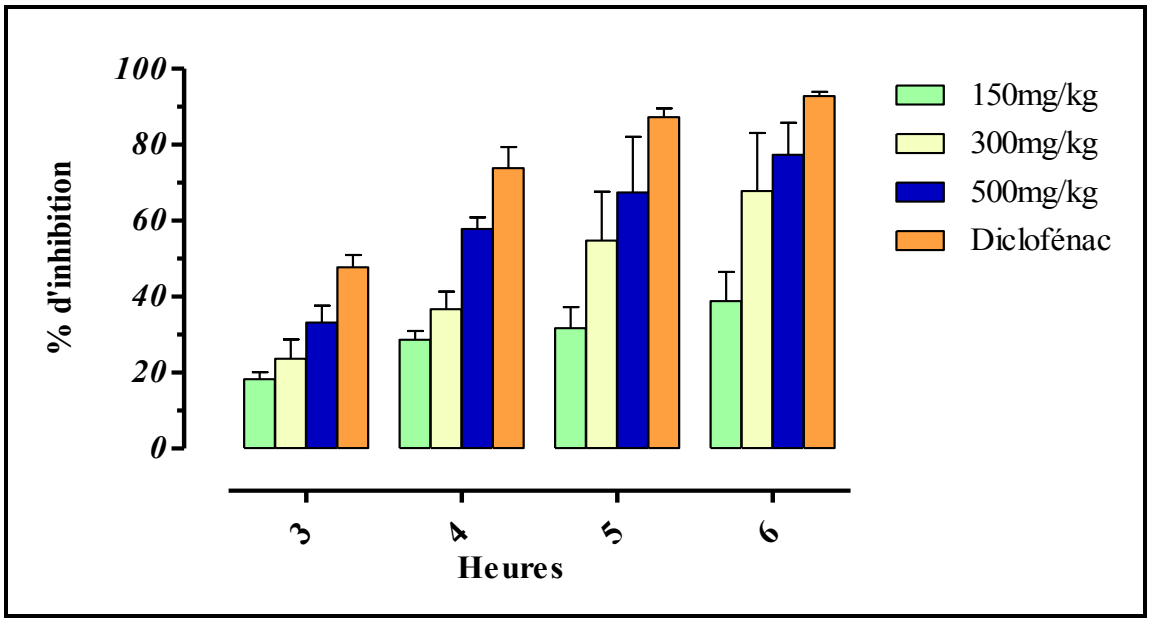


Figure III. 38: Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Cymbopogon nardus* administré par voie orale à différentes doses et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition de l'œdème augmente avec l'augmentation de la dose administrée des extraits à partir de la 3 ème heure jusqu'au la 6 ème heure, ce pourcentage passe de 18,25 ± 1,92 pour l'extrait aqueux des feuilles de *Cymbopogon nardus* à raison de 150mg/kg pendant la 3ème heure à 38, 80 ± 7,74 à la 6ème heure, et de 32,72 ± 2,14 à 84,52 ± 6,73 % pour l'extrait aqueux des graines de *Vitex agnus castus* a raison de 500 mg/kg. Cependant, cette augmentation du pourcentage d'inhibition des différents extraits reste inférieure à celle du médicament de référence le diclofénac, à l'exception de l'extrait aqueux des feuilles de *Vitex agnus castus* a raison de 500mg/kg, qui présente un effet similaire (89,17 ± 4,12) à celui du diclofénac (92,13 ± 4,12) pendant la 6ème heure.

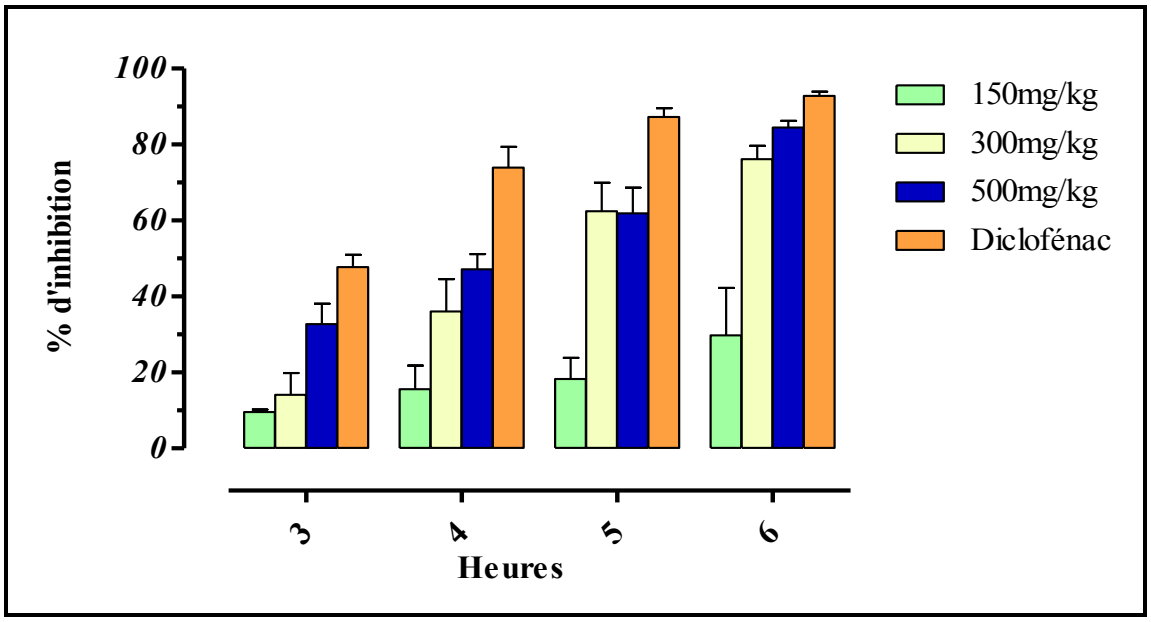


Figure III.39: Effet de l'extrait aqueux des graines de *Vitex agnus castus* administré par voie orale à différentes doses et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

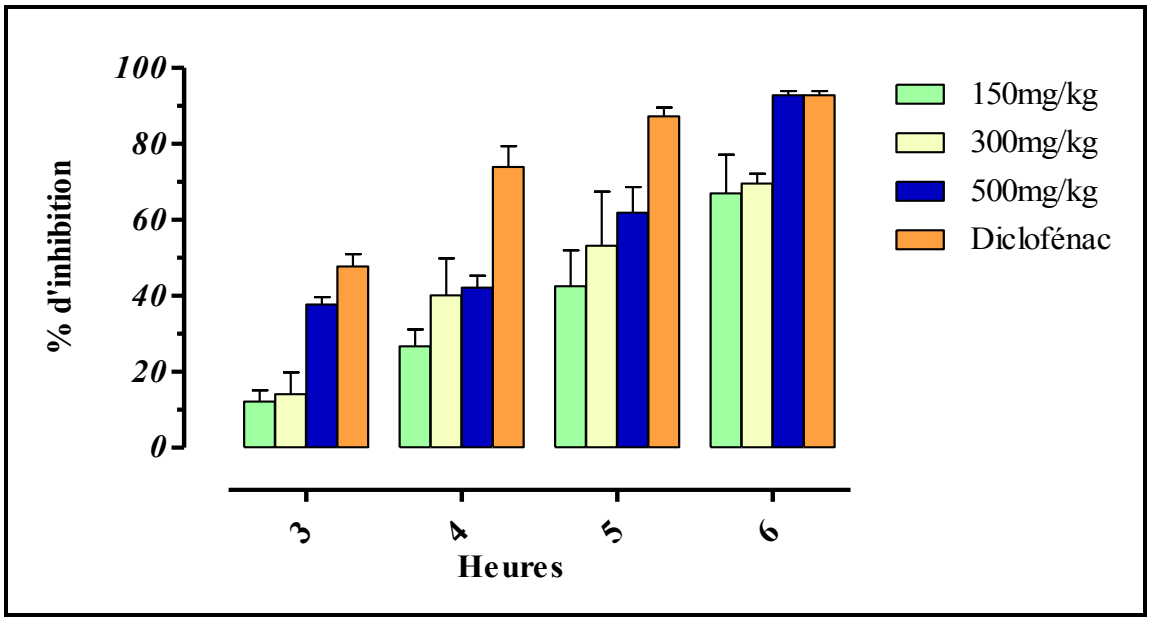


Figure III.40: Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *Vitex agnus castus* administré par voie orale à différentes doses et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

II.1.2. Voie cutanée

L'extrait aqueux des feuilles de *Cymbopogon nardus* appliqué localement sous forme de crème, à des doses de 5% et 10%, semble présenter un effet anti inflammatoire important mais inférieur à celui de l'indométacine. Ainsi, la crème de 10% réduit l'œdème de façon très importante avec une inhibition maximale de 89,87% ± 5,84 à la 6ème heure contre un % de

61.90 ±4.73 enregistré pour la crème de 5%. Parallèlement, le médicament de référence utilisé comme témoin positif reste plus efficace avec un pourcentage d'inhibition maximal de 96.8 ± 3.19% (Fig. III.41).

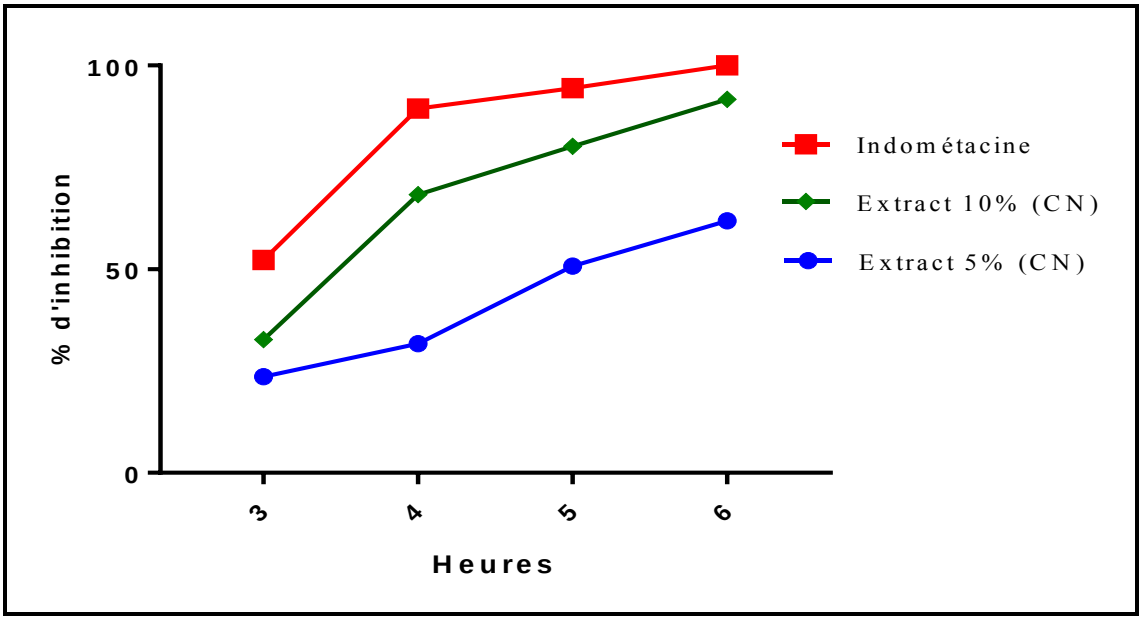


Figure III.41: Effet de la crème à base de citronnelle appliquée par voie cutanée à deux doses différentes (5 et 10 %) et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

Les résultats de l'application locale des crèmes à base des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus,* montrent que cette plante possède un effet antinflammatoir puissant et dose dépendant (Fig. III.42 et III.43). Cependant, l'effet anti-inflammatoire des feuilles est beaucoup plus important que celui des graines. Après 6heures d'application, l'effet de la crème 10% à base de l'extrait des feuilles est similaire à celui de l'indométacine avec un pourcentage d'inhibition de 96.8 %.

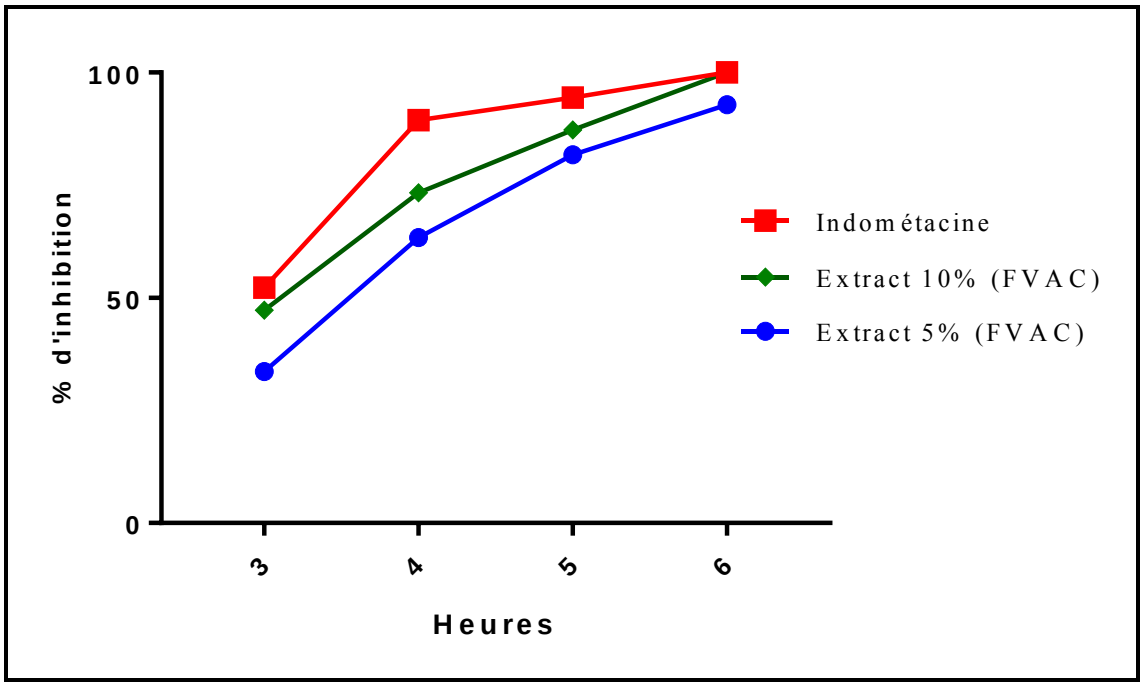


Figure III.42: Effet de la crème à base des feuilles de VAC appliquée par voie cutanée à deux doses différentes (5 et 10%) et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

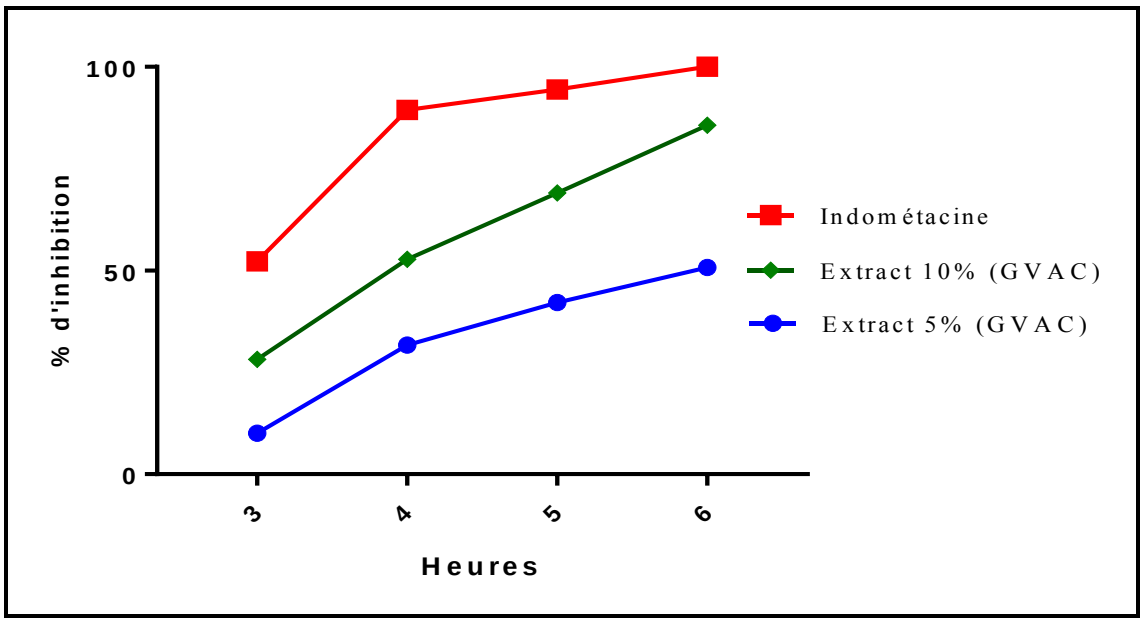


Figure III.43: Effet de la crème à base des graines VAC appliquée par voie cutanée à deux doses différentes (5 et 10%) et de la Diclofénac 1% sur l'œdème induit chez le rat par la carragénine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM.

II.2. Activité analgésique

Les contractions abdominales induites par l'injection de l'acide acétique ont été utilisés à raison de 50mg/kg de poids corporel pour évaluer l'activité analgésique des extraits étudiés. Les résultats du test de koster sont présentés dans la figure (III.44).

Ces résultats du test montrent que le nombre de contractions induites par l'acide acétique est réduit significativement ($p < 0.001$) par les extraits de plantes administrées par voie orale à raison de 150 mg/kg, en comparaison avec le groupe contrôle. Les rats traités par l'analgésique de référence présentent un effet supérieur à celui de rats traités par les extraits avec 46.2 ± 1.18 de contractions abdominales. L'extrait des feuilles de *Vitex agnus castus* était légèrement plus puissant que les autres extraits avec un nombre de contactions de 57.6 ± 2.11, suivi par l'extrait aqueux des graines VAC (60 ± 3.5) et l'extrait aqueux des feuilles de *Cymbopogon nardus* (67.4± 3.8).

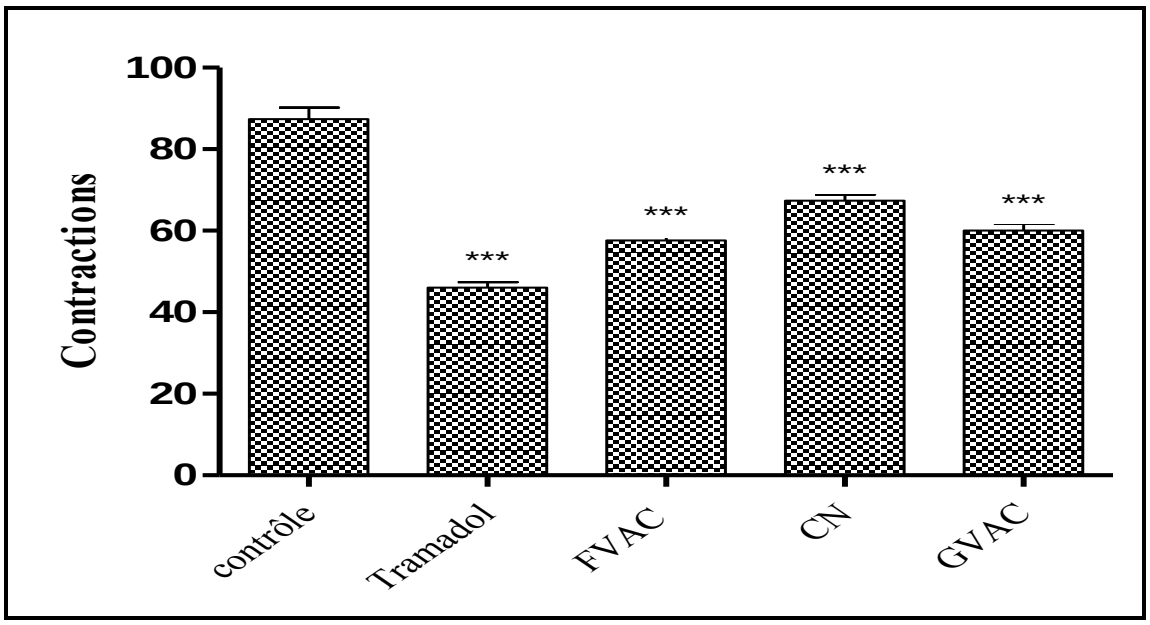


Figure III.44: Activité analgésique des extraits des plantes étudiées et du Tramadol en comparaison avec le groupe contrôle. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. *** : $p < 0.001$.

III. Discussion

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de nos extraits a été réalisée par la méthode de l'œdème induite par la carraggénine. Il s'agit d'un test qui donne des résultats facilement exploitables. Le suivi du pourcentage d'inhibition de l'œdème montre que tous les extraits testés soit par voie orale ou application cutanée possèdent une activité anti-inflammatoire significative durant toute la période du test, avec une efficacité maximale pendant la 6 ème heure. Cet effet anti-inflammatoire est dose dépendant, le pourcentage d'inhibition de l'œdème augmente avec l'augmentation des doses des différents extraits.

Les résultats du test de Koster ont démontré que les extraits de nos plantes exercent une activité analgésique implorante en comparaison avec un médicament de référence qui est le

Tramadol. Cet effet pourrait s'expliquer par une inhibition des récepteurs opioïdes au niveau du système nerveux centrale (Webster et al., 2011; Zhu et al., 2011)**.**

La carragénine est une substance chimique qui induit une réaction inflammatoire engendrant un œdème, lorsqu'elle est injectée dans la patte des rats. En effet, l'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire ; la phase initiale qui dure environ une heure, elle est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, la bradykinine est libérée au cours de la deuxième phase (1,5-3 heures), et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure (Reanmongkol et al., 2009). Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui, à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (Devulder B, Hatron PY, 2002; Rousselet et al., 2005). Par ailleurs, l'administration du diclofénac à la dose de 50 mg/kg par voie orale réduit de façon significative l'augmentation du volume de la patte des rats, ce qui se traduit par une augmentation du pourcentage d'inhibition au fil des heures.

L'ensemble des résultats nous permet de confirmer l'activité anti-inflammatoire et antalgique des extraits aqueux de *Cymbopogon nardus* et *Vitex agnus castus* d'origine marocaine. Ces activités peuvent être expliquées par la richesse de nos extraits de plante en composés polyphénoliques comme les tanins et les flavonoïdes (Bruneton, 1993). Ainsi, le criblage phytochimique a montré que les extraits aqueux des plantes sont riches en flavonoïdes et en polyphénols.

Selon certains chercheurs, l'effet anti-inflammatoire des flavonoïdes est dû à leur capacité d'inhiber les médiateurs de l'inflammation telle que l'histamine (Kim et al. 2004). De plus, de nombreuses études semblent indiquer que l'effet anti-inflammatoire des plantes peut s'exercer soit par une inhibition de la production des molécules pro-inflammatoire comme les prostaglandines et les leucotriènes via l'inhibition de la lipooxygénase et de la cyclooxygénase, soit par la stimulation des glandes surrénales à produire davantage la cortisone qui exerce un effet anti-inflammatoire.

Nos résultats concordent parfaitement avec ceux des études antérieures qui' ont confirmées l'effet anti-inflammatoire et analgésique de l'extrait hydroalcoolique des graines de *Vitex agnus castus* sur le modèle animal (Ramezani et al., 2010). Plus récemment, l'effet analgésique des

huiles essentielles des feuilles de *Vitex agnus castus* a été aussi démontré, (Khalilzadeh et al., 2015) . Cet effet est dû à la richesse des huiles en métabolites secondaires comme l'a-pinène, le sabinène, le limonène, le cinéole et la casticine qui exercent leur effet via la suppression des médiateurs de l'inflammation (Cossuta et al., 2008; Do Amaral et al., 2007; Liou et al., 2014). Les extraits de *Vitex agnus castus* peuvent exercer leur effet analgésique par une action centrale et /ou périphérique (Khalilzadeh et al., 2015).

L'activité analgésique des huiles essentielles de *Cymbopogon nardus* du Congo et du Benin a été étudiée par Abena et al. (2007), Les résultats montraient que ces huiles possèdent une activité analgésique dose dépendante sur les étirements induits par l'acide acétique chez les souris.

IV. Conclusion

Les résultats de L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux de *Vitex agnus castus* et de *Cymbopogon nardus* préparés par macération, ont montré une réduction significative de l'œdème induit par la carragénine et une atténuation des sensations douloureuses provoquées par l'injection intrapéritoniale de l'acide acétique. Ces activités pharmacologiques peuvent être expliquées par la présence de molécules bioactives agissant par divers mécanismes d'action. Ainsi, les extraits testés peuvent constituer des substitues aux anti-inflammatoires chimiques qui ont des effets indésirables sur la santé humaine.

Chapitre IV : Exploration de l'effet diurétique des extraits aqueux de graines et des feuilles de Vitex agnus castus

I. Introduction

Le maintien de l'homéostasie interne est très important pour une vie saine et normale. Ainsi, la vie devient difficile si un changement quelconque perturbe cet équilibre. Les médicaments diurétiques préservent cet équilibre en ajustant le volume sanguin et la concentration en ions dans les fluides corporels. Ces propriétés permettent aux diurétiques de traiter de nombreuses maladies telles que l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale chronique, l'hypercalciurie, l'œdème, le syndrome néphritique et la cirrhose (Hymes and Warshaw, 1987; Salvetti and Ghiadoni, 2006). Cependant, les diurétiques classiques utilisés actuellement, tel que le furosémide, ont été associés à plusieurs effets indésirables, tels que le déséquilibre électrolytique, l'altération des glomérules, stimulation du système rénine-angiotensine, etc (Gupta and Neyses, 2005; Maghrani et al., 2005). Il est donc urgent d'envisager des alternatives aux agents thérapeutiques naturels plus efficaces avec moins d'effets secondaires.

Les plantes médicinales peuvent fournir des intérêts considérables dans le développement de stratégies thérapeutiques alternatives aux agents chimiques. Ainsi, plusieurs études ont été lancées dans les différents laboratoires de recherche ; l'effet diurétique d'un certain nombre d'espèces et de genre a été confirmé tel que *Spergularia purpurea* (Jouad et al., 2001). *Erica multiflora, Cynodon dactylon L, Retama raetam* (Maghrani et al., 2005) *Carum carvi* et *Tanacetum vulgare* (Lahlou et al., 2007). *Silybum marianum* et *Cistus ladaniferus* (El Menyiy et al., 2018).

Vitex agnus castus (Angarf) est bien connu en médecine traditionnelle marocaine comme ayant un effet diurétique. Cependant, aucune investigation scientifique n'a été publiée pour confirmer son effet. Par conséquent, la présente étude est conçue pour explorer l'effet d'une dose unique ou de doses répétées des extraits aqueux des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus,* administrées oralement sur le volume urinaire, les électrolytes plasmatiques, la clairance de la créatinine et l'excrétion urinaire d'électrolytes chez des rats normaux en comparant les effets produits à l'effet d'une drogue pharmaceutique de référence, le furosémide, communément connu sous le nom de *Lasilix*.

II. Résultats

II.1. Traitement aigu

II.1.1. Effet sur le débit urinaire

Le tableau (III.16) montre l'effet aigu des extraits aqueux des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus* administrés par voie orale sur la diurèse chez les rats normaux. D'après ce tableau, les deux extraits induisent une augmentation significative ($p < 0,05$) du volume urinaire juste après la première heure de l'administration par rapport au groupe témoin. Cette augmentation s'accentue et continue à augmenter jusqu'à la fin des vingt-quatre heures. Il est à noter que le volume d'urine était significativement plus élevé dans le groupe traité par l'extrait des graines que dans le groupe traité par l'extrait de feuilles ($P < 0,05$). Après 24 heures de traitement, la diurèse est de l'ordre de 9,10 ± 0,46 et 17,82 ±0,58 ml respectivement pour les extraits de graines et de feuilles contre 2,56 ± 0,18 et 4,12 ± 0,11 ml au début de l'expérience.

Le volume urinaire mesuré après une dose unique de furosémide dépasse significativement celui du groupe contrôle, et ceux des groupes traités par les extraits des graines et des feuilles, pendant toute la période du traitement ($P < 0,05$).

Tableau III.16: Effet aigu de l'eau distillé, des extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* et du furosémide administré par voie orale sur le volume urinaire chez les rats Wistar normaux pendant 24 h.

Groupes	1h	2h	4h	6h	24h
Contrôle	0,47 ± 005	1,13 ± 0,13^	1,41 ± 0,17^	1,95 ± 0,11^	5,53 ± 0,31^
Extrait des graines VAC	4,12 ± 0,11*#	5,36 ± 0,25*^	9,14 ± 0,16*^	12,26 ± 0,27*^	17,82 ±0,58*#^
Extrait des feuilles VAC	2,56 ± 0,18*+	3,21 ± 0,71*+	4,43 ± 0,22*	5,87 ± 0,53*+	9,10 ± 0,46*+
Furosémide	6,45 ± 0,39*+#	9,76 ± 043*+^	13,82 ± 035*^	15,46 ± 0,17*+^	20,55 ± 0,82*+#^

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. * P <0,05 par rapport au groupe contrôle. + P <0,05 vs extrait de graines. #P <0,05 vs extrait de feuilles. ^ P <0,05 par rapport au volume urinaire enregistré après 1 h du traitement.

II.2. Traitement subchronique

II.2.1. Effet sur le volume urinaire

Selon les résultats abrégés dans la figure (III.45), le volume urinaire n'a pas subi de variation significative après traitement par l'eau distillée, alors que l'administration orale réitérée des extraits aqueux de la plante étudiée entraîne une importante augmentation de la diurèse. En effet, le traitement avec les extraits de VAC induit une augmentation significative de l'excrétion

urinaire de l'eau dès le premier jour (P <0,05) et qui se poursuit jusqu'au dernier jour du traitement. L'extrait des graines était plus puissant en tant que diurétique par rapport à l'extrait des feuilles (P <0,05) ; Après 16 jours de traitement, la diurèse passe de 5,86 ± 0,44 ml/24h à 17,7 ± 0,53 ml/24h pour le groupe traité par l'extrait des graines contre un volume de 5,13 ± 0,21 ml/24h qui passe à 9,46 ± 0,28 ml/24h pour le groupe traité par l'extrait des feuilles. Quant au furosémide, l'effet diurétique de la dose quotidienne était significativement supérieur à celui des extraits de feuilles et de graines du jour 1 au jour 16 (P <0,05).

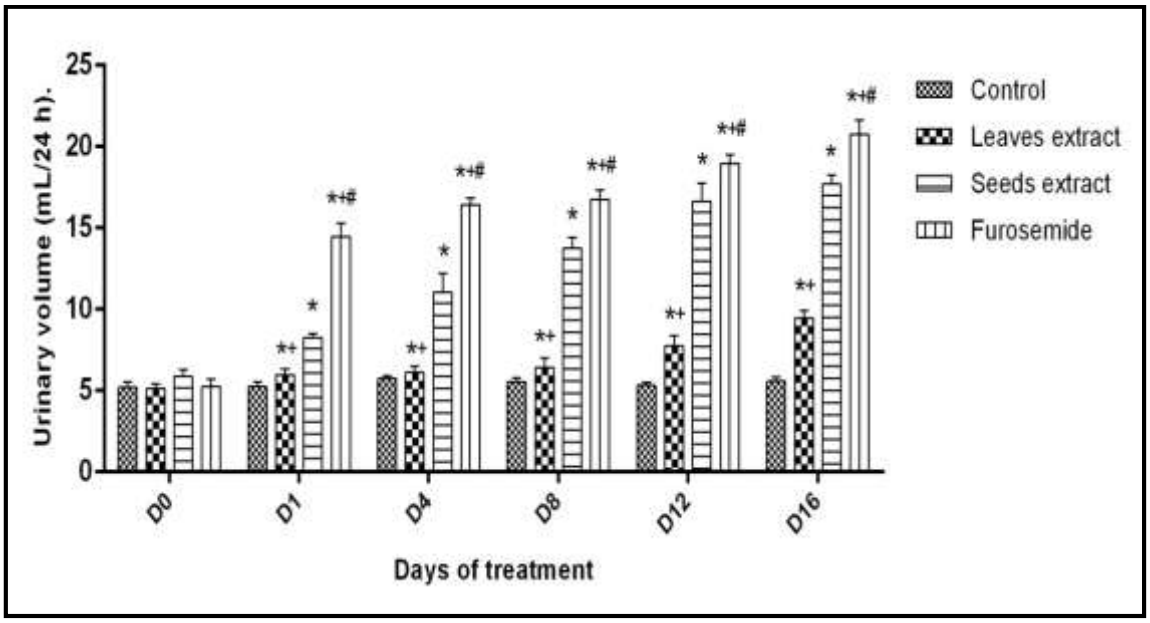


Figure III.45: Effet subchronique de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* et du furosémide sur le volume urinaire quotidien (mL/24 h).

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. * P <0,05 vs contrôle. + P <0,05 vs extrait des graines. #P <0,05 vs extrait des feuilles.

II.2.2. Effet sur l'excrétion des électrolytes

Les effets de différents traitements sur l'excrétion urinaire des électrolytes sont résumés dans la figure (III.46). Le traitement oral subchronique au furosémide et aux extraits de graines et de feuilles de VAC produit une augmentation significative de l'excrétion du sodium, potassium et du chlore en comparaison avec le contrôle (P< 0,05). Cependant, la natriurèse et la kaliurèse produites par l'extrait des graines étaient significativement supérieures à celles produites par l'extrait de feuilles et du furosémide (P< 0,05). L'augmentation du rapport entre la concentration des ions sodium et potassium excrétés dans le groupe traité par l'extrait de graines indique que l'extrait aqueux des fruits augmente davantage l'excrétion des ions sodium que du potassium (figure III.47)

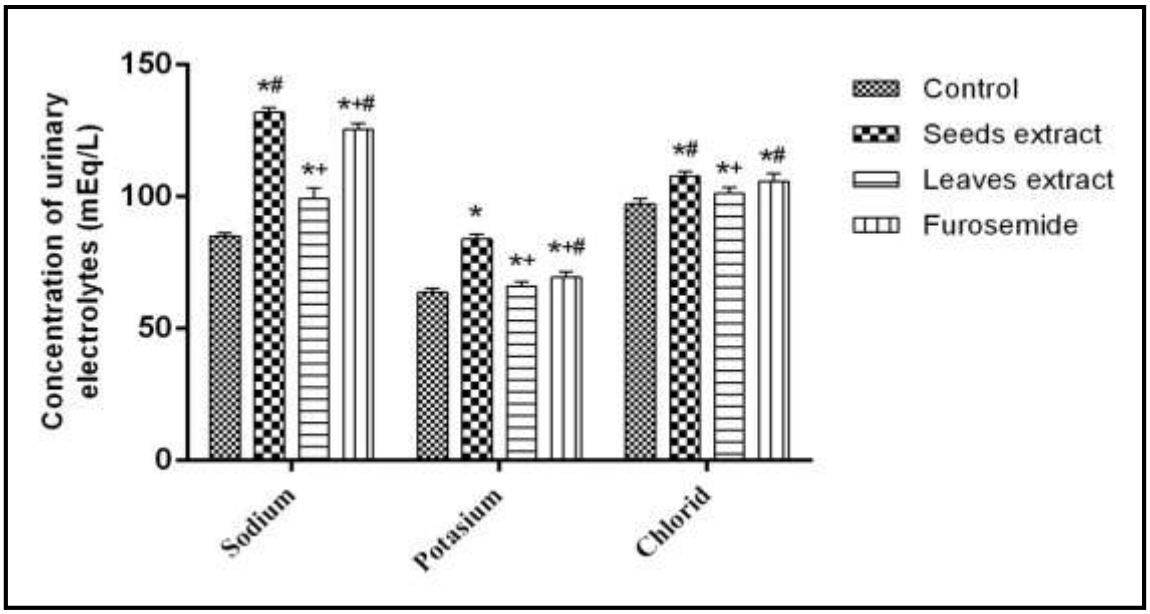


Figure III.46: Effet de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.*, et du furosémide sur le niveau d'électrolytes urinaires (sodium, potassium et chlorure) à la fin du traitement (jour 16).

Les données sont exprimées en tant que moyenne ± SEM. * P <0,05 par rapport au groupe contrôle. + P <0,05 vs extrait de graines. #P <0,05 vs extrait de feuilles.

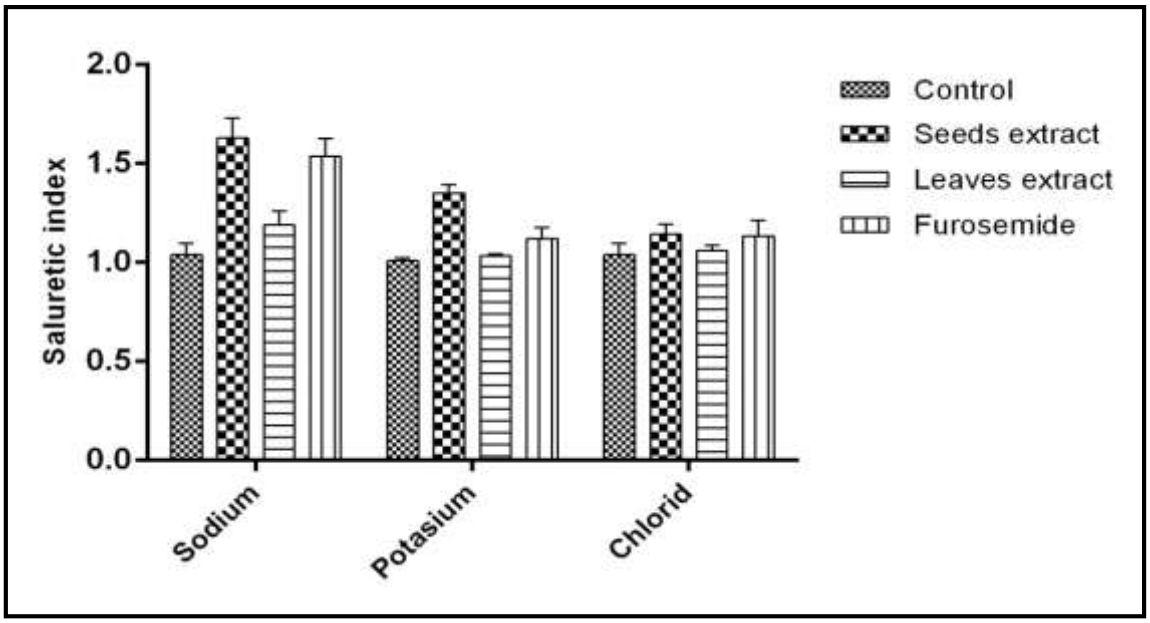


Figure III.47: Effet de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* et du furosémide sur l'indice salidiurétique observé au jour 16.

Les données sont exprimées en tant que moyenne ± SEM.* P <0,05 par rapport au groupe contrôle. + P <0,05 vs extrait de graines. #P <0,05 vs extrait de feuilles.

II.2.3. Effet sur les taux plasmatiques des électrolytes, de l'urée et de la créatinine

L'administration orale de l'extrait aqueux des feuilles et des graines de VAC pendant seize jours n'a pas entraîné de modification significative des concentrations plasmatiques de sodium,

de potassium, de chlorure, d'urée et de créatinine par rapport au groupe contrôle (P <0,05). Cependant, le furosémide a diminué significativement le potassium sérique et la créatinine par rapport au groupe contrôle et au groupe traité par l'extrait des feuilles (Tab. III.17).

Tableau III.17: Effet de l'administration quotidienne d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* et du furosémide sur les concentrations plasmatiques de sodium, de potassium, de chlorure, d'urée et de créatinine chez des rats normaux après seize jours de traitement**.**

Groupes	Concentration plasmatique des ions (mEq/l)				
	Sodium	Potassium	Chlorure	Urée sanguine (mg/dL)	Créatinine sanguine (mg/dL)
Contrôle	136,03 ± 1,5	7,36 ± 0,4	116,61 ± 1,4	0,31 ±0,01	0,87 ± 0,02
Extrait des graines VAC	135,80 ± 1,1	7,23 ± 0,1	115,93 ±01,2	0,31 ± 0,03	0,85 ± 0,01
Extrait des feuillesVAC	136,93 ± 1,3	7,56 ±0,3	115,46 ± 1,3	0,31 ± 0,01	0,88 ± 0,07^{+}
Furosémide	135,03 ± 1,2	7,13 ± 0,5*$^{\#}$	115,50 ± 1,5	0,31 ± 0,01	0,83 ± 0,05*$^{\#}$

Les données sont exprimées en tant que moyenne ± SEM.* P <0,05 par rapport au groupe contrôle. + P <0,05 vs extrait de graines. #P <0,05 vs extrait de feuilles.

II.2.4. Effet sur la filtration glomérulaire

Le taux de filtration glomérulaire (TFG) demeure stable pendant toute la durée de l'expérience chez le groupe contrôle (Tab. III.18). Par contre l'administration de l'extrait des feuilles de VAC a engendré une augmentation significative de la filtration glomérulaire, passant de 0,19± 0,02 ml/min à 0,30 ± 0,05 ml/min. Cette augmentation est très prononcée chez le groupe traité par l'extrait des graines VAC, étant donné que le taux de filtration glomérulaire passe de 0,34 ± 0,06 ml/min à 0,73 ± 0,09 ml/min. La valeur maximale de la clairance a été enregistrée chez le groupe traité par le furosémide qu'est de l'ordre de 0,91 ± 0,04 ml/min au jour 16 du traitement.

Tableau III.18: Effet de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* et du furosémide sur la clairance de la créatinine mesurée au jour 1 et au jour 16 après le traitement (mL / min).

Groupes	J1	J16
Contrôle	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,03
Extrait des graines VAC	0,34 ± 0,06*$^{\#}$	0,73 ± 0,09*$^{\#\hat{}}$
Extrait des feuilles VAC	0,19 ±0,02*$^{+}$	0,30 ± 0,05*$^{+\hat{}}$
Furosémide	0,63 ±0,04*$^{+\#}$	0,91 ± 0,04*$^{+\#\hat{}}$

Les données sont exprimées en tant que moyenne ± SEM.* P <0,05 par rapport au groupe contrôle. + P <0,05 vs extrait de graines. #P <0,05 vs extrait de feuilles.

II.2.5. Effet sur l'osmolarité et la clairance de l'eau libre

Tableau III.19: Effet de l'administration orale d'eau distillée, d'extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus L.* et du furosémide sur l'osmolalité plasmatique, l'osmolalité urinaire, la clairance osmolaire et la clairance d'eau libre au jour 16 du traitement.

Groupes	Posm (mOsm/L)	Uosm (mOsm/L)	Cosmolar (µL/min)	CH_2O (µL/min)	TCH_2O (µL/min)
Contrôle	288,70 ± 6,5	305,41 ± 5,6	5,90	-0,29	0,29
Extrait des graines VAC	289,53± 3,4	301,37 ± 3,2*	18,42*#	-0,70*#	0,70*#
Extrait des feuilles VAC	285,87 ±4,9	299,16 ± 0,9*	9,90*+	-0,43*+	0,43*+
Furosémide	290,85 ± 0,8	290,23 ± 4,4*	20,72*#	0,06*#	-0,06*#

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. * P <0,05 par rapport au groupe témoin. + P <0,05 vs extrait de graines. #P <0,05 vs extrait de feuilles.

Aucun effet significatif n'a été observé sur l'osmolarité plasmatique après 16 jours de traitement pour les quatre groupes. Cependant, les extraits de plantes et le furosémide ont entraîné une réduction significative de l'osmolalité de l'urine par rapport au groupe contrôle (P <0,05). La clairance de l'eau libre était significativement réduite par les deux extraits de plantes (P <0,05), mais augmentée par le furosémide. Le furosémide a diminué significativement l'osmolalité urinaire en comparaison au groupe contrôle (P <0,05). De plus, les extraits des graines et des feuilles de VAC et de furosémide ont entraîné une augmentation significative de la clairance osmolaire par rapport au groupe contrôle (P <0,05) ; l'effet de l'extrait de graines était supérieur à celui de l'extrait de feuilles et est inférieur à celui du furosémide (Tableau III.19).

III. Discussion

Dans la présente étude, l'effet diurétique des extraits des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* administrés par voie orale a été évalué chez des rats normaux, par un traitement aigu (24h) et un traitement subchronique (16 jours). Le furosémide, un médicament de référence a été utilisé pour valoriser l'effet diurétique de la plante étudiée.

La diurèse a deux composantes : l'augmentation du volume urinaire (excrétion de l'eau) et une perte nette des (électrolytes) dans l'urine. Les résultats de l'étude ont montré que les extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* exercent un effet diurétique significatif en augmentant l'excrétion de l'eau et des électrolytes (sodium, de potassium et de chlorure). En outre, l'extrait des graines était significativement plus puissant que l'extrait de feuilles (P <0,05).

Toutes les interventions, y compris le furosémide, ont diminué l'osmolarité de l'urine et n'ont aucun effet significatif sur l'osmolarité plasmatique.

Le médicament de référence, le furosémide, réputé être actif par voie orale, provoque une action rapide, environ 30 min après administration orale (Pillebout and Martinez, 1997). Cet agent diurétique augmente la production d'urine et l'excrétion urinaire de sodium en inhibant le symport Na+/K+/2Cl- dans la branche large ascendante de l'anse de Henlé (Breyer, 1990).

Le mécanisme d'action responsable des effets diurétiques des extraits de plantes n'est pas connu. Cependant, les extraits et le furosémide augmentent l'excrétion du sodium, du potassium et du chlorure dans les urines. Le mode d'action pourrait être similaire.

Les extraits de graines et de feuilles de *Vitex agnus castus* n'ont pas provoqué de modification du sodium plasmatique, du potassium ou du chlorure, alors que le furosémide a diminué significativement le potassium sérique et la créatinine par rapport au groupe témoin. Ces résultats indiquent que *Vitex agnus castus* pourrait agir comme un diurétique de l'anse, augmentant ainsi la natriurèse et la kaliurèse sans provoquer d'hypokaliémie. En outre, la filtration glomérulaire mesurée par la clairance de la créatinine était accrue dans les groupes traités avec des extraits des graines et des feuilles de VAC par rapport au groupe témoin. Ainsi, étudier leurs effets sur l'insuffisance rénale pourrait explorer leur potentiel pour augmenter la clairance de la créatinine et /ou améliorer l'insuffisance rénale.

L'augmentation du rapport entre la concentration des ions sodium et potassium excrétés dans le groupe traité par l'extrait de graines indique que cet extrait augmente davantage l'excrétion des ions sodium que le potassium, qui est une qualité essentielle d'un bon diurétique (Hymes and Warshaw, 1987).

Les deux extraits de VAC ont augmenté la clairance osmolaire et ont diminué l'excrétion d'eau libre ; cela pourrait être dû à une activité réduite ou à une synthèse minimisée de l'aldostérone, de l'angiotensine et de l'hormone antidiurétique (ADH) (Pantoja et al., 1996) . Il est également possible que ces extraits exercent leur effet diurétique en augmentant la production de prostaglandines. En fait, il est bien connu que les diurétiques de l'anse, et en particulier le furosémide, augmentent la synthèse rénale et l'excrétion urinaire des prostaglandines (Pillebout and Martinez, 1997). Dans le rein, les prostaglandines de type E

inhibent l'action de l'ADH au niveau des canaux du tube collecteur, ce qui augmente le flux urinaire et l'excrétion d'électrolytes (Baddouri and Quyou, 1991).

Le constituant actif responsable de l'activité diurétique des extraits de plantes n'a pas encore été déterminé. Les études réalisées sur les plantes médicinales ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre l'activité diurétique de ces plantes et leur teneur en K^+. Ainsi, la théorie selon laquelle l'activité diurétique des plantes médicinales est due seulement à la présence du potassium est très contestée (Jouad et al., 2001; Kanias et al., 1979).

Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes présentent des effets diurétiques (Martínez et al., 1998; Zeng et al., 2019). Certains isoflavonoïdes, notamment la génistéine et la daidzéine, auraient provoqué une augmentation de la natriurèse et de la kaliurèse (Mareck et al., 1991). De plus, il a été démontré que la crisine induisait une augmentation significative du débit urinaire, de la filtration glomérulaire et de l'excrétion de Na + et de K +. Récemment, il a été signalé que sept méthoxy-flavonoïdes provoquaient une diurèse et augmentaient l'excrétion de sodium en se liant au récepteur de l'adénosine A 1 (Yuliana et al., 2009). Dans ce sens, des analyses phytochimiques antérieures ont révélé que les graines et les feuilles de *Vitex agnus castus* contiennent des flavonoïdes tels que la casticine, la vitexine et l'orientine (Gökbulut et al., 2010; Hajdú et al., 2008; Hirobe et al., 1997; Hoberg et al., 2001). Par conséquent, l'activité diurétique de la plante pourrait être attribuée à la présence de flavonoïdes. Cependant, d'autres chercheurs ont rapporté que l'activité diurétique des plantes peut être induite par d'autres métabolites secondaires tels que les saponines (Lahlou et al., 2007) , qui sont connus par leur capacité à moduler la perméabilité membranaire et stimuler l'excrétion rénale du sodium .Ainsi, il est probable que les extrait aqueux de la plante étudiée manifestent un effet synergique dû à la présence de plusieurs substances actives. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les composants actifs responsables de la diurèse et explorer le mécanisme d'action.

IV. Conclusion

Les résultats de la présente étude ont montré que les extraits aqueux des graines (150mg/kg de poids corporel) et des feuilles (150mg/kg de poids corporel) de *Vitex agnus castus* exercent un effet diurétique puissant après l'administration de doses uniques et répétées chez le rat Wistar normal. Ils ont entraîné une augmentation significative du volume urinaire, de la clairance de la créatinine et de l'excrétion urinaire de sodium et de potassium dans les urines sans

hypokaliémie, par rapport au furosémide ($P < 0,05$). Ces résultats justifient pour la première fois l'utilisation de *Vitex agnus castus* comme diurétique dans la Médecine populaire.

Conclusion générale

Conclusion générale

De nos jours, Un grand intérêt est accordé à l'utilisation des extraits de plantes dans la recherche biomédicale. Ainsi, La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels à base de plantes devient aussi plus importante que la chimiothérapie. Par ailleurs, Les effets indésirables qui commencent à peser les médicaments chimiques incitent le consommateur à opter pour une thérapie plus douce et moins agressive pour l'organisme.

En effet, l'objectif de la présente thèse était la valorisation de deux plantes aromatiques et médicinales *Vitex agnus castus L* et *Cymbopogon nardus L.* Pour cela, nous nous somme intéressé à l'identification des constituants des huiles essentielles, et à l'évaluation de leurs activités antioxydante et antibactérienne. Un deuxième volet a été consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques des extraits volatils des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* et des feuilles de *Cymbopogon nardus*. Un troisième volet qui s'intéresse à l'exploration de l'effet anti-inflammatoire et diurétique in vivo.

Le screening phytochimique des huiles essentielles extraites des feuilles et des graines de *Vitex agnus castus L* par hydro distillation, a révélé que les composés majoritaires des huiles des graines sont 1,8-Cinéole, l'α-Thujène, le Phyllocladène, l'α-Pinène. Alors que Les composants majoritaires dans les huiles des feuilles sont le Caryophyllène, le 1,8-Cinéol, l'oxyde de Manoyle, et l'acétate d'Eugényle. Les huiles essentielles de la citronnelle ont été était analysée par GC-MS, Les principaux constituants de cette huile sont : le citronellal et le citronellol.

Les résultats de L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées montrent que ces huiles sont dotées de propriétés anti oxydantes modérées. Cependant, ils possèdent une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis des souches bactériennes résistantes responsables des infections nosocomiales contractées dans les services de réanimation néonatale.

L'analyse qualitative des extraits de *Vitex agnus castus* et de *Cymbopogon nardus* a révélé la présence de différents métabolites secondaires (alcaloïdes, saponines, terpènes, flavonoïdes et polyphénols) avec des degrés d'abondance qui différent selon la plante ou l'organe étudiés, et selon le type de solvant utilisé.

L'analyse quantitative des différents extraits (eau, éthanol, méthanol et acétate d'éthyle de *Vitex agnus castus* et *Cymbopogon nardus* montrent la richesse de ces deux plantes en polyphénols, flavonoides, flavone et flavonols. De plus, l'évaluation de l'activité antioxydante de ces mêmes extraits par différents tests (DPPH, FRAP, CAT) montre que les extraits non volatils des deux plantes étudiées sont dotés d'un pouvoir antioxydant important.

Les résultats de L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique des extraits aqueux de *Vitex agnus castus* et de *Cymbopogon nardus* préparés par macération, ont montré une réduction significative de l'œdème induit chez les rats par la carragénine, et une atténuation des sensations douloureuses provoquées par l'injection intrapéritoniale de l'acide acétique chez les souris. L'effet anti-inflammatoire des extraits est dose dépendant, les extraits des feuilles de *Vitex agnus castus* sont plus puissante autant qu'anti-inflammatoire et analgésique par rapport aux autres extraits.

L'étude pharmacologique se rapportant à l'effet diurétique des extraits aqueux des graines et des feuilles de *Vitex agnus castus* à raison de 150mg/kg de poids corporel a montré que les deux extraits exercent un effet diurétique puissant après l'administration de doses uniques et répétées chez le rat Wistar normal. Ils ont entraîné une augmentation significative du volume urinaire, de la clairance de la créatinine et de l'excrétion urinaire de sodium et de potassium sans hypokaliémie, par rapport au furosémide ($P < 0,05$). L'extrait des graines été plus puissant que l'extrait des feuilles autant que diurétique.

En effet, il ressort du présent travail que les deux plantes étudiées possèdent des propriétés biologiques et des activités pharmacologiques intéressantes. Néanmoins, des travaux de recherche doivent être entamés en phytochimie dans le but de déterminer les molécules bioactives des deux plantes étudiées. D'autres études pharmacologiques revêtent une importance capitale quant à la clarification des mécanismes d'action de ces molécules.

.

Références Bibliographiques

Abdillah S, Tambunan RM, Farida Y, Sandhiutami NMD, Dewi RM (2015) Phytochemical screening and antimalarial activity of some plants traditionally used in Indonesia. Asian Pacific J Trop Dis 5:454–457.

Abena AA, Gbenou JD, Yayi E, Moudachirou M, Ongoka RP, Ouamba JM, Silou T (2007) Comparative chemical and analgesic properties of essential oils of Cymbopogon nardus (L) Rendle of Benin and Congo. African J Tradit Complement Altern Med 4:267–272.

Abi-Ayad M, Abi-Ayad FZ, Lazzouni HA, Rebiahi SA (2011) Antibacterial activity of Pinus halepensis essential oil from Algeria (Tlemcen). J Nat Prod Plant Resour 1:33–36.

Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Biochemical Systematics and Ecology.

AFNOR (2000) Huiles essentielles. Tome 2, Monographies relatives aux huiles essentielles.

Aissaoui H (2010) Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de type flavonique d'une espèce de la famille des Verbenacées. Universite mentouri constantine.

Aitken C, Jeffries DJ (2001) Nosocomial spread of viral disease. Clin Microbiol Rev 14:528–546.

Ajdžanović V, Spasojević I, Pantelić J, Sošić-Jurjević B, Filipović B, Milošević V, Severs W (2012) Vitex agnus-castus L. essential oil increases human erythrocyte membrane fluidity. J Med Biochem 31:222–227.

Akhila A (2009) Essential oil-bearing grasses: the genus Cymbopogon. CRC press.

Ansari MA, Razdan RK (1995) Relative efficacy of various oils in repelling mosquitoes. Indian J Malariol 32:104–111.

Antolić A, Maleš Ž (1997) Quantitative analysis of the polyphenols and tannins of Vitex agnus-castus L. Acta Pharm 47:207–211.

Arokiyaraj S, Perinbam K, Agastian P, Kumar R (2009) Phytochemical analysis and antibacterial activity of Vitex agnus-castus. Int J Green Pharm 3:162–164.

Asaolu MF, Oyeyemi OA, Olanlokun JO (2009) Chemical compositions, phytochemical constituents and in vitro biological activity of various extracts of Cymbopogon citratus. Pakistan J Nutr 8:1920–1922.

Asdadi A, Hamdouch A, Oukacha A, Moutaj R, Gharby S, Harhar H, El Hadek M, Chebli B, Idrissi Hassani LM (2015) Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild Vitex agnus-castus L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of Candida responsible for nosocomial infections.

J Mycol Med 25:e118–e127.

Aujard Y, Rajguru M, Bingen E (2000) Infections nosocomiales en pédiatrie : problèmes et perspectives. Pathol Biol 48:909–920.

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J Food Eng 117:426–436.

Babu D, Gurumurthy P, Borra SK, Cherian KM (2013) Antioxidant and free radical scavenging activity of triphala determined by using different in vitro models. J Med Plants Res 7:2898–2905.

Baddouri K, Quyou A (1991) Effect of vasopressin and indomethacin on provoked diuresis in pregnant and non-pregnant Meriones crassus. Reprod Nutr Dev 31:269–74.

Bae GS, Park KC, Choi SB, Jo IJ, Choi MO, Hong SH, Song K, Song HJ, Park SJ (2012) Protective effects of alpha-pinene in mice with cerulein-induced acute pancreatitis. Life Sci 91:866–871.

Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri. Food Microbiol 21:33–42.

Bajpai VK, Baek KH, Kang SC (2012) Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. Food Res Int 45:722–734.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils - A review. Food Chem Toxicol 46:446–475.

Baser KHC, Gerhard B (2015) Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications, Second Edition In: Handbook of Essential Oils , Boca Raton.

Baudoux D (2008) L'aromathérapie : se soigner par les huiles essentielles.

Baudoux D, Blanchard J-M, Malotaux A-F (2006) Les cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'école française. Vol. 4, Soins palliatifs. Édi ion Inspir.

Beaux D (1991) Etude pharmacologique des propriétés diurétiques d ' extraits d ' orthosiphon , de piloselle , de sureau noir , de fenouil doux et de busserole chez le rat D. Université de Lorraine.

Beddou F (2015) Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes Rumex vesicarius L. et Anvillea radiata Coss. & Dur. Abou Bekr Belkaid.

Bedi G, Tonzibo ZF, Oussou KR, Choppard C, Mahy JP, N'Guessan TY (2010) Effect of essential oil of chromoleana odorata (asteraceae) from ivory coast, on cyclooxygenase function of prostagladin-H synthase activity. African J Pharm Pharmacol 4:535–538.

Bellakhdar J (2006) Plantes médicinales au Maghreb et soins de bases – Précis de phytothérapie moderne, Editions L. ed.

Bellakhdar J (1997a) La pharmacopée marocaine traditionelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Éditions L. ed. Ibis Press, Paris.

Bellakhdar J (1997b) Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc : la situation actuelle, les produits, les sources du savoir (enquête ethnopharmacologique de terrain réalisée de 1969 à 1992). Université Paul Verlaine-Metz.

Belletti N, Ndagijimana M, Sisto C, Guerzoni ME, Lanciotti R, Gardini F (2004) Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on Saccharomyces cerevisiae. J Agric Chem Soc Japan 52:6932–6938.

Berrani A, Lrhorfi LA, Larbi OM, Zouarhi M, Lella OA, Boufellous M, Bengueddour R (2017) Ethnobotanical study of two medicinal plants: Vitex agnus castus and Anabasis aretioïdes. J Adv Biol 9:2347–6893.

Berrghioua A (2016) Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud algérien. ABOU BAKR BELKAID -TLEMCEN.

Besombes C (2009) Contribution à l ' étude des phénomènes d ' extraction hydro-thermo-mécanique d ' herbes aromatiques : applications généralisées. UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE.

Blain H, Jouzeau JY, Netter P, Jeandel C (2000) Les anti-inflammatoires non steroidiens inhibiteurs selectifs de la cyclooxygenase 2. Interet et perspectives. Rev Med Interne 21:978–988.

Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J (2000) Herbal Medicine. Expanded Commission E monographs. Integrative Medicine Communications.

Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol 13:135–160.

Borg J, Reeber A, Christian Andrès (2004) Biochimie métabolique. Ellipses.

Bourin M, Lièvre M, Allain H (1993) Cours de pharmacologie. Ellipses.

Boyce JM (1997) Vancomycin-resistant enterococcus: Detection, epidemiology, and control measures. Infect Dis Clin North Am 11:367–384.

Breyer J (1990) Molecular Mechanisms Of Diuretic Agents. Annu Rev Med 41:265–275.

Brugnera DF, Oliviera MMM de, Piccoli RH (2011) Essential Oils of Cymbopogon Sp . in the Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. Aliment e Nutr Araraquara 22:339–343.

Bruneton J (2009) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Éd. Tec & doc.

Bruneton J (1999a) Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, 3e édition. ed.

Lavoisier, Paris.

Bruneton J (1999b) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Éd. Tec & doc.

Bruneton J (1993) Pharmacognosie, phytochimie, Plantes medicinales, 2e edition. ed. Lavoisier, Paris.

Buchbauer G (2000) The Detailed Analysis of Essential Oils Leads to the Understanding of their Properties a. Perfumer&Flavorist 25:64–67.

Burt S (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. Int J Food Microbiol 94:223–253.

C. Marinier F, Lobstein A (2013) Composition chimique des huiles essentielles. Actual Pharm 52:22–25.

Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci 74:2157–2184.

Caillet S, Lacroix M (2007) Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire.

Canaud B, Sénécal L, Terrier N, Morena M, Cristol J (2003) L'accès vasculaire, une cause d'inflammation sous-estimée chez l'hémodialysé. Nephrologie 24:353–358.

Capron F (1998) Forme anatomo-clinique de l'inflammation, in trouble de la mortalité et de la sensibilité digestive. Rev du Prat 20:2273–2276.

Cardey B (2009) Étude théorique des mécanismes d'oxydation de thiols en milieu d'intérêt biologique. Université de Franche-Comté.

Carillon A (1985) POUR UN BON USAGE DES PLANTES. Phytothérapie, aromathérapie... / Comprendre et agir: des médecines familiales efficaces au service de votre santé.

Cavaillon J (2005) Médiateurs de l ' inflammation In: Sepsis Sévère et Choc Septique , pp 23–49.

Chaintreau A, Joulain D, Marin C, Schmidt CO, Vey M (2003) GC-MS Quantitation of Fragrance Compounds Suspected to Cause Skin Reactions. 1. J Agric Food Chem 51:6398–6403.

Chapagain BP, Wiesman Z, Tsror (Lahkim) L (2007) In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. Ind Crops Prod 26:109–115.

Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, Schmeda-Hirschmann G (2005) Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (Cymbopogon citratus (DC.) Stapf.). J Agric Food Chem 53:2511–2517.

Chemsi M, Chahid I, Lehlimi M, Aalloula O, Zerouali K, Habzi A, Benomar S (2013) Incidence

des infections bacteriennes nosocomiales. Hôpital d'enfants Abderrahim Harouchi, CHU Ibn Rochd, Casablanca, Maroc. J Pediatr Pueric 26:11–18.

Chen SN, Friesen JB, Webster D, Nikolic D, Van Breemen RB, Wang ZJ, Fong HHS, Farnsworth NR, Pauli GF (2011) Phytoconstituents from Vitex agnus-castus fruits. Fitoterapia 82:528–533.

Chen W-J, Hsiao L-C, Chen KK-Y (2008) Metal desorption from copper(II)/nickel(II)-spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponin biosurfactant. Process Biochem 43:488–498.

Chew KK, Khoo MZ, Ng SY, Thoo YY, Aida WMW, Ho CW (2011) Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Orthosiphon stamineus extracts. Int Food Res J 18:1427–1435.

Chigayo K, Mojapelo PEL, Mnyakeni-Moleele S, Misihairabgwi JM (2016) Phytochemical and antioxidant properties of different solvent extracts of Kirkia wilmsii tubers. Asian Pac J Trop Biomed 6:1037–1043.

Choudhary MI, Azizuddin, Jalil S, Nawaz SA, Mohammed KK, Tareen RB, Atta-ur-Rahman (2009) Antiinflammatory and Lipoxygenase Inhibitory Compounds from Vitex agnus-castus. Phyther Res 23:1336–1339.

Corvol P, Claire M, Oblin ME, Geering K, Rossier B (1981) Mechanism of the antimineralocorticoid effects of spironolactones. Kidney Int 20:1–6.

Cossuta D, Simándi B, Vági E, Hohmann J, Prechl A, Lemberkovics É, Kéry Á, Keve T (2008) Supercritical fluid extraction of Vitex agnus castus fruit. J Supercrit Fluids 47:188–194.

Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 12:564–582.

Crozier A, Clifford MN (Michael N., Ashihara H (2006) Plant secondary metabolites : occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Pub.

Cunha BA (1998) Antibiotic resistance. Control strategies. Crit Care Clin 14:309–30927.

Da Silveira SM, Luciano FB, Fronza N, Cunha A, Scheuermann GN, Vieira CRW (2014) Chemical composition and antibacterial activity of Laurus nobilis essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C. LWT - Food Sci Technol 59:86–93.

de Sousa AC, Gattass CR, Alviano DS, Alviano CS, Blank AF, Alves PB (2004) Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities . J Pharm Pharmacol 56:677–681.

Dennesen PJW, Bonten MJM, Weinstein RA (1998) Multiresistant bacteria as a hospital

epidemic problem. Ann Med 30:176–185.

Dervishi-shengjergji D, Papajani V, Hamiti X, Nuro A, Kika B (2014) Antibacterial Activity and Chemical Composition of Vitex agnus castus Fruits Essential Oils from Mbishkodra Mbishkodra, Albania. J Int Environ Appl Sci 14:521–524.

Dervishi-Shengjergji D, Papajani V, Hamiti X, Nuro A, Kika B (2014) Antibacterial Activity and Chemical Composition of Vitex agnus castus Fruits Essential Oils from Mbishkodra Mbishkodra, Albania. J Int Environ Appl Sci 9:424–521.

Desmares C, Laurent A, Delerme C (2008) Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles : contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Saint-Denis, AFSSAPS.

Devulder B, Hatron PY HE (2002) Physiologie de l'Inflammation, Edition Ce. ed.

Dickinson DA, Forman HJ (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism Dale. Biochem Pharmacol 64:1019–1026.

Diebold J, Molina T, Bigorgne C, Audouin J, A. Le Tourneau (1995) Les expressions morphologiques de la réaction inflammatoire. Rev Française des Lab 1995:21–26.

Do Amaral JF, Silva MIG, Neto MRDA, Neto PFT, Moura BA, De Melo CTV, De Araújo FLO, De Sousa DP, De Vasconcelos PF, De Vasconcelos SMM, De Sousa FCF (2007) Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. Biol Pharm Bull 30:1217–1220.

Dohoo I, Martin W, Stryhn. H (2003) Veterinary Epidemiologic Research. AVC Inc.: Charlottetown, Canada.

Donald L, Warkentin MD (2011) Diurétiques.

Dorman HJD, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 88:308–316.

Ducel G, Fabry J, Nicolle L (2002) Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide., 2nd editio. ed, WHO. World Health Organization.

Duraffourd P, Cilapraz J (1978) L'aromatogramme: nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. Plant Med Phytother 12:43–52.

El-Haci IA, Atik-Bekkara F, Didi A, Gherib M, Didi MA (2012) Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. Phytotherapie 10:280–285.

El-Hela A, Abdullah A (2010) Chemical composition and biological activities of essential oil of Salvia acetabulosa L. Grown in Egypt. J Appl Sci Res 6:690–695.

El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R (2013) Virulence profiles and antibiotic

susceptibility patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens. Pathol Biol 61:209–216.

El Haib A (2011) Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Université de Toulouse.

El hammoumi J (2011) Les infections nosocomiales en reanimation neonatale etude retrospective 2009 (A propos de 110 cas). Université sidi mohamed ben abdellah.

El hammoumi J (2011) Les infections nosocomiales en reanimation neonatale etude retrospective 2009 (A propos de 110 cas) – Centre Hospitalier Universitaire Hassan II. université sidi mohamed ben abdellah.

El Menyiy N, Al-Waili N, El-Haskoury R, Bakour M, Zizi S, Al-Waili T, Lyoussi B (2018) Potential effect of Silybum marianum L. and Cistus ladaniferus L. extracts on urine volume, creatinine clearance and renal function. Asian Pac J Trop Med 11:393–398.

Erol NT, Sarı F, Velioglu YS (2010) Polyphenols , Alkaloids and Antioxidant Activity of Different Grades Turkish Black Tea. Gıda 35:161–168.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med 13:341–390.

Fabiny DL, Ertingshausen G (1971) Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifiChem. Clin Chem 17:696–700.

Favier A (2003) Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Actual Chim 108–115.

Fox-Moon MS, Shirtliff ME (2014) Urinary Tract Infections Caused by Proteus mirabilis, Molecular Medical Microbiology: Second Edition. Elsevier Ltd.

Franchomme P, Pénoël D (2007) L'Aromathèrapie Exactement Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle In: Roger Jollois , Roger Jollois.

Fritze D, Pukall R (2011) Chapter 4. Culture Media for Bacillus spp. and Related Genera Relevant to Foods In: Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology , pp 90–114. Cambridge, Royal Society of Chemistry.

Furukawa S (1918) Citronella oils. J CemIndJapan 21:515–523.

Ganther HE (1999) Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase. Carcinogenesis 20:1657–1666.

Gao M, Liu CZ (2005) Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of Saussurea medusa Maxim. World J Microbiol Biotechnol 21:1461–1463.

Garneau F-X, Collin GJ, Zaya P (2005) Huile essentielle : de la plante à la commercialisation :

manuel pratique. Corporation Laseve, Université du Québec à Chicoutimi.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM (1988) CDC definitions for nosocomial infections, 1988. AJIC Am J Infect Control 16:128–140.

Gelmini F, Belotti L, Vecchi S, Testa C, Beretta G (2016) Air dispersed essential oils combined with standard sanitization procedures for environmental microbiota control in nosocomial hospitalization rooms. Complement Ther Med 25:113–119.

Gershenzon J, Dudareva N (2007) The function of terpene natural products in the natural world. Nat Chem Biol 3:408–414.

Ghannadi A, Bagherinejad MR, Abedi D, Jalali M, Absalan B, Sadeghi N (2012) Antibacterial activity and composition of essential oils from Pelargonium graveolens L'Her and Vitex agnus-castus L. Iran J Microbiol 4:171–176.

Goetz P, Ghedira K (2012) Thymus vulgaris L. (Lamiaceae): Thym In: Phytothérapie Anti-Infectieuse , pp 357–365.

Gökbulut A, Özhan O, Karacaoglu M, Sarer E (2010) Radical scavenging activity and vitexin content of vitex agnus-castus leaves and fruits. Fabad J Pharm Sci 35:85–91.

Goudable J, Favier A (1997) Radicaux libres oxygenes et antioxydants. Nutr Clin Metab 11:115–120.

Grice HC (1988) Enhanced Tumor Development by Butylated Hydroxyanisole (BHA) from the Perspective of Effects on Forestomach and Esophageal Squamous Epithelium. Food Chem Toxicol 26:717–723.

Grice HC (1986) Safety evaluation of butylated hydroxyltoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. Food Chem Toxicol 24:1127–1130.

Gupta S, Neyses L (2005) Diuretic usage in heart failure: A continuing conundrum in 2005. Eur Heart J 26:644–649.

Habbab A, Sekkoum K, Belboukhari N, Cheriti A, Aboul-Enein HY (2016) Essential Oil Chemical Composition of Vitex agnus-castus L. from Southern-West Algeria and Its Antimicrobial Activity. Curr Bioact Compd 12:51–60.

Habbaba A, Sekkouma K, Belboukharia N, Cheritib A, Aboul-Eneinc HY (2016) Essential Oil Chemical Composition of Vitex agnus-castus L. from Southern-West Algeria and Its Antimicrobial Activity. Curr Bioact Compd 12:51–60.

Haïdara M (2008) Etude de la phytochimie et de l'activité antihypertensive de trois (3) plantes et d'une recette utilisées dans le traitement traditionnel de l'hypertension artérielle au Mali. UNIVERSITE DE BAMAKO …….

Hajdú Z, Hohmann J, Forgo P, Martinek T, Dervarics M, Zupkó I, Falkay G, Cossuta D, Máthé

I (2008) Diterpenoids and Flavonoids from the Fruits of Vitex agnus-castus and Antioxidant Activity of the Fruit Extracts and Their Constituents. Phyther Res 21:391–394.

Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 344:721–724.

Hamdouch A, Asdadi A, Chebli B, Idrissi Hassani LM (2018) Phytochemical screening , quantitative analysis and antioxidant activity of Vitex agnus castus L . (Lamiaceae) from South-East of Morocco. Arab J Med Aromat Plants 4:9–18.

Hamid AA, Usman LA, Adebayo SA, Zubair MF, Elaigwu SE (2010) Chemical constituents of leaf essential oil of north-central nigerian grown Vitex Agnus-castus. Adv Environ Biol 4:250–253.

Hammer KA, Carson CF, Riley T V. (2003) Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. J Appl Microbiol 95:853–860.

Hammer KA, Carson CF, Riley T V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 86:985–990.

Harborne JB (1973) Phytochemical methods, London. Chapman and Hall.

Hassiotis CN (2010) Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from Lavandula stoechas in Mediterranean region. Biochem Syst Ecol 38:493–501.

Hayes AJ, Markovic B (2002) Toxicity of Australian essential oil Backhousia citriodora (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. Food Chem Toxicol 40:535–543.

Henzen C (2003) Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. Forum Médical Suisse – Swiss Med Forum 442–446.

Hernández-Pérez M, Rabanal RM (2002) Evaluation of the antinflammatory and analgesic activity of Sideritis canariensis var. pannosa in mice. J Ethnopharmacol 81:43–47.

Hirobe C, Qiao ZS, Takeya K, Itokawa H (1997) Cytotoxic flavonoids from Vitex agnus-castus. Phytochemistry 46:521–524.

Hoberg E, Meier B, Sticher O (2001) Quantitative high performance liquid chromatographic analysis of casticin in the fruits of Vitex agnus-castus. Pharm Biol 39:57–61.

Hoberg E, Meier B, Sticher O (2000) An analytical high performance liquid chromatography method for the determination of agnuside and p-hydroxybenzoic acid contents in Agni-casti fructus. Phytochem Anal 11:327–329.

Hoberg E, Orjala J, Meier B, Sticher O (1999) Diterpenoids from the fruits of Vitex agnus-

castus. Phytochemistry 52:1555–1558.

Holevinsky KO, Nelson DJ (1995) Simultaneous detection of free radical release and membrane current during phagocytosis. J Biol Chem 270:8328–8336.

Hossain MA, Ismail Z, Rahman A, Kang SC (2008) Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of Orthosiphon stamineus Benth. Ind Crops Prod 27:328–334.

Hulbert AJ (2005) On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. J Theor Biol 234:277–288.

Hussein M abd almajeed (2007) Effect of Vitex agnus-castus extract on some physiological parameters of mice (Mus Musculus L.). Med J Basrah Univ 25:57–59.

Hymes LC, Warshaw BL (1987) Thiazide diuretics for the treatment of children with idiopathic hypercalciuria and hematuria. J Urol 138:1217–1219.

Ibáñez E, López-Sebastián S, Ramos E, Tabera J, Reglero G (1998) Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. Food Chem 63:281–286.

J. F. Payen (2002) Bases physiopathologiques et évaluation de la douleur (65).

Jaffe M (1980) Uber den Niederschlag, welchen pikrin saure in normalen harn erzeugt und Uber eine Reaktion eskreugtinines Hoppe seylers In: Physio. Chem , pp 391–400.

Janeway CA, Murphy K (2003) Immunobiologie.

Jha P, Flather M, Lonn E, Farkouh M, Yusuf S (1995) The antioxidant vitamins and cardiovascular disease: A critical review of epidemiologic and clinical trial data. Ann Intern Med 123:860–872.

Johanna R (2013) Exploration des difficultés dans la prise de traitements au long cours chez le patient transplanté rénal : comment le rendre acteur de sa santé. Université angers.

Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Eddouks M (2001) Chronic diuretic effect of the water extract of Spergularia purpurea in normal rats. J Ethnopharmacol 75:219–223.

Jouhanneau DG (1991) La médecine des plantes aromatiques phyto-aromathérapie et huiles essentielles de l'océan Indien, Azalées Ed. ed. Orphie.

K. Alain (1992) Manuel des corps gras.

K. Slinkard, V. L. Singleton (1977) Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. Am J Enol Vitic 28:49–55.

Kalemba D, Kunicka A (2003) Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Curr Med Chem 10:813–829.

Kaloustian J, H. Minaglou F (2013) La connaissance des huiles essentielles : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer Science & Business Media.

Kanias GD, Loukis A, Philianos SM (1979) Trace element pharmacognostical study on diuretic drugs by neutron activation analysis. J Radioanal Chem 54:103–112.

Karande P, Mitragotri S (2009) Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. Biochim Biophys Acta - Biomembr 1788:2362–2373.

Katiraee F, Mahmoudi R, Tahapour K, Hamidian G, Emami SJ (2015) Biological Properties of Vitex agnus-castus Essential Oil (Phytochemical Component, Antioxidant and Antifungal Activity). Biotechnol Heal Sci 2:26797.

Katz AI, Doucet A, Morel F (1979) Na-K-ATPase activity along the rabbit, rat, and mouse nephron. Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol 6.

Kayano SI, Kikuzaki H, Fukutsuka N, Mitani T, Nakatani N (2002) Antioxidant activity of prune (Prunus domestica L.) constituents and a new synergist. J Agric Food Chem 50:3708–3712.

Khadri A, Serralheiro MLM, Nogueira JMF, Neffati M, Smiti S, Araújo MEM (2008) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from Cymbopogon schoenanthus L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and 13C NMR. Food Chem 109:630–637.

Khalilzadeh E, Vafaei Saiah G, Hasannejad H, Ghaderi A, Ghaderi S, Hamidian G, Mahmoudi R, Eshgi D, Zangisheh M (2015) Antinociceptive effects, acute toxicity and chemical composition of Vitex agnus-castus essential oil. Avicenna J phytomedicine 5:218–21830.

Khan HA, Baig FK, Mehboob R (2017) Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. Asian Pac J Trop Biomed 7:478–482.

Kirtikar KR, Basu B (1994) Indian Medicinal Plants: Bishen Singh Mahendrapal Singh. Dehradun India 3:2186–2188.

Koffi K, Komla S, Catherine G, Christine R, Jean-Pierre C, Laurence N (2009a) In vitro cytotoxic activity of Cymbopogon citratus L. and Cymbopogon nardus L. essential oils from Togo. Bangladesh J Pharmacol 4:29–34.

Koffi N, Beugré K, Guédé N Z, Dossahoua T, Laurent A-A (2009b) Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville , Côte-d ' Ivoire). Sci Nat 6:1–15.

Konvvar BK, Gohain AK (1999) Nutritive Value of Spent Citronella Grass (Cymbopogon nardus R.) In Cattle, Indian Journal of Animal Nutrition. Animal Nutrition Society of India.

Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Vladimr-knezevic S (2004) Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. Acta Pharm 54:65–72.

Kro HJ, Das S, Tayung K (2017) Antifungal activity of Cymbopogon nardus essential oil against some fungi contaminating cereals and pulses. Res J Life Sci Bioinformatics, Pharm Chem Sci 3:26–36.

Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C (2008) Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. Comptes Rendus - Biol 331:865–873.

Kumar A, Shukla R, Singh P, Prasad CS, Dubey NK (2008) Assessment of Thymus vulgaris L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. Innov Food Sci Emerg Technol 9:575–580.

Kunle O, Okogun J, Egamana E, Emojevwe E, Shok M (2003) Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from Lippia multiflora leaf extract. Phytomedicine 10:59–61.

Kuruüzüm-Uz A, Ströch K, Demirezer LÖ, Zeeck A (2003) Glucosides from Vitex agnus-castus. Phytochemistry 63:959–964.

Lachassinne E, Letamendia-Richard E, Gaudelus J (2004) Epidemiology of nosocomial infections in neonates. Arch Pediatr 11:229–233.

LaCroix AZ, Wienpahl J, White LR, M.P.H. RBW, Scherr PA, George LK, Cornoni-Huntley J, Ostfeld AM (1990) Thiazide Diuretic Agents and the Incidence of Hip Fracture. New English J Med 322:286–290.

Lahlou M (2004) Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. Phyther Res 18:435–448.

Lahlou S, Tahraoui A, Israili Z, Lyoussi B (2007) Diuretic activity of the aqueous extracts of Carum carvi and Tanacetum vulgare in normal rats. J Ethnopharmacol 110:458–463.

Lamarti A, Badoc A, Carde J (1993) Etude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (Foeniculum vulgare Mill.); caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. Bull Soc Pharm Bord 132:73–89.

Laroche F (2014) Douleur chronique. Thérapies comportementales et cognitives. Ann Med Psychol (Paris) 172:132–135.

Latoui M, Aliakbarian B, Casazza AA, Seffen M, Converti A, Perego P (2012) Extraction of phenolic compounds from Vitex agnus-castus L. Food Bioprod Process 90:748–754.

Lawrence BM (1992) Chemical components of Labiatae oils and their exploitation In: Advances in Labiatae Science , pp 339–436.

Lemsanni M (2016) Les infections nosocomiales en réanimation pédiatrique. UNIVERSITE CADI AYYAD.

Lesjak MM, Beara IN, Orčić DZ, Petar KN, Simin ND, Emilija SD, Mimica-Dukić NM (2014)

Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of Juniperus macrocarpa Sibth. et Sm. J Funct Foods 7:257–268.

Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease2,3 2Guest Editor: Earl Stadtman 3This article is part of a series of reviews on "Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease." The full list of papers may be found on the homepag. Free Radic Biol Med 32:790–796.

Libby P (2007) Inflammatory Mechanisms: the Molecular Basis of Inflammation and Disease. Nutr Rev 65:140–146.

Lim SN, P.C.K. Cheung, Ooi VEC, Ang PO (2002) Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from a Brown Seaweed, Sargassum siliquastrum. J Agric Food Chem 50:3862–3866.

Liou CJ, Len W Bin, Wu SJ, Lin CF, Wu XL, Huang WC (2014) Casticin inhibits COX-2 and iNOS expression via suppression of NF-κB and MAPK signaling in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. J Ethnopharmacol 158:310–316.

Lobstein A, Frey ML, Anton R (1983) Altération et conservation des huiles essentielles. Ann Pharm Françaises 41:69–75.

Lote C (2000) Principles of Renal Physiology, 4e edition. ed.

Lucchesi M (2006) Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondesConception et Application à l'extraction des huiles essentielles. UNIVERSITE DE LA REUNION.

Lüllmann H, Mohr K, Hein L, Duval D, Wirth J (2010) Atlas de poche de pharmacologie. [Lavoisier] Médecine Sciences publications.

M. C. Cloupet, J. Rongère, M. P. Tavolacci (2014) Médecine légale. Médecine du travail. Pharmacologie.

M. Maldonado M, Cordova HR (1990) Cellular and molecular aspects of the renal effects of diuretic agents. Kidney Int 38:632–641.

M. Shirner (2004) Huiles essentielles Description et utilisation de plus de 200 huiles essentielles et huiles végétales. Guy Trédaniel Editeur. Paris.

Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Eddouks M (2005) Acute diuretic effect of aqueous extract of Retama raetam in normal rats. J Ethnopharmacol 99:31–35.

Mahalwal VS, Mohd A (2003) Volatile constituents of Cymbopogon nardus (Linn.) Rendle. Flavour Fragr J 18:73–76.

Mainardi JL, Gutmann L (1998) Mécanismes de résistance des bactéries responsables d'infections nosocomiales. Pathol Biol 46:253–260.

Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I (2007) Mécanisme de l'immunité innée. In: Immunologie,

7eme editi. ed.

Mansour S (2015) Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : Artemisia absinthium L , Artemisia herba alba Asso et Hypericum scarboides - Etude in vivo -. Oran Mohamed BOUDIAF.

Maoulainine FMR, Elidrissi NS, Chkil G, Abba F, Soraa N, Chabaa L, Amine M, Aboussad A (2014) Épid miologie De L'Infection Nosocomiale Bactérienne Dans Un Service De Réanimation Néonatale Marocain. Arch Pediatr 21:938–943.

Mareck U, Herrmann K, Galensa R, Wray V (1991) The 6-C-chinovoside and 6-C-fucoside of luteolin from Passiflora edulis. Phytochemistry 30:3486–3487.

Mariani-Kurkdjian P, Bingen E (2012) Physiopathologie et virulence des Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines. Reanimation 21:268–279.

Martínez RM, Giménez I, Lou JM, Mayoral JA, Alda JO (1998) Soy isoflavonoids exhibit in vitro biological activities of loop diuretics. Am J Clin Nutr 68:1354–1357.

Masson YT (2009) Analyse d'ouvrage. Ann Pharm Françaises 67:374.

Mayer F (2012) Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite. UNIVERSITE DE LORRAINE.

Mayer JG, Czygan F-C (1999) Vitex agnus-castus L., der oder das Keuschlamm. ZEITSCHRIFT FUR Phyther 20:177–182.

Mbarek LA, Mouse HA, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Zyad A (2007) Anti-tumor properties of blackseed (Nigella sativa L.) extracts. Brazilian J Med Biol Res 40:839–847.

Meena AK, Singh U, Yadav AK, Singh B, M M Rao (2011) Pharmacological and Phytochemical Evidences for the Extracts from Plants of the Genus Vitex – A Review. Int J Pharm Clin Res 2:1–9.

Meier B, Allemann C, Kreuter MH (1994) Vitex agnus-castus and the way of the drug to the clinical approved herbal medicinal product . eller AG Herb Med Prod 6–10.

Miguel M da G, Doughmi O, Aazza S, Antunes D, Lyoussi B (2014) Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. Fresenius Environ Bull 23:313–322.

Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem 85:231–237.

Mireya UA, Martí PO, Xavier KV, Cristina LO, Miguel MM, Magda CM (2007) Nosocomial infections in paediatric and neonatal intensive care units. J Infect 54:212–220.

Mogode DJ (2005) Etude phytochimique et pharmacologique de Cassia nigricans Vahl

(Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Université de Bamako.

Monnet T (2012) Les infections nosocomiales : l ' importance d ' un suivi épidémiologique et de l ' identification rapide des bactéries en cause : exemple de quelques techniques de diagnostic permettant cette identification précoce. UNIVERSITE JOSEPH FOURIER.

Montani D, Jaïs X, Sitbon O, Capron F, Simonneau G, Humbert M (2005) Hypertension artérielle pulmonaire. Rev Mal Respir 22:651–666.

Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI (2005) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT - Food Sci Technol 38:565–570.

Morel J-M (2008) Traité pratique de phytothérapie : remèdes d'hier pour médecine de demain. Grancher.

Morel Y, Barouki R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. Biochem J 342:481–496.

MorelL FL (1976) Reabsorption isoosmotic proximal du rein. Mecanisme et regulation. J PhysioZ Paris 72:515–530.

Mori OK, Obossou EK, Suwa S, Miura S, Oh S, Jinbo N, Ishibashi Y, Shikamoto Y, Hosono T, Toda T, Tomobe K, Shinozuka T, Nakajo S (2016) Human Immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) reverse transcriptase inhibitory effect of Cymbopogon nardus essential oil. nternational J Adv Res Bot 2:7–13.

Morrison RT (1997) Edema and principles of diuretic use. Med Clin North Am 81:689–704.

Moure A, Cruz JM, Franco D, Manuel Domínguez J, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Carlos Parajó J (2001) Natural antioxidants from residual sources. Food Chem 72:145–171.

N'Guessan HAO, Camille Evelyne DD, Mamyrbékova-Békro JA, Békro Y-A (2011) Phenolic Compounds of 10 Medicinal Plants Used in the treatment of arterial hypertension , an Emerging pathology in Côte d ' Ivoire To cite this version : HAL Id : hal-01447327 Revue de. Rev Génie Ind 6:55–61.

Nagata E, Brito ASJ, Matsuo T (2002) Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: Incidence and risk factors. Am J Infect Control 30:26–31.

Nakahara K, Alzoreky NS, Yoshihashi T, Nguyen HTT, Trakoontivakorn G (2003) Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from Cymbopogon nardus (Citronella Grass). Japan Agric Res Q 37:249–252.

Naouel O (2015) Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Université d'Oran.

Nardi GM, Felippi R, DalBó S, Siqueira-Junior JM, Arruda DC, Delle Monache F, Timbola AK, Pizzolatti MG, Ckless K, Ribeiro-do-Valle RM (2003) Anti-inflammatory and antioxidant effects of Croton celtidifolius bark. Phytomedicine 10:176–184.

Nataro JP and KJBJ, Kaper J (1998) Diarrheagenic Escherichia coli Strains. Clin Microbiol Rev 11:142–201.

Nath SC, Sarma KK, Vajezikova I, Leclercq PA (2002) Comparison of volatile inflorescence oils and taxonomy of certain Cymbopogon taxa described as Cymbopogon flexuosus (Nees ex Steud.) Wats. Biochem Syst Ecol 30:151–162.

Nejad SB, Allegranzi B, Syed SB, Ellisc B, Pittetd D (2011) Health-care-associated infection in Africa: a systematic review. Bull World Health Organ 89:757–765.

Neves RCS, Da Camara CAG (2016) Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) and selected monoterpenes. An Acad Bras Cienc 88:1221–1233.

Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD (1996) Herbal medicines. A guide for health-care professionals. The Pharmaceutical Press.

Nguyen VT, Pham NMQ, Vuong Q Van, Bowyer MC, van Altena IA, Scarlett CJ (2016) Phytochemical retention and antioxidant capacity of xao tam phan (Paramignya trimera) root as prepared by different drying methods. Dry Technol 34:324–334.

Nitangam N (2012) Monographs of Cymbopogon nardus (L.) rendle and citronella oil. Prince of Songkla University.

Nourshargh S, Krombach F, Dejana E (2006) The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. J Leukoc Biol 80:714–718.

Ocheng F, Bwanga F, Joloba M, Softrata A, Azeem M, Pütsep K, Borg-Karlson AK, Obua C, Gustafsson A (2015) Essential Oils from Ugandan Aromatic Medicinal Plants: Chemical Composition and Growth Inhibitory Effects on Oral Pathogens. Evidence-based Complement Altern Med 2015.

Ohyama K, Akaike T, Hirobe C, Yamakawa T (2003) Cytotoxicity and Apoptotic Inducibility of Vitex agnus-castus Fruit Extract in Cultured Human Normal and Cancer Cells and Effect on Growth. 10 Biol Pharm Bull 26:10–18.

OMS (2002) OMS | Rapport sur la Santé dans le Monde 2002 - Réduire les risques et promouvoir une vie saine, OMS. World Health Organization.

Ono M, Eguchi K, Konoshita M, Furusawa C, Sakamoto J, Yasuda S, Ikeda T, Okawa M, Kinjo J, Yoshimitsu H, Nohara T (2011) A new diterpenoid glucoside and two new diterpenoids from the fruit of Vitex agnus-castus. Chem Pharm Bull 59:392–396.

Ono M, Yamasaki T, Konoshita M, Ikeda T, Okawa M, Kinjo J, Yoshimitsu H, Nohara T (2008) Five new diterpenoids, viteagnusins A-E, from the fruit of Vitex agnus-castus. Chem Pharm Bull 56:1621–1624.

Osbourn A (1996) Saponins and plant defence — a soap story. Trends Plant Sci 1:4–9.

Ouédraogo N, Lompo M, Sawadogo RW, Tibiri A, Hay AE, Koudou J, Dijoux MG, Guissou IP (2012) Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de Pterocarpus erinaceus Poir. (Fabaceae). Phytotherapie 10:286–292.

Oussou KR, Kanko C, Guessend N, Yolou S, Koukoua G, Dosso M, N'Guessan YT, Figueredo G, Chalchat JC (2004) Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. Comptes Rendus Chim 7:1081–1086.

Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese J Nutr Diet 44:307–315.

P. Hallouët, A. Borry (2009) Bilan des entrées et des sorties, la diurèse In: Mémo-Guide de Biologie et de Physiologie Humaines - UE 2.1 et 2.2 .

Pacchioni I (2014) Aromathérapia : Tout sur les huiles essentielles. Aroma thera, Paris.

Pamplona R, Portero-Otín M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G (2000) Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. Mech Ageing Dev 112:169–183.

Pantoja C V., Norris BC, Contreras CM (1996) Diuretic and natriuretic effects of chromatographically purified fraction of garlic (Allium sativum). J Ethnopharmacol 52:101–105.

Peacock SJ, De Silva I, Lowy FD (2001) What determines nasal carriage of Staphylococcus aureus? Trends Microbiol.

Perrot S, Poulain P, Serrie A, Eschalier A, Mick G, Langley P, Pomerantz D, Ganry H (2013) Description des prescriptions de traitements pharmacologiques à visée antalgique et de leur observance en France : Résultats de l'étude épidémiologique National Health and Wellness Survey réalisée auprt. Douleurs 14:119–130.

Pierron C (2014) Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatriegérontologie et soins palliatifs. Université de Lorraine.

Pillebout E, Martinez F (1997) Médecine thérapeutique : MT., Médecine thérapeutique. John Libbey Eurotext.

Pingot A (1998) Les huiles essentielles.

Popovici C, Saykova I (2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Rev Génie Ind 4:26–39.

Prevention C for DC and (1997) Staphylococcus aureus With Reduced Susceptibility to Vancomycin-United States, 1997. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 46:765.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem 269:337–341.

Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 53:4290–4302.

Puschett JB (1988) Clinical pharmacologic implications in diuretic selection. Am J Cardiol 57:6–13.

Quézel P, Médail F (1995) La région circum-méditerranéenne, centre mondial majeur de biodiversité végétale In: Actes Des 6èmes Rencontres de l'Agence Régionale Pour l'Environment , pp 152–160.

Ramezani M, Amin G, Jalili E (2010) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydroalcohol extract of Vitex agnus castus fruit. World Acad Sci Eng Technol 40:624–626.

Ranaweera SS (1996) Mosquito-lavicidal activity of some Sri Lankan plants. J Natn Sci Coun Sri Lanka 24:63–70.

Rani A, Sharma A (2013) The genus Vitex: A review. Pharmacogn Rev 7:188–198.

Rankin JA (2004) Biological mediators of acute inflammation. AACN Clin Issues 15:3–17.

Rashed K (2013) Antioxidant activity of different extracts of Vitex agnus-castus (L.) and phytochemical profile. Res Pharm 3:1–5.

Raymond M (2005) L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant. Université de Nantes.

Reanmongkol W, Noppapan T, Subhadhirasakul S (2009) Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of Putranjiva roxburghii Wall. leaf extract in experimental animals. J Nat Med 63:290–296.

Regina I, Capoci G, Milano M, Bonfim-mendonça PDS, Ghiraldi-lopes LD, Baeza LC (2015) Antifungal activity of Cymbopogon nardus (L .) Rendle (CITRONELLA) aginst Microsporum canis from animals and home enviroment. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 57:509–511.

Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K, Ettayebi M, Tantaoui-Elaraki A (1993) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. J Essent

Oil Res 5:179–184.

Roulet L, Luthy C, Garin N, Di Pollina De Gold L, Zoccatelli D, Escher Imhof M, Desmeules J, Piguet V (2011) Rotation des opioïdes: De la théorie à la pratique recommandations interdisciplinaires du réseau douleur des HUG. Rev Med Suisse 7:1400–1406.

Rousselet M, Vignaud JM, Hofman P, Chatelet FP (2005) Inflammation et pathologie inflammatoire. Afecap 1–75.

Rybak MJ (2004) Resistance to antimicrobial agents: An update. Pharmacotherapy 24.

Saadi B, Msanda F, Boubaker H (2013) Contributions of folk medicine knowledge in South-western Morocco : The case of rural communities of Imouzzer Ida Outanane Region. Int J Med Plant Res 2:135–145.

Sağlam H, Pabuçcuoğlu A, Kivçak B (2007) Antioxidant activity of Vitex agnus-castus L. extracts. Phyther Res.

Salvetti A, Ghiadoni L (2006) Thiazide diuretics in the treatment of hypertension: An update. J Am Soc Nephrol 17:25–29.

Saranya KVT, Gowrie SU (2018) Phytochemical Analysis and in Vitro Studies on Antibacterial, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities Using Casuarina Equisetifolia Bark Extracts. Int J Pharm Pharm Sci 10:118.

Şarer E, Gökbulut A (2008) Determination of caffeic and chlorogenic acids in the leaves and fruits of Vitex agnus-castus. Turkish J Pharm Sci 5:167–174.

Sarikurkcu C, Arisoy K, Tepe B, Cakir A, Abali G, Mete E (2009) Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of Vitex agnus castus L. fruits from Turkey. Food Chem Toxicol 47:2479–2483.

Sarikurkcu C, Ozer MS, Calli N, Popović-Djordjević J (2018) Essential oil composition and antioxidant activity of endemic Marrubium parviflorum subsp. oligodon. Ind Crops Prod 119:209–213.

Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry 30:3875–3883.

Schneider EG, Mclane LA (1997) Evidence for a peritubular-to-luminal flux phosphate in the dog kidney. Am J Physiol Physiol 232:159–166.

Scimeca D (2007) Les plantes du bonheur : le coup de pouce des plantes contre tous les coups de blues. Éd. lpen.

Seldin D, Giebisch G (197AD) Diuretics Agents: Clinical Physiology and Pharmacology, Academic Press. Acad. Press.

Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW, Ayoub SS (2010) Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press.

Shellie R, Marriott P, Chaintreau A (2004) Quantitation of suspected allergens in fragrances (Part I): Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography for quality control. Flavour Fragr J 19:91–98.

Shimoi K, Masuda S, Shen B, Furugori M, Kinae N (1996) Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen 350:153–161.

Siddhuraju P, Becker K (2007) The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.) seed extracts. Food Chem 101:10–19.

Sijelmassi A (1996) Les plantes médicinales du Maroc, Editions L. ed.

Sijelmassi A (1990) Les plantes médicinales du Maroc, Casablanca. ed.

Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 59:201–222.

Silbernagl S, Agamemnon D, Daniel L (2001) Atlas de poche de physiologie In: Médecine-Sciences .

Silke B (1994) Haemodynamic impact of diuretic therapy in chronic heart failure. Cardiology 84:115–123.

Silou T, Nsikabaka S, Baou A, Loubaki L, Figuérédo G, Chalchat J-C (2017) Plantes aromatiques du Plateau des Cataractes (Bassin du Congo). - I. Caractérisation des huiles essentielles des espèces du genre Cymbopogon acclimatées au Congo-Brazzaville. Congo Sci 5:13–23.

Singh PK (2016) Antibiotics, handle with care. Geneva.

Sivaraj R, Balakrishnan A, M.Thenmozhi, Venckatesh R (2011) Preliminary Phytochemical Analysis of Aegle Marmelos, Ruta Graveolens, Opuntia Dellini, Euphorbia Royleana and Euphorbia Antiquorum. Int J Pharm Sci Res 2:132–136.

Smith MA, Richey GPP, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowal N (1996) Test for oxidative damage in Alzheimer's. Nature 382:120–121.

Sophie C (2005) Précis d'aromathérapie vétérinaire à l'usage des pharmaciens d'officine. [S.l.], [s.n.].

Sorensen JM, Katsiotis ST (1999) Variation in essential oil yield and composition of cretan vitex agnus castus L. Fruits. J Essent Oil Res 11:599–605.

Sørensen JM, Katsiotis ST (2000) Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from Cretan Vitex agnus-castus fruits. Planta Med 66:245–250.

Stein F, Trevino R (1994) Nosocomial infections in the pediatric intensive care unit. Pediatr Clin North Am 41:1245–1257.

Stojković D, Soković M, Glamočlija J, Džamić A, Ćirić A, Ristić M, Grubišić D (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of Vitex agnus-castus L. fruits and leaves essential oils. Food Chem 128:1017–1022.

Stokes JB (1993) Ion transport by the collecting duct. Semin Nephrol 13:202–12.

Sun T, Ho CT (2005) Antioxidant activities of buckwheat extracts. Food Chem 90:743–749.

Tabacco A, Meiattini F, Moda E, Tarli P (1979) Simplified Enzymic / Colorimetrlc Serum Urea Nitrogen Determination Thymol Is a Suitable Preservative for Uric Acid Standards in the Uricase Technique CHEMISTRY , in the CK-BB Least-Squares Evaluation of Linearity More on the Detection of Serum CK-BB Acti. Clin Chem 25:4–5.

Tamer FMD (2003) Free radicals, types, sources and damaging reactions. Intern Med Artic.

Tangjitjaroenkun J (2018) Evaluation of antioxidant, antibacterial, and gas chromatography-mass spectrometry analysis of ethyl acetate extract of streptomyces omiyaensis SCH2. Asian J Pharm Clin Res 11:271–276.

Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP (2012) Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. J Ethnopharmacol 142:265–273.

Toplan GG, Kurkcuoglu M, Husnu Can Baser K, Sariyar G (2015) Composition of the essential oils from samples of Vitex agnus-castus L. growing in Turkey. J Essent Oil Res 27:337–342.

Trindade LA, de Araújo Oliveira J, de Castro RD, de Oliveira Lima E (2015) Inhibition of adherence of C. albicans to dental implants and cover screws by Cymbopogon nardus essential oil and citronellal. Clin Oral Investig 19:2223–2231.

Unsicker SB, Kunert G, Gershenzon J (2009) Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. Curr Opin Plant Biol 12:479–485.

Upadhyay RK, Ahmad S (2010) Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils Against Pathogenic Bacterial Strains. Asian J Med Sci 2:152–158.

V. Van Snick (2012) Aromathérapie Drs VASSART - VAN SNICK I.P.I. Besançon, 05/2012 In: Aromathérapie .

van Olden RW, van Meyel JJM, Gerlag PGG (1995) Sensitivity of residual nephrons to high dose furosemide described by diuretic efficiency. Eur J Clin Pharmacol 47:483–488.

Vansant G (2004) Radicaux libres et antioxydants: principes de base In: Symposium «Antioxydants et Alimentation» , Institut Danone.

Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical.

Talanta 71:230–235.

Vincenot F, Saleh M, Prévost G (2008) Les facteurs de virulence de Staphylococcus aureus. RFL Rev Francoph des Lab 2008:61–69.

Vincent J, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K (2009) International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. Caring Crit Ill Patient 302:2323–2329.

Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry.

Waller GR (1996) Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products By K. Hostettman and A. Marston (Lausanne University, Switzerland). Cambridge University Press: Cambridge, U.K. 1995. xii + 548 pp. $120.00. ISBN 0-521-32970-1. J Am Chem Soc 118:8509–8509.

Webster DE, He Y, Chen SN, Pauli GF, Farnsworth NR, Wang ZJ (2011) Opioidergic mechanisms underlying the actions of Vitex agnus-castus L. Biochem Pharmacol 81:170–177.

Wei LS, Wee W (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of Cymbopogon nardus citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. Iran J Microbiol 5:147–152.

Weisskopf M, Schaffner W, Jundt G, Sulser T, Wyler S, Tullberg-Reinert H (2005) A Vitex agnus-castus extract inhibits cell growth and induces apoptosis in prostate epithelial cell lines. Planta Med 71:910–916.

Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL (2005) The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect Dis 5:751–762.

WHO (2016) The burden of health care-associated infection worldwide In: Clean Care Is Safer Care , World Health Organization.

Wile D (2012) Diuretics: A review. Ann Clin Biochem 49:419–431.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw. Exp Biol Med 3:544–547.

Witschi HP. (1986) Safety evaluation of butylated hydroxyltoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. Food Chem Toxicol 24:1127–1130.

Wollenweber E, Mann K (1982) Flavonole aus Früchten von Vitex agnus castus Flavonols from Fruits of Vitex agnus castus. Planta Med 48:126–127.

Wu HC, Chen HM, Shiau CY (2003) Free amino acids and peptides as related to antioxidant

properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). Food Res Int 36:949–957.

Yao LH, Jiang Y. M., Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS (2004) Flavonoids in Food and Their Health Benefits. Plant Foods Hum Nutr 59:113–122.

Yen G, Chuang D (2000) Antioxidant Properties of Water Extracts from Cassia tora L . in Relation to the Degree of Roasting. J Agric Food Chem 48:2760–2765.

Yoshikawa TT (1998) VRE, MRSA, PRP, and DRGNB in LTCF: Lessons To Be Learned from This Alphabet. J Am Am Geriatr Soc 46:241–243.

Yuliana ND, Khatib A, Link-Struensee AMR, Ijzerman AP, Rungkat-Zakaria F, Young HC, Verpoorte R (2009) Adenosine A1 receptor binding activity of methoxy flavonoids from Orthosiphon stamineus. Planta Med 75:132–136.

Zeng X, Xi Y, Jiang W (2019) Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: A review. Crit Rev Food Sci Nutr 59:2125–2135.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem.

Zhu ZZ, Ma KJ, Ran X, Zhang H, Zheng CJ, Han T, Zhang QY, Qin LP (2011) Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of Desmodium podocarpum. J Ethnopharmacol 133:1126–1131.

Annexe: Articles publiés

Research Article

Cymbopogon Nardus L. Essential Oil: Phytochemical Screening and its Antibacterial Activity against Clinical Bacteria Responsible for Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care

Fatima EL Kamari[1*], Amal Taroq[1], Yassine El Atki[1], Imane Aouam[1], Bouchra Oumokhtar[2], Badiaa Lyoussi[1], Abdelfattah Abdellaoui[1]

[1]Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco.

[2] Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Medicine and Pharmacy, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, 200 Route de Sidi Harazem, Fez, Morocco.

***Corresponding author's E-mail:** kamarisapiens@gmail.com

Received: 23-03-2018; **Revised:** 15-04-2018; **Accepted:** 25-04-2018.

ABSTRACT

Nosocomial infections are the most common adverse events in our modern healthcare system. In Morocco, The incidence of nosocomial infections in neonatal intensive care units is high and is dominated by multiresistant bacteria. In this context, essential oils can be considered as good candidates to provide new antibacterial agents. Thus, our aims in this study are to investigate the antibacterial power of *Cymbopogon nardus* L. essential oil against clinical bacteria responsible for nosocomial infections in neonatal intensive care units, and determine its chemical constituents. The phytochemical characterization of essential oils was evaluated using gas chromatography-flame ionization detector and gas chromatography-mass spectrometer analysis. The antibacterial activity of the oil was tested against seven bacteria species, isolated from infants in the neonatal and intensive care rooms at the university hospital center of Fez Morocco (CHU, Morocco): *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* and *Acinetobacter baumanni*. The essential oil obtained from the leaves of *Cymbopogon nardus* collected from Rabat city, Morocco, was colorless with a yield of 1%, based on the dried extracted material. A total of 13 chemical compounds were identified in C. nardus essential oil, representing 90.4% of the total oil. The major constituents of the oil were citronellal (16.9%), followed by citronellol (10.4%), Elemol (9.1%), Nerol (8 %), the oil inhibited the growth of all bacteria tested. The results obtained suggest that the essential oil of the *Cymbopogon nardus* L. can be used as a natural source in the development of tools against bacteria responsible for nosocomial infections.

Keywords: Citronellol; *Cymbopogon nardus*; essential oil; Nosocomial infections.

INTRODUCTION

The genus *Cymbopogon* belongs to the family Poaceae, which is widely distributed in the tropical and subtropical regions of Africa, Asia, and America. This genus is famous for its high content of essential oils, which have been used for cosmetics, pharmaceutics, and perfumery applications[1]. *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, popularly known as citronella, native to Ceylon is one of the *Cymbopogon* species. The essential oil obtained from the leaves of *Cymbopogon nardus* is commonly used as an insect repellent[2]. Many Studies have shown the antiviral[3], antibacterial[4–6], and antifungal activities of this oil[7,8]. Furthermore, a higher cytotoxic activity of *Cymbopogon nardus* L. essential oils on human epidermic cell line HaCaT was demonstrated by Koba et al[9]. Thus, the essential oil of *Cymbopogon nardus* could be quite suitable as an active component in pharmaceutical formulations for skin treatment and its damages repairing. Moreover, Cymbopogon essential oil can be used for the control of foodborne pathogenic bacteria in the food industry[10].

Nosocomial infections are the most common adverse events in our modern healthcare system; at any time they affect worldwide over 1.4 million people in hospitals and are associated with considerable morbidity, mortality, costs, and use of additional resources[11]. In Morocco, The incidence of nosocomial infections, in neonatal intensive care units is high and is dominated by multiresistant bacteria[12]. Severe pneumonia, urinary tract infections, and respiratory tract infections are examples of these nosocomial infections[13]. In addition, the increase in resistance to conventional antibiotic therapy, toxicity, and costs involved, have justified the search for new therapeutic strategies that are more effective, eco-friendly and less toxic alternatives for the prevention and treatment of nosocomial infections. Among these novel strategies, essential oils are promising natural compounds for use in the prevention and treatment of these kinds of infections. The antimicrobial potential of these oils is attributed to the presence of secondary metabolites such as tannins, terpenes, alkaloids, and flavonoids[14,15]. Previous works on essential oils as natural inhibitors of nosocomial infections have favored new research in this area[16,17]. However, there was no report to our knowledge on the effect of the essential oils on the antibacterial activity against bacteria responsible for nosocomial infections in neonatal intensive care in Morocco. The only reports related to nosocomial infections in neonate were limited to epidemiological studies[12,13]. The first work concerning the antibacterial effect of essential oils against some bacteria causing nosocomial infections in neonatal intensive care services was carried out in our laboratory for Clove essential oil by Amal et al.,[18] and has recently

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

published. Our main objective in this work is to reveal the chemical composition and evaluate the antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* essential oil, for the first time, against some bacteria causing nosocomial infections in the neonate reanimation service, at the University Hospital Center in Fez-Morocco.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Aerial parts (leaves) of *Cymbopogon nardus* were collected from Rabat city, Morocco, in April 2015 and were dried for 7–10 days in the shade at room temperature, then stored in cloth bags at 5 ^{O}C and transferred later to the laboratory for preparation of the plant extracts.

Isolation of the essential oil

A total of 200 g air-dried leaves of *Cymbopogon nardus* were subjected to hydrodistillation for 3 h with 600 mL distilled water using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia[19]. The oil obtained was collected and dried over anhydrous sodium sulphate and stored in a refrigerator at 4–5^{o}C prior to analysis. The Yield based on dried weight of the sample was calculated.

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis

The analysis of the volatile constituents was run on a Thermo Fischer capillary gas chromatograph directly coupled to the mass spectrometer system (model GC ULTRA S/N 20062969; Polaris QS/N 210729), using an HP-5MS non polar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, 0.25 mm film thickness). The operating condition of GC oven temperature was maintained as: initial temperature 40°C for 2 min, programmed rate 2°C/min up to final temperature 260°C with isotherm for 10 min; injector temperature 250°C. The carrier gas was helium, flow rate 1 ml/ min. Samples were run in hexane with a dilution ratio of 10:100. The volume of injected specimen was 1 ml of diluted oil, split injection technique; ionization energy 70eV, in the electronic ionization mode; ion source temperature 200°C, scan mass range of m/z 40–650 and interface line temperature 300°C. TheComponents' identification was made by the determination of their retention indices (RI) relative to those of a homologous series of n-alkanes (C8–C20) (Fluka, Buchs/sg, Switzerland) and by matching their recorded mass spectra with those stored in the spectrometer database (NIST MS Library v. 2.0) and the bibliography[20].

Antimicrobial activity assessment

The antibacterial activity of essential oils from leaves of *Cymbopogon nardus* was evaluated against seven bacteria species, isolated from the newborn in the neonatal intensive care rooms at the university hospital center of Fez Morocco (CHU, Morocco). Gram-positive bacteria included *Staphylococcus aureus (S. aureus), Enterococcus faecalis (E. faecalis)* whereas the group of Gram-negative included *Escherichia coli (E. coli), Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa), Klebsiella pneumoniae (K. pneumonia), Proteus mirabilis (P. mirabilis) and Acinetobacter baumanni (A. baumanni).*

For the experiments of susceptibility screening test of the bacteria, we used the agar-disc-diffusion method as mentioned earlier[16]. Each microorganism stock was suspended in Mueller-Hinton (MH) broth and then incubated at 37 ^{O}C for 18–24 h. The overnight cultures were diluted and adjusted in order to get a density of 10^{8} CFU/mL (0.5 McFarland turbidity standard). They were flood-inoculated onto the surface of MH agar and 6 mm diameter, and sterile filter discs of Whatman paper No. 3 were impregnated with 15 mg/disc of the essential oil and were delivered into the inoculated agar (MH). The plates were incubated for 18 h at 35^{o}C. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition against the tested microorganisms. The discs antibiogram of imipenem (IMP), Amoxicilline (AMX), Cefotaxime (CTX), Kanamycine (K), Penicilline (P), Ampicilline (AMP), Norfloxacine (NOR), Netilimicine (NET), Pristinamycine (PT), Vancomycine (VA), are the standard drugs for comparison. The tests were carried out in duplicates. Results were interpreted interms of a diameter of inhibition zone: resistant (D < 6 mm), intermediaries (6 mm < D < 13 mm) and sensible (D > 13 mm). An average zone of inhibition was calculated for three replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

The essential oil obtained from the leaves of *Cymbopogon nardus* from Rabat city, Morocco was colorless with a yield of 1%, based on the dried extracted material. The obtained yield is higher than the leaves studied in Uganda, which is yielded 0.36%[21].

The chemical composition of the essential oils was analyzed by GC-MS. A total of 13 chemical compounds were identified in *C. nardus* essential oil, representing 90.4 % of the total oil (Table 1). The major constituents of the oil were citronellal (16.9%), followed by citronellol (10.4%), Elemol (9.1%), Nerol (8%), Citronellyl acetate (7.6%), β -Cubinene (7.2%), and Geranyl acetate (7 %). Our results were compared with recent reports. A higher percentage of Citronellal was found by Koba et al. (35.5%) and Trindade et al. (37.7%)[9,22], compared to (16.9%) detected in the present study and 3.7% Found by de Toledo et al. in the essential oil of *Cymbopogon* collected from Brazil[23]. However, The concentration of components was different in the essential oil of *Cymbopogon nardus* collected from Thailand: Geraniol (35.7%), Trans-citral (22.7%), Cis-citral (14.2%), Geranyl acetate (5.8%), Citronellal (5.8%), and Citronellol (4.6%).On the other hand, 3.5% limonene found in the present study was not detected in the study by Nakahara

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

et al[8], but present with a high value as much as 10.7% in the essential oil of *Cymbopogon nardus* collected from Togo[9].These differences in the composition of essential oils from different countries seem to depend on the climate conditions, types, and methods of distillation[24].

Table 1: Chemical composition of *Cymbopogon nardus L.* essential oil from Morocco

Compounds	%Area	RI
Limonene	3.5	1029
Citronellal	16.9	1155
Nerol	8	1229
Citronellol	10.4	1230
Neral	3	1242
Geraniol	3	1257
Citronellyl Acetate	7.6	1355
Eugenol	4.5	1359
Geranyl Acetate	7	1385
β-Elemene	4.8	1394
β -cubinene	7.2	1533
Elemol	9.1	1550
Germacrene-D-4-ol	5.4	1567

Antibacterial activity of Cymbopogon nardus essential oil was studied against seven bacteria responsible for nosocomial infections, isolated from the newborn in the neonatal and intensive care rooms at the university hospital center of Fez Morocco (CHU, Morocco).

Table 2: Antibacterial activity of *Cymbopogon nardus* essential oil against bacteria responsible of nosocomial infections.

Bacterial species	Inhibition zone (mm)	
	Citronel essential oil (15ul /disc)	Antibiotics
S.aureus	14 ± 0.3	7 (P), 16 (k), 24 (CTX), 39 (IMP)
P.mirabilis	10 ± 0.3	0 (AMX), 0 (PT), 18 (K), 22 (IMP)
E.coli	18 ± 0.5	0 (AMX), 0 (CTX), 0 (K), 37 (IMP)
K.pneumoniae	10 ± 1.2	0 (AMX), 0 (CTX) ,0 (K),26 (IMP)
P.aeruginosa	11 ± 0.7	0 (AMP), 0 (CTX), 0 (NOR), 0 (NET) ,12 (IMP)
A.boumanii	36 ± 0.3	13 (OFX), 9 (VA), 0 (P), 0 (CEC)
E.feacalis	14 ± 00	17 (CTX), 0(K), 0(PT), 30 (IMP).

Data are expressed as mean ± SD

Abreviations Standard antibiotic disc : Imipenem IMP, Amoxicillin AMX, Cefotaxime CTX, Kanamycin K, Penicillin P, Ampicillin AMP, Norfloxacin NOR, Netilimicin NET, Pristinamycine PT. Cefaclor CEC, Ofloxacine OFX, Vancomycine VA.

As shown in Table 2, the results of antimicrobial activity revealed that the essential oil of *Cymbopogon nardus* inhibited the growth of both Gram-negative and Gram-positive bacteria species tested with varying degrees of inhibition, and except for IMP, showed stronger antibacterial activity when compared to standard antibiotics used as controls. This finding is in line with previous studies where essential oil from *C. nardus* was found to inhibit the growth of various types of human pathogens such as *Acinetobacter baumanii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus*[25].In addition, Wei and al. reported that C. *nardus* essential oil was able to inhibit the growth of all 36 bacterial isolates from cultured aquatic animals[6]. The strong antibacterial activity of *C.nardus* essential oil may be attributed to the presence of major components such as Citronellal, Citronellol, Elemol, and Nerol. However, it is possible that other minor molecules modulate the activity of the main components.

CONCLUSION

To the best of our knowledge, this is the first report on the antibacterial property of *C. nardus* essential oil from Morocco, against nosocomial bacteria isolated from the newborn in the neonatal intensive care rooms. Results obtained have demonstrated that the essential oil of the Moroccan *Cymbopogon nardus* is a potential source of bioactive compounds with strong antibacterial activity against all bacteria tested, especially those which have acquired resistance to conventional antibiotics. Thus, our findings may form the basis for further in vivo studies to purify the major components of these plants and to assess their appreciable antibacterial actions against nosocomial bacteria species.

REFERENCES

1. Khanuja SPS, Shasany AK, Pawar A, Lal RK, Darokar MP, Naqvi AA, Rajkumar S, Sundaresan V, Nirupama Lal, Sushil Kumar, Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in Cymbopogon Spreng. (Poaceae). *Biochem Syst Ecol*. 33, 2005, 171-186.
2. Castro L De. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais. 2003.
3. Aini MNN, Said MI, Nazlina I, Hanina MN, Ahmad IB. Screening for antiviral activity of sweet lemon grass (Cymbopogon nardus (L.) Rendle) fractions, *J Biol Sci*, 6(3), 2006, 507-510.
4. Mohd Fazrullah Innsan MF, Shahril MH, Samihah MS, Siti Asma OS, Radzi Mat, Abd Jalil AK, Hanina MN, Pharmacodynamic properties of essential oils from

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

Cymbopogon species. *African J Pharm Pharmacol*, 5(24), 2011, 2676-2679.

5. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M,Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a Pseudomonas putida strain isolated from meat. *Meat Sci*, 73(2), 2006, 236-244.
6. Wei LS, Wee W. Chemical composition and antimicrobial activity of Cymbopogon nardus citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iran J Microbiol*, 5(2), 2013,147-152.
7. de Billerbeck VG, Roques CG, Bessière JM, Fonvieille JL, Dargent R. Effects of Cymbopogon nardus (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of Aspergillus niger. *Can J Microbiol*. 47(1), 2001, 9-17.
8. Nakahara K, Alzoreky NS, Yoshihashi T, Nguyen HTT, Trakoontivakorn G. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from Cymbopogon nardus (Citronella Grass). *Japan Agric Res Q*, 37(4), 2003, 249-252.
9. Koba K, Sanda K, Guyon C, Raynaud C, Chaumont J-P, Nicod L. In vitro cytotoxic activity of Cymbopogon citratus L. and Cymbopogon nardus L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol*, 4(1), 2008, 29-34.
10. Florisvaldo Brugnera D, Maciel M, De Oliveira M, Hilsdorf Piccoli R, ESSENTIAL OILS OF CYMBOPOGON SP. IN THE CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA*. Alim. Nutr., Araraquara, 22(3), 2011, 339-343.
11. OK Helder -. Prevention of nosocomial bloodstream infections in preterm infants. *Erasmus Univ Rotterdam*, 2013.
12. Maoulainine F-M-R, Elidrissi N-S, Chkil G,Abba F, SoraaN, Chabaa L, Amine M, Aboussad A, Épidémiologie de l'infection nosocomiale bactérienne dans un service de réanimation néonatale marocain. Arch Pédiatrie, 21(9), 2014, 938-943.
13. Lachassinne E, Letamendia-Richard E, Gaudelus J. Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. *Arch Pédiatrie*, 11(3), 2004, 229-233.
14. Costa GM, Endo EH, Cortez DAG, Ueda-NakamuraT, Nakamura CV,Filho BPD, Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of Staphylococcus aureus and Candida albicans. *Int J Curr Microbiol an Appl Sci*, 4(6), 2015, 908-917.
15. Piccinelli AC, Aquino DFS , Morato PN, Kuraoka-Oliveira Â M, Strapasson RLB, dos Santos ÉP, Stefanello MÉA, Oliveira RJ, Kassuya CAL, Anti-Inflammatory and Antihyperalgesic Activities of Ethanolic Extract and Fruticulin A from Salvia lachnostachys Leaves in Mice. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 835914.
16. Mharti FZ, Lyoussi B, Abdellaoui A. Antibacterial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus used in Moroccan folkloric medicine, *Nat Prod Commun*, 6(10), 2011, 1505-1506.
17. Jalal Z, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of Melissa officinalis L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pac J Trop Biomed*, 5(6), 2015, 458-461.
18. Taroq A, El Kamari F, Oumokhtar B, Aouam I, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A, Research Article Phytochemical Screening of the Essential Oil of Syzygium aromaticum and Antibacterial Activity against Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care , Int J Pharm Sci Rev Res, 48(14), 2018, 58-61.
19. Maisonneuve, S.A, European Pharmacopoeia. Sainte-Ruffine, France 3, 1975, 68-80.
20. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/massspectrometry, Carol Stream: *Allured Publishing Corporation 2001, 455.*
21. Ocheng F, Bwanga F, Joloba M, Softrata A, Azeem M, Pütsep K, Borg-Karlson AK, Obua C, Gustafsson A, Essential Oils from Ugandan Aromatic Medicinal Plants: Chemical Composition and Growth Inhibitory Effects on Oral Pathogens. *Evidence-based Complement Altern Med*, 2015.
22. Trindade LA, de Araújo Oliveira J, de Castro RD, de Oliveira Lima E. Inhibition of adherence of C. albicans to dental implants and cover screws by Cymbopogon nardus essential oil and citronellal. *Clin Oral Investig*, 19(9), 2015, 2223-2231.
23. De Toledo LG, Ramos M, Spósito L, Castilho E, Pavan F, Lopes É, Zocolo G, Silva F, Soares T, Santos A, Bauab T, De Almeida M.Essential Oil of Cymbopogon nardus (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by Candida Species. *Int J Mol Sci*, 17(12), 2016,1252.
24. Ocheng F, Bwanga F, Joloba M, Softrata A, Azeem M, Pütsep K, Borg-Karlson AK, Obua C, Gustafsson A, Essential Oils from Ugandan Aromatic Medicinal Plants: Chemical Composition and Growth Inhibitory Effects on Oral Pathogens. *Evidence-based Complement Altern Med*, 2015.
25. Trindade LA, de Araújo Oliveira J, de Castro RD, de Oliveira Lima E. Inhibition of adherence of C. albicans to dental implants and cover screws by Cymbopogon nardus essential oil and citronellal. *Clin Oral Investig*, 19(9), 2015, 2223-2231.
26. De Toledo LG, Ramos M, Spósito L, Castilho E, Pavan F, Lopes É, Zocolo G, Silva F, Soares T, Santos A, Bauab T, De Almeida M.Essential Oil of Cymbopogon nardus (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by Candida Species. *Int J Mol Sci*, 17(12), 2016, 1252.
27. Sørensen JM, Katsiotis ST. Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from Cretan Vitex agnus-castus fruits. *Planta Med*, 66(3), 2000, 245-250.
28. Hammer KA, Carson CF, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*, 86(6), 1999, 985-990.

Source of Support: Nil, **Conflict of Interest:** None.

© Copyright protected. Unauthorised republication, reproduction, distribution, dissemination and copying of this document in whole or in part is strictly prohibited.

ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH

INNOVARE ACADEMIC SCIENCES
Knowledge to Innovation

Vol 11, Issue 10, 2018

Online - 2455-3891
Print - 0974-2441

Research Article

CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS FROM *VITEX AGNUS-CASTUS L.* GROWING IN MOROCCO AND ITS *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST CLINICAL BACTERIA RESPONSIBLE FOR NOSOCOMIAL INFECTIONS

FATIMA EL KAMARI*, AMAL TAROQ, YASSINE EL ATKI, IMANE AOUAM, BADIAA LYOUSSI, ABDELFATTAH ABDELLAOUI

Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco. Email: kamarisapiens@gmail.com

Received: 15 May 2018, Revised and Accepted: 23 June 2018

ABSTRACT

Objective: The aim of the current study is to determine the chemical composition and evaluate antibacterial activity of *Vitex agnus-castus L.* (VAC) essential oils against some bacteria causing nosocomial infections in the neonatal and intensive care rooms at the university hospital center of Fez Morocco.

Methods: The phytochemical screening of essential oils was determined using gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry analysis. The antibacterial test was evaluated against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria species (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa,* and *Proteus mirabilis*) using disc diffusion method.

Results: Twenty-nine components were identified in the fruits' oil representing 93.1% of total oil. The major components in the fruits oil are 1,8-cineole (11.6%), α-thujene (9.3%), phyllocladene (8.2%), α-pinene (7.9%), caryophyllene (5.9%), and cubenol (5%). Furthermore, 28 components were identified in the leaf essential oil. The main component was caryophyllene (9.5%), followed by 1,8-cineole (8.7%), manoyl oxide (7.3%), eugenyl acetate (7.1%), phyllocladene (6.8%), and α-pinene (5.2%). Antibacterial activity of both oils showed a strong activity against nosocomial bacteria tested.

Conclusion: Essential oils of Moroccan VAC could be exploited as natural drugs for bacteria, especially those who have acquired resistance to conventional antibiotics.

Keywords: *Vitex agnus-castus L.*, Essential oil, Nosocomial infections, Antibacterial activity, 1,8 Cineole.

© 2018 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4. 0/) DOI: http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i10.27307

INTRODUCTION

Nosocomial infections dominated by bacterial strains represent a real problem in our modern health-care system [1]. In Morocco, the incidence of nosocomial infections, in neonatal intensive care units, is high and dominated by multiresistant bacteria [2]. This is the reason why new natural alternatives were established to overcome the incidence of nosocomial infections. Several reports have indicated a potent antimicrobial activity of essential oils against various microorganisms [3,4]. The antimicrobial potential of these oils has been attributed to the secondary metabolites [5,6]. *Vitex agnus-castus* L. (VAC) (*Verbenaceae*) is a deciduous shrub that is native to Mediterranean region, Europe, and Central Asia [7]. It is commonly known as chaste tree, widespread in Morocco, along the rivers [8], and known as "shajarat Mariam." It has been proven that it has many biological activities. Fruits of chaste tree have been traditionally used in the treatment of women complaints, including menstrual disorders (amenorrhea and dysmenorrhea), premenstrual dysphoric disorder, corpus luteum insufficiency, hyperprolactinemia, infertility, acne, menopause, disrupted lactation, cyclic breast pain, cyclical mastalgia, and inflammatory conditions, diarrhea, and flatulence [7,9-12]. The insecticidal property of VAC essential oils against *Spilosoma obliqua* has also been reported [13]. Furthermore, VAC contains flavonoids [14], diterpenoids [15], and essential oils [16]. Moreover, essential oils and methanolic extract of VAC have shown antimicrobial and antifungal activities [17-19]. The leaves of this plant are used as a spice [20]. In Imouzzer Ida Ou Tanane region, VAC (leaves and fruits) is used for burns, colds, headaches, and as a fumigant. In this region, this species is known as "Angarf-lkrwaa" [21].

There is no study to the best of our knowledge on the antibacterial activity of essential oils against bacteria responsible for nosocomial infections in neonatal intensive care in Mororcco. The only reports related to nosocomial infections in neonate were limited to epidemiological studies [2,22]. The first work concerning the antibacterial effect of essential oils against some bacteria causing nosocomial infections in neonatal intensive care services was carried out in our laboratory for clove essential oil by Taroq *et al.* [23]. For this purpose, we try, in this work, for the first time, to evaluate the antimicrobial activity of VAC essential oils against some nosocomial bacteria, isolated from the newborn in the neonatal and intensive care rooms at the university hospital center of Fez Morocco.

MATERIALS AND METHODS

Plant material collection

Samples of fruits and leaves of VAC were collected during June–October in 2016 (flowering period) in Khenifra. Identification was confirmed by Professor Amina Bari, Botanist (Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fez, Morocco). A voucher specimen with reference number 2298/4-16-2/Kh was deposited in the Department of Biology in the same university. Plant material was dried for 1–2 weeks in the shade at room temperature. The samples dried were stored at 5°C until the preparation of the plant extracts.

Isolation of the essential oils

A portion (100 g) of the dried aerial parts of VAC (leaves and fruits) was submitted for 3 h to water distillation, using a clevenger-type apparatus according to the method recommended by the European

Pharmacopoeia [24]. The obtained oils were dried with anhydrous "sodium sulfate" and stored in a refrigerator at 4–5°C before analysis. Yields were calculated based on the dried weight of each sample.

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis

The volatile compounds were analyzed run on a Thermo Fischer capillary GC directly coupled to the MS system (model GC ULTRA S/N 20062969; Polaris QS/N 210729), using an HP-5MS non-polar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, 0.25 mm film thickness). The operating condition of GC-MS oven temperature was kept as follows: Initial temperature 40°C for 2 min, programmed rate 2°C/min up to final temperature 260°C with isotherm for 10 min, and injector temperature 250°C. The helium was the carrier gas with a flow rate (1 ml/min). Essential oil samples were diluted in hexane with a dilution ratio of 10:100. The volume of injected specimen was 1 µl of diluted oil, split injection technique, ionization energy 70 eV, in the electronic ionization mode, ion source temperature 200°C, scan mass range of *m/z* 40–650, and interface line temperature 300°C. Component characterization was made by determination of their retention indices (RIs) relative to those of a homologous series of *n*-alkanes (C8–C20) (Fluka, Buchs/sg, Switzerland) and by matching their recorded mass spectra with those stored in the spectrometer database (NIST MS Library v. 2.0) and the bibliography [25].

Test microorganisms

All strains tested were isolated from the newborn in the neonatal and intensive care rooms in the university hospital center of Fez Morocco (CHU, Morocco). Gram-positive bacteria included only *Staphylococcus aureus*, whereas the group of Gram-negative included *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, and Proteus mirabilis.*

Screening of antibacterial activity

The agar-disc diffusion was used for bacterial susceptibility screening test as previous studies [26-28]. Each bacteria strain was suspended in Mueller-Hinton (MH) broth and then incubated at 37°C for 18–24 h. The cultures were diluted and adjusted to get a density of 108 CFU/ml (0.5 McFarland turbidity standard). Then, they were inoculated on to the surface of MH agar and 6 mm diameter, and sterile filter discs of Whatman paper N°3 were impregnated with 15 µg/disc of the essential oil and were delivered into the inoculated agar (MH). The plates were incubated for 18 h at 37°C. Antimicrobial effect was evaluated by measuring the zone of inhibition against the tested bacteria. The standard drugs for comparison were the disc antibiogram of imipenem (IMP), amoxicillin (AMX), cefotaxime (CTX), kanamycin (K), penicillin (P), ampicillin (AMP), norfloxacin (NOR), netilmicin (NET), and pristinamycine (PT). Result analyses were interpreted in terms of a diameter of inhibition zone: Resistant (D <6 mm), intermediaries (6 mm < D <13 mm), and sensible (D >13 mm). An average zone of inhibition was calculated from three repeats. Results were reported as mean±standard deviation (SD).

RESULTS

Phytochemicals

Essential oils of the fruits and leaves of VAC from Khenifra, Morocco, were dark-yellow with yields of 0.35% from leaves and 1% from fruits.

The chemical composition of essential oils from leaves and fruits of Moroccan VAC is summarized in Table 1. 29 components were identified in the oil of the fruits (93.1% of total oil). The major components in the fruit's oil are 1,8-cineole (11.6%), α-thujene (9.3%), phyllocladene (8.2%), α-pinene (7.9%), caryophyllene (5.9%), and cubenol (5%). On the other hand, 28 components were found in the leaf essential oil representing 90.5% of the total oil. The major component was caryophyllene (9.5%), followed by 1,8-cineole (8.7%), manoyl oxide (7.3%), eugenyl acetate (7.1%), phyllocladene (6.8%), and α-pinene (5.2%). Notice that certain components exist in the essential oil of the fruits (α-longipinene, globulol, and docosene) but are absent in the oil of the leaves. Similarly, other components exist in the essential oil of the leaves but not in the oil of the fruits (manool and sclareol).

Antibacterial activity

The antibacterial activity of essential oils from fruits and leaves of VAC was tested by agar disc diffusion method against five bacteria strains: *S. aureus, E. coli, K. pneumonia, P. aeruginosa,* and *P. mirabilis,* which are responsible for nosocomial infections, isolated from newborn in the neonatal and intensive care rooms in the university center hospital of Fez Morocco (CHU, Morocco). The results showed that both essential oils were active against all the studied bacteria when compared to standard antibiotics used as controls (AMX, CTX, K, P, AMP, PT, NOR, NET, and IMP) (Table 2), and in this Table 2, we note that the fruit oil showed slightly better antibacterial activity than the leaf oil. However, the antibacterial effect of both essential oils was lower when compared to IMP standard antibiotics. In addition, the results indicate that *S. aureus* is the most sensitive bacteria to fruit and leaf essential oils with inhibition zones 20±0.3 and 16.3±0.3, respectively.

DISCUSSION

The obtained yield from the essential oil of VAC fruits is higher than the fruits yielded and studied in Greece [29] and Serbia [30] which are, respectively, 0.7% and 0.72%. The chemical composition of essential oils from leaves and fruits of Moroccan VAC was compared with other studies. In Iran, caryophyllene oxide (24.9%), n-hexadecane (12.5%), and α-terpinyl acetate (11.6%) are the major constituents found in the chaste tree fruit essential oil [31]. However, in Turkey, sabinene and 1,8-cineole are the main components in fruits of VAC [32]. Furthermore, the major constituents of VAC fruit essential oil from Albania were 1,8-cineole (14.2%), sabinene (8.2%), ß-farnesene (7.5%), α-terpinyl acetate (7.1%), ß-caryophyllene (6.8%), and sclareol (6.3%) [33]. The main constituents of essential

Table 1: Chemical composition of essential oils from leaves and fruits of Moroccan VAC

Compounds	RI	Leaf area (%)	Fruit area (%)
α-Thujene	921	6.4	9.3
α-Pinene	930	5.2	7.9
Sabinene	974	1.2	1.6
α-Phellandrene	1006	0.8	1.2
1,4-Cineole	1017	0.7	2.1
1,8-Cineole	1029	8.7	11.6
Fenchone	1092	1.1	2.7
Fenchol	1131	0.4	1.1
Estragole	1175	1.8	3.7
Carvone	1246	1.1	1.9
Caryophyllene	1366	9.5	5.9
α-Longipinene	1396	-	1.2
Eugenyl acetate	1438	7.1	4.6
Caryophyllene oxide	1489	5.0	2.2
Globulol	1521	-	1.8
Cedrol	1554	2.0	1.1
Cubenol	1588	3.5	5.0
Torreyol	1622	0.8	1.2
α-Santanol	1670	5.3	4.1
β-Santanol	1714	2.2	1.8
Santanol acetate	1766	1.2	0.8
Cedrane-diol	1822	1.1	0.4
Manool-epi	1883	2.3	1.1
Manoyl oxide	1919	7.3	3.5
Phyllocladene	1956	6.8	8.2
Manool	2058	4.6	-
β-Hydroxy isopimarene	2066	1.3	1.6
Docosene	2156	-	1.4
Docosane	2214	2.0	2.1
Sclareol	2336	1.5	-
Totarol	2356	2.4	2.0

The component identification was made by determination of their RI relative to those of a homologous series of n-alkanes (C8–C20) (Fluka, Buchs/sg, Switzerland) and by matching their recorded mass spectra with those stored in the spectrometer database (NIST MS Library v. 2.0) and the bibliography. VAC: *Vitex agnus-castus* L, RI: Retention indices

Table 2: Antibacterial activity of VAC essential oils against bacteria responsible of nosocomial infections measured in millimeter

Bacteria species	Inhibition zone antibiotics	Leaves E. oil	Fruits E. oil
Bacteria species			
S. aureus	0(P), 16(K), 24(CTX), 39(IMP)	16.3±0.3	20±0.3
E. coli	0(AMX), 0(CTX) ,0(K), 37(IMP)	14±0.6	17.6±00
K. pneumoniae	0(AMX), 0 (CTX) ,0(K), 26 (IMP)	13.3±0.3	16±00
P. aeruginosa	0 (AMP), 0 (CTX) ,0(NOR), 14(IMP)	12±0.3	15±0.5
P. mirabilis	0 (AMX), 0 (PT), 18(K), 22 (IMP)	12.3±0.3	13.6±0.3

Each value is expressed as mean±SD. (n=3). *S. aureus: Staphylococcus aureus, E. coli: Escherichia coli, K. pneumoniae: Klebsiella pneumoniae, P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa, P. mirabilis: Proteus mirabilis,* standard antibiotic disc: IMP: Imipenem, AMX: Amoxicillin, CTX: Cefotaxime, K: Kanamycin, P: Penicillin, AMP: Ampicillin, NOR: Norfloxacin, PT: Pristinamycine, VAC: *Vitex agnus-castus* L, RI: Retention indices

oil of VAC leaves from Montenegro were 1,8-cineole (22.0%), trans-β-farnesene (9.4%), α-pinene (9.4%), trans-β-caryophyllene (8.2%), and terpinen-4-ol (7.8%) [20]. Hamid *et al*. found 34 components in the leaf essential oil of a North Central Nigeria, representing 98.5% of the essential oil. The major components of this oil were β-pinene (20.0%), α-pinene (9.1%), cis-ocimene (8.4%), 1,8-cineole (6.7%), terpinen-4-ol (4.2%), β-phellandrene (4.1%), and α-terpineol (4.1%) [34]. According to the results reported recently, the chief components of the leaf essential oil from Iran were α-pinene (14.8%), limonene (10.2%), β-caryophyllene (6.9%), sabinene (5.2%), and β-farnesene (5.9%) [35]. These variations in the composition of the volatile oils from VAC seem to depend on climate, conditions, types, and methods of distillation [29].

The present results show that essential oils of VAC have a good antibacterial activity against all bacteria tested. This result corroborates with the studies reported previously; the fruit essential oil from Albania exhibits antibacterial activity against all bacteria tested, but *S. aureus* was the most sensitive one [33]. Antimicrobial activity of fruit essential oil of VAC from Iran has been investigated against six bacterial species (*P. aeruginosa, E. coli, S. aureus, Bacillus subtilis, Salmonella enteritidis,* and *Listeria monocytogenes*). Results showed that the fruit oil is active against strains except for *E. coli* and *L. monocytogenes* [31].

Various studies which investigate the action of essential oils against pathogenic microorganisms agree that essential oils are more effective against Gram-positive bacteria than against Gram-negative [35,36]. This could be due probably to the resistance of Gram-negative microorganisms to essential oils compared to Gram-positive microorganisms. The strong antibacterial activity of the two essential oils of VAS may be attributed to the presence of 1, 8-cineole as a major compound [37,38]. However, it is possible that other minor compounds exhibit some antibacterial effect too. Otherwise, a synergistic effect between the diverse components of the oil is possible [39].

CONCLUSION

Results of this study demonstrated that essential oils of Moroccan chaste tree could be exploited as a natural antibacterial drug for bacteria causing nosocomial infections in the neonatal intensive care rooms. However, further investigations are needed to confirm the safety of these oils.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Regional Center of Interface, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fez, Morocco, for the GC coupled with (GC/MS).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All the author have contributed equally.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

1. Helder OK. Prevention of Nosocomial Bloodstream Infections in Preterm Infants. Rotterdam: Erasmus Univercity Rotterdam; 2013.
2. Maoulainine FM, Elidrissi NS, Chkil G, Abba F, Soraa N, Chabaa L, *et al*. Épidémiologie de l'infection nosocomiale bactérienne dans un service de réanimation néonatale marocain. Arch Pédiatr 2014;21:938-43.
3. Moharram BA, Al-mahbashi HM, Saif-ali R, Aqlan FA. phytochemical, anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic and antibacterial study of *Capparis cartilaginea* decne from yemen. Int J Pharm Pharm Sci 2018;10:38-44.
4. Tawfeeq AA, Mahdi MF, Abaas IS, Alwan A. Isolation,quantification, and identification of rosmarinic acid, gas chromatograph y-mass spectrometry analysis of essential oil, cytotoxic effect, and antimicrobial investigation of *Rosmarinus officinalis* leaves. Asian J Pharm Clin Res 2018;11:126-32.
5. Costa GM, Endo EH, Aparício D, Cortez G, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, *et al*. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Int J Curr Microbiol App Sci 2015;4:908-17.
6. Piccinelli AC, Aquino DF, Morato PN, Kuraoka-Oliveira AM, Strapasson RL, Santos EP, *et al*. Anti-inflammatory and antihyperalgesic activities of ethanolic extract and fruticulin a from *Salvia lachnostachys* leaves in mice. Evid Based Complement Alternat Med 2014;2014:835914.
7. Ono M, Yamasaki T, Konoshita M, Ikeda T, Okawa M, Kinjo J, *et al*. Five new diterpenoids, viteagnusins A—E, from the fruit of *Vitex agnus-castus*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2008;56:1621-4.
8. Bellakhdar J. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle : Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires. Paris: Ibis Press; 1997.
9. Costa MR, Ribeiro CG, Santos-Filho SD, Neves RF, Fonseca AS, Bernardo-Filho M, *et al*. An aqueous extract of *Vitex agnus castus* alters the labeling of blood constituents with technetium-99m. Braz Arch Biol Technol 2007;50:183-88.
10. Azarnia M, Ejtemaei-Mehr S, Shakoor A, Ansari A. Effects of *Vitex agnus castus* on mice fetus development. Acta Med Iran 2007;45:263-70.
11. Carmichael AR. Can *Vitex agnus castus* be used for the treatment of mastalgia? What is the current evidence? Evid Based Complement Alternat Med 2008;5:247-50.
12. Dugoua JJ, Seely D, Perri D, Koren G, Mills E. Safety and efficacy of chastetree (*Vitex agnus-castus*) during pregnancy and lactation. Can J Clin Pharmacol 2008;15:74-9.
13. Tandon S, Mittal AK, Pant AK. Insect growth regulatory activity of *Vitex trifolia* and *Vitex agnus-castus* essential oils against *Spilosoma obliqua*. Fitoterapia 2008;79:283-6.
14. Hoberg E, Meier B, Sticher O. Quantitative high performance liquid chromatographic analysis of casticin in the fruits of *Vitex agnus-castus*. Pharm Biol 2001;39:57-61.
15. Hoberg E, Orjala J, Meier B, Sticher O. Diterpenoids from the fruits of *Vitex agnus-castus*. Phytochemistry 1999;52:1555-8.
16. Sørensen JM, Katsiotis ST. Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from cretan *Vitex agnus-castus* fruits. Planta Med 2000;66:245-50.
17. Arokiyaraj S, Perinbam K, Agastian P, Kumar RM. Phytochemical

analysis and antibacterial activity of *Vitex agnus-castus*. Int J Green Pharm 2009;3:162-4.
18. Ahmad B, Hafeez N, Ara G, Azam S, Bashir S, Khan I. Antibacterial activity of crude methanolic extract and various fractions of *Vitex agnus castus* and *Myrsine africana* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Pak J Pharm Sci 2016;29:1977-83.
19. Asdadi A, Hamdouch A, Oukacha A, Moutaj R, Gharby S, Harhar H, *et al*. Study on chemical analysis, antioxidant and *in vitro* antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of argan tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. J Mycol Méd JMed Mycol 2015;25:e118-27.
20. Stojkovi D, Sokovi M, Glamočlija J, Džami A, Iri A, Risti M, *et al*. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. Food Chem 2011;128:1017-22.
21. Miguel M, Bouchmaaa N, Aazza S, Gaamoussi F, Lyoussi B. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of moroccan plants. Fresenius Environ Bull 2014;23:1375-88.
22. Lachassinne E, Letamendia-Richard E, Gaudelus J. Épidémiologie des infections nosocomiales en néonatalogie. Arch Pédiatr 2004;11:229-33.
23. Taroq A, El Kamari F, Oumokhtar B, Aouam I, El Atki Y, Lyoussi B, *et al*. Phytochemical screening of the essential oil of *Syzygium aromaticum* and antibacterial activity against nosocomial infections in neonatal intensive care. Int J Pharm Sci Rev Res 2018;48:58-61.
24. Maisonneuve SA. European Pharmacopoeia. Vol. 3. France: Sainte-Ruffine; 1975. p. 68-80.
25. Adams RP. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass spectrometry. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation; 2007.
26. Mharti FZ, Lyoussi B, Abdellaoui A. Antibacterial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* used in Moroccan folkloric medicine. Nat Prod Commun 2011;6:1505-6.
27. Jalal Z, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. Asian Pac J Trop Biomed 2015;5:458-61.
28. Ravindran AE, Thoppil JE. phytochemical profiling and antibacterial efficacy screening of *Aglaia malabarica* sasidh. Int J Curr Pharm Res 2018;10:20-2.
29. Sorensen JM, Katsiotis ST. Variation in essential oil yield and composition of cretan *Vitex agnus castus* L. Fruits. J Essent Oil Res 1999;11:599-605.
30. Ajdžanović V, Spasojević I, Pantelić J, Šošić-Jurjević B, Filipović B, Milošević V, *et al*. *Vitex agnus-castus* L. essential oil increases human erythrocyte membrane fluidity. J Med Biochem 2012;31:222-7.
31. Ghannadi A, Bagherinejad M, Abedi D, Jalali M, Absalan B, Sadeghi N. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Pelargonium graveolens* L'Her and *Vitex agnus-castus* L. Iran J Microbiol 2012;4:171-6.
32. Sarikurkcu C, Arisoy K, Tepe B, Cakir A, Abali G, Mete E. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. Food Chem Toxicol 2009;47:2479-83.
33. Dervishi-Shengjergji D, Papajani V, Hamiti X, Nuro A, Kika B. Antibacterial activity and chemical composition of *Vitex agnus castus* fruits essential oils from Mbishkodra, Albania. J Int Environ Appl Sci 2014;9:521-4.
34. Hamid AA, Usman LA, Adebayo SA, Zubair MF, Elaigwu SE. Chemical constituents of leaf essential oil of North-central Nigerian grown *Vitex agnus-castus* l. Adv Environ Biol 2010;4:250-3.
35. Khalilzadeh E, Saiah GV, Hasannejad H, Ghaderi A, Ghaderi S, Hamidian G, *et al*. Antinociceptive effects, acute toxicity and chemical composition of *Vitex agnus-castus* essential oil. Avicenna J Phytomed 2015;5:218-30.
36. Kivrak İ, Duru ME, Öztürk M, Mercan N, Harmandar M, Topçu G. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. Food Chem 2009;116:470-9.
37. Oyedeji O, Lawal O, Shode F, Oyedeji A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. Molecules 2009;14:1990-8.
38. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, *et al*. Antifungal activity of thymus oils and their major compounds. J Eur Acad Dermatol Venereol 2004;18:73-8.
39. Saranya VT, Gowrie S. Phytochemical analysis and *in vitro* studies on antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory activities using *Casuarina equisetifolia* bark extracts. Int J Pharm Pharm Sci 2018;10:118-25.

IJPSR (2019), Volume 10, Issue 4 (Research Article)

INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH

Received on 15 July 2018; received in revised form, 05 October 2018; accepted, 08 October 2018; published 01 April 2019

TOTAL PHENOLS CONTENT, FLAVONOID CONCENTRATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF LEAVES EXTRACTS OF *VITEX AGNUS-CASTUS* L. GROWING WILD IN MOROCCO

Fatima EL kamari *, Amal Taroq, Yassine EL atki, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi and Abdelfattah Abdellaoui

Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar EL Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco.

Keywords:

Antioxidant activity, Flavonoids, *Vitex agnus-castus* L., Phenols

Correspondence to Author:
Fatima El Kamari

Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar EL Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco.

E-mail: kamarisapiens@gmail.com

ABSTRACT: *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) commonly known as Chaste tree, is a shrub widely distributed in the Middle East and Southern Europe. Traditionally used for the treatment of several health problems and symptoms, such as premenstrual ones and spasmodic dysmenorrhea, certain menopausal conditions, insufficient lactation, and acne. Several reports have indicated that *Vitex agnus-castus* contained flavonoids, diterpenoids, and essential oils. To our knowledge, no data are available on the antioxidant activities of Moroccan *Vitex agnus-castus*. This work aims to evaluate the antioxidant activity of four extracts from leaves of *Vitex agnus-castus* growing wild in Morocco. Phytochemical tests of the extracts (ethanol, methanol, ethyl acetate, and water) were carried out qualitatively for the presence of Alkaloids, Tannins, Anthraquinones, Terpenes, and saponins. *In-vitro* antioxidant activity, total phenols content and total flavonoid content of different extracts were determined using spectrophotometric methods. The total phenolic content ranged from (10 ± 0.2 to 53.33 ± 1.38 mgEq GAE/g DW), and the total flavonoid concentrations varied from (13.66 ± 0.33 to 95.33 mg RE/gDW). Ethanolic extract of *Vitex agnus-castus* leaves has shown the highest phenols and flavonoid concentrations and strong antioxidant activity. A very strong positive correlation between the total antioxidant activity of the extracts and their content of phenols and flavonoids ($P<0.05$) is observed. Therefore, Moroccan *Vitex agnus-castus* L. can be regarded as promising candidates for natural plant sources of antioxidants with high value.

INTRODUCTION: Free radicals and reactive oxygen species (ROS) are considered to be harmful to human health and play an essential causative role in disease initiation such as neurodegenerative disease, and cancer [1].

QUICK RESPONSE CODE

DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1670-76

The article can be accessed online on www.ijpsr.com

DOI link: http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1670-76

Thus, there is a growing interest in finding natural substances exhibiting antioxidant properties to substitute the synthetic ones, which were restricted due to their side effects. Several previous studies have reported that medicinal plants contain a large variety of free radical scavenging molecules such as phenols, anthocyanins, tannins, alkaloid and saponins which can play a significant role in the prevention and protection against many diseases [2].

Vitex agnus-castus L. (VAC) commonly known as Chaste tree [3] or Chasteberry [4], is a small tree from *Verbenaceae* family, native to the Mediterranean

and Western Asia. It is now cultivated all over the world, including the Southern part of the United States [5]. Traditionally, this plant, particularly its fruit extract, has been used in the treatment of premenstrual syndrome (PMS), abnormal menstrual cycles, amenorrhea, mastodynia, hyperprolactinemia, premenstrual dysphoric disorder, lactation difficulties, and low fertility [6]. The aromatic leaves are used as a spice [7]. Previous studies on the phytochemical analysis of *V. agnus-castus* L. revealed the presence of essential oils [8], flavonoids, iridoids, and diterpenoids [9]. It was reported that VAC was also used as a diuretic, digestive, anxiolytic and antifungal agent [10]. Besides, different extracts of *Vitex agnus-castus* L. fruits have shown a significant cytotoxic, DNA damaging and apoptotic effects in MCF-7 human breast cancer cells [11]. A recent study has demonstrated that the essential oils of fruits and leaves of *Vitex agnus-castus* have strong antibacterial activity against some bacteria causing nosocomial infections in the neonatal and intensive care rooms at the university hospital center of Fez, Morocco [12]. This work aims to evaluate, for the first time, the antioxidant activity, flavonoids and total phenolic content of extracts of *Vitex agnus-castus* leaves from the Moroccan Middle Atlas.

MATERIALS AND METHODS:

Plants Materials: Plant material (leaves of *Vitex agnus-castus)* was collected during June October in 2016 (flowering period) in Khenifra. Identification was confirmed by Professor Amina Bari, botanist (Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fes, Morocco). The material was dried for 7 to 10 days in the shade temperature and then ground.

Extract preparation: Ethanol (Etoh. E.), methanol (Metoh. E.), water (water E.) and ethyl acetate (Ethy Ac. E.) extractions were performed at the ratio of 10% (w/v) for 48 h under agitation for plant powder. Then the mixture was filtered through a filter paper (Whatman no. 1) and concentrated in vacuo at 45 °C, then stored at 4 °C for further use.

Phytochemical Analysis: Phytochemical tests of the extracts were carried out qualitatively for the presence of alkaloids, saponins, tannins, flavonoids anthraquinones, terpenes, according to the methods described by Edeoga *et al*., with slight modifications [13].

Total Antioxidant Capacity: The total antioxidant capacity of the extract was evaluated by the phosphomolybdenum method as described by Pavithra *et al*., with minor modifications [14]. Briefly, a volume of 25 µL extract was added to 1 mL of reagent solution (0.6 mol/L sulphuric acid, 28 mmol/L sodium phosphate and 4 mmol/L ammonium molybdate). The mixtures were incubated at 95 °C for 90 min and then cooled to room temperature. The absorbance was measured at 695 nm. The total antioxidant activity was expressed as the number of equivalence of ascorbic acid (mg AAE/g DW).

Determination of Total Phenols Content (TPC): Total phenol content of the extract was determined by the Folin-Ciocalteu method described by Jadouali *et al*., with slight modifications [15]. The 0.5 ml of a known dilution of the extract and 2 ml of 7% sodium carbonate solution were added to 2.5 ml of 10% (v/v) Folin - Ciocalteau reagent. The absorbance was read at 760 nm (Jasco v-530) after 2 h of reaction at room temperature in the dark. Gallic acid was used as a standard for the construction of calibration curve **Fig. 1**. Total phenols content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram dry weight (mg GAE/g DW).

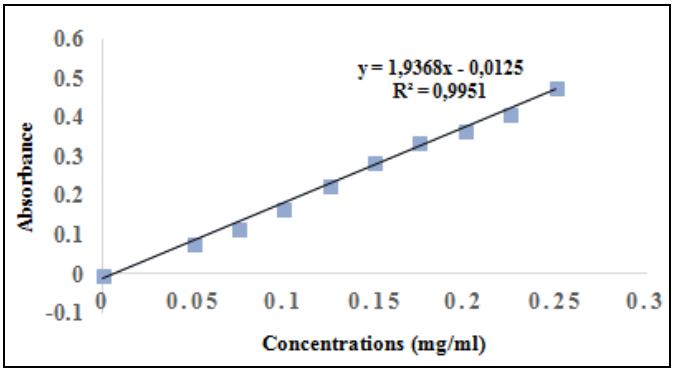


FIG. 1: GALLIC ACID STANDARD CUVE FOR THE CALCULATION OF TOTAL PHENOLS CONTENT

Determination of Total Flavonoid Content: Total flavonoid content of extracts was measured by the aluminum chloride colorimetric assay [16]. 1 ml of sample or rutin standard solution was added to a 10 mL volumetric flask containing 4 ml of distilled water. To the flask 0.30 ml 5% $NaNO_2$ was added, after five minutes 0.3 ml 10% $AlCl_3$ was added to

react for 6 min. After that, 2 ml IM NaOH was added and the total was made up to 10 ml with distilled water. The solution was mixed, and absorbance was measured against the blank at 510 nm (Jasco v-530). Rutin was used as a standard for the construction of calibration curve **Fig. 2**. Total flavonoid content was expressed as mg Rutin equivalents per gram dry weight of each extract (mg RE/g DW).

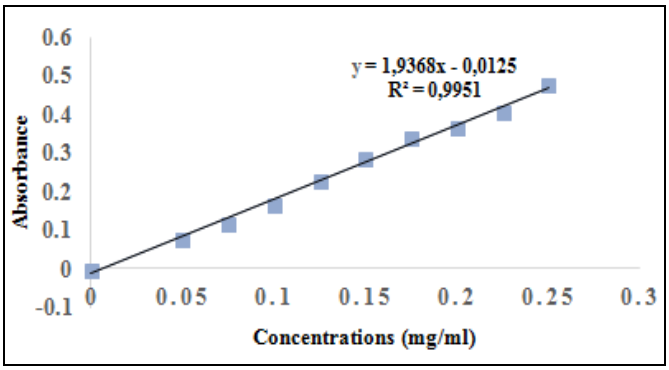


FIG. 2: RUTIN STANDARD CUVE FOR THE CALCULATION OF TOTAL FLAVONOIDS CONTENT

DPPH Radical Scavenging Assay: The radical scavenging activity of the VAC extracts against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical was measured using the method of Adebiyi *et al*., with minor modifications [17]. 0.1 ml of various concentrations of the extracts or standard was added to 1.5 ml of an ethanolic solution containing 0.1 mmol of DPPH (2, 2-diphenyl-1picryl-hydroxyl). The absorbance of the mixture was measured at 517 nm with a spectrophotometer (Jasco V-530) after 30 min of incubation time at room temperature in the dark. The percentage of inhibition was calculated by the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_C - A_S)/A_C] \times 100$$

Where A_C is the absorbance of the control, and A_S is the absorbance of the sample. BHT served as positive control. The IC_{50} values were calculated as the concentration of extract providing 50% inhibition of DPPH radical.

Reducing Power Assay: The reducing capacity of the tested extracts was determined by the procedure of Oyaizu [18]. 200 µl of the extract was mixed with 500µl of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 500 µl of potassium ferricyanide $[K_3Fe(CN)_6]$ 1%. The obtained solution was incubated at 50 °C for 20 min. The mixture was acidified with 500 µl of Trichloroacetic (TCA) 10% which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with 500 µl of distilled water and 100 µl of $FeCl_3$ (0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm (Jasco v-530). Quercetin was used as a standard. The results were expressed as IC_{50} (mg/ml). IC_{50} (concentration corresponding 0.5 of absorbance) was calculated by plotting absorbance against the corresponding concentration.

Statistical Analysis: All tests were performed in triplicate and results were expressed as mean ± SD. The results were compared by one-way ANOVA followed by Tuckey-test, using the GraphPad Prism 5 (Microsoft Software). Differences at $P<0.05$ were considered to be significant. Pearson correlation was performed using the same test.

RESULTS AND DISCUSSION:

Phytochemical Analysis: Results of phytochemical screening of all the extracts are shown in **Table 1**. Flavonoids and phenols are present in all extracts, while saponins were present in water and ethanol extracts and absent in ethyl acetate and methanol extract. Alkaloids and terpenes were not detected in water and ethanol extract. Anthraquinones were observed only in the ethanol extract. These bioactive components have been shown to possess interesting biological activities such as antioxidant, antidiabetic, antibacterial, anti-inflammatory and many others [19, 20, 21].

TABLE 1: PHYTOCHEMICAL SCREENING TEST RESULTS

Tests	Extracts			
	Methanol	Ethyl acetate	Water	Ethanol
Alkaloids	-	+	-	-
Tanins	+	+	-	-
Anthraquinone	-	-	-	+
Terpenes	+	+	-	-
Saponins	-	-	+	+
Flavonoids	+	+	+	+
Phenols	+	+	+	+

+ (present); - (Absent)

Extraction Yield and Total Antioxidant Capacity: The yields of extracts obtained from *Vitex agnus-castus* leaves using various solvents are shown in **Table 2**. Water gives the higher extraction yield with 24%, followed by methanol

(22.44%), ethanol (10.02%) and ethyl acetate (6.12%). Our results are in agreement with those obtained by saglam *et al*., who reported that water gives the highest yield extract (38.06%) when compared with ethanol and n-hexane extracts of *vitex agnus-castus* leaves and fruits [22]. This observation is also supported by results obtained from the extraction from *Limnophila aromatica* where the polar solvents, methanol, and water, gave the best extraction yields [23]. It has been reported that the efficiency of the extraction depends on many parameters, including the extraction time and temperature, the volume and type of the solvents used [24, 25]. The total antioxidant capacity assay showed that the ethanol extract had the most important activity with value 357.66 ± 5.08 mg equivalent to ascorbic acid/g DW. The water extract had a weak antioxidant activity.

TABLE 2: EXTRACTION YIELD AND TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF DIFFERENT EXTRACTS OF *VITEX AGNUS-CASTUS* LEAVES

Extract	Yield (%)	CAT (mg Eq A.As/gDW)
Ethanol	10.02	357.66 ± 5.08^{a}
Methanol	22.44	194 ± 1.41^{b}
Ethyl acetate	6.12	138 ± 2.04^{c}
Water	24	33.6 ± 1.16^{d}

Data are expressed as mean ± SEM of tree measurements. Different letters symbolized significant differences (P<0.05) by mean of the non-parametric Turkey-test.

Determination of Total Phenols Content: Most antioxidant activities from plant sources are derived from phenolic compounds [26]. As we can see from **Fig. 3**, the amount of TPC of VAC extracts, measured by Folin-Ciocalteu method varied significantly (P<0.05) from 10 ± 0.2 to 53.33 ± 1.38 mg GAE/g DW. Pure ethanol produced extracts with the highest levels of total phenols content. Our finding is supported by Latoui *et al*., who demonstrated that ethanol behaved as a better solvent than methanol to extract from fruits of VAC the same classes of compounds whose concentrations in the extract reached after only 30 min maximum values (19.2 mg CAE/gDB TP and 5.4 mg CAE/Gdb OD) about 3-5-fold those obtained with methanol [27]. Furthermore, several studies have shown that the amount of polyphenolics in plants depends on biological factors (genotype, organ, and ontogeny), as well as edaphic, and environmental (temperature, salinity, water stress and light intensity) conditions.

Besides, the solubility of phenolic compounds is governed by the type of solvent used, the degree of polymerization of phenolics, and their interaction[28].

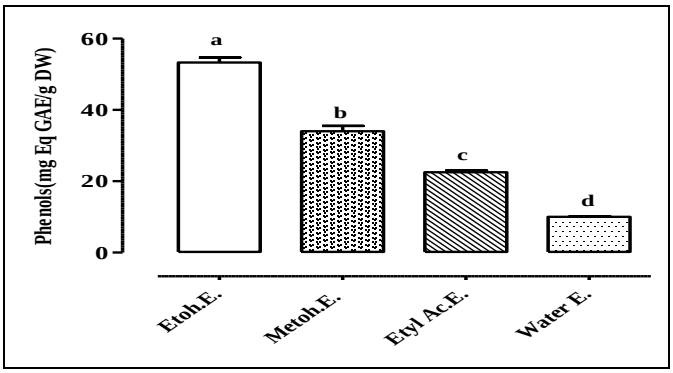


FIG. 3: PHENOLS CONTENT OF DIFFERENT EXTRACTS OF *VITEX AGNUS-CASTUS* LEAVES
Different letters symbolized significant differences (P<0.05) by mean of the nonparametric Turkey-test

Determination of Total Flavonoid Content: The total flavonoid content was expressed as mg Rutin equivalents per gram dry weight of each extract (mg RE/g DW). Results can be seen from **Fig. 4**, the concentration of flavonoids in VAC extracts have ranged from 13.66 ± 0.33 to 95.33 ± 6.16 mg RE/g DW. The ethanol extract contains the highest content of flavonoids. The lowest flavonoids content is obtained in ethyl acetate and water extract. The concentration of flavonoids in plant extracts depends on the polarity of solvents used in the extract preparation [29]. According to work performed by Latoui *et al*., the methanolic extract of VAC leaves from Tunisia contains 19.4 mg Catechin Equivalent/g dry biomass, which is below that found in the present study (48.66 ± 5.33 mg RE/g DW) [27]. Our results have shown the richness of the VAC leaves for these bioactive molecules.

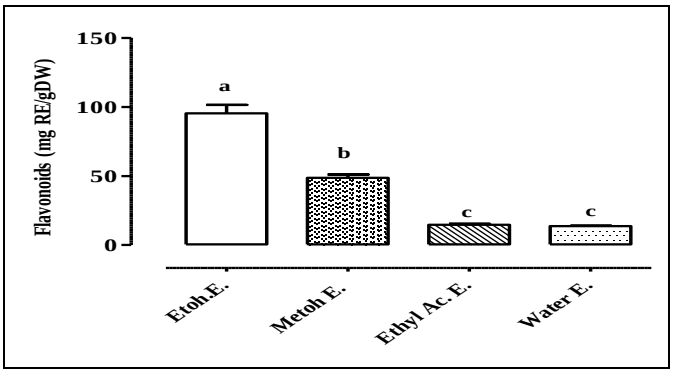


FIG. 4: FLAVONOIDS CONTENT OF DIFFERENT EXTRACTS OF *VITEX AGNUS CASTUS* LEAVES.
Different letters symbolized significant differences (P<0.05) by mean of the nonparametric Turkey-test.

Antioxidant Activities:

DPPH Radical Scavenging Activity: Antioxidant activity of *V. agnus-castus* extracts has been determined by two different test systems namely DPPH and reducing power (FRAP). Results are shown in **Table 3**, from which it can be observed that all the extracts possess radical scavenging potential. Ethanol has proved to be the most active of the extracts with (IC_{50} = 0.53 ± 0.006 mg/ml), while the water extract was the least (IC_{50} = 1.01 ± 0.019 mg/ml). None of the samples evaluated have shown activity as strong as the synthetic antioxidant BHT (0.10 ± 0.001 mg/ml).

An extract is considered to be active against free radicals if IC_{50} < 5 mg/ml [30]. All our extracts have IC_{50} values of less than 5 mg/ml. Therefore, all the extracts for the solvents used are a possible good source of antioxidants. Also, we compared our results with an early report from Turkey, the antioxidant activity of methanolic extract of VAC fruits and leaves collected from Antalya was investigated by DPPH assay, methanol extracts of both leaves and fruits were found to possess strong antioxidant activity [31]. Our data are supported by this result, the methanol extract of Moroccan leaves of VAC exhibit a good antioxidant activity with an IC_{50} value of 0.66 ± 0.012 mg/ml.

TABLE 3: ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *VITEX AGNUS CASTUS* EXTRACTS, REDUCING CAPACITY (FRAP TEST) AND RADICAL SCAVENGING ACTIVITY (DPPH TEST) EXPRESSED IN IC_{50} (mg/ml)

	DPPH	FRAP
Ethanol	0.53 ± 0.006^{b}	0.63 ± 0.004^{c}
Methanol	0.66 ± 0.012^{b}	0.44 ± 0.011^{b}
Ethyl Acetate	0.78 ± 0.020^{c}	0.98 ± 0.016^{d}
Water	1.01 ± 0.019^{d}	2.02 ± 0.202^{e}
BHT	0.10 ± 0.001^{a}	0.12 ± 0.004^{a}

Data are the mean of three measurements ± SEM. In the column, Different letters symbolized significant difference (P<0.05) by mean of the nonparametric Turkey-test.

Reducing Power Activity: Regarding the reducing power assay, the strongest activity is exhibited by the methanol extract with (IC_{50} = 0.44 ± 0.011 mg/ml), followed by ethanol and ethyl acetate. However, all extracts are less effective than the synthetic antioxidant BHT.

Correlation of Antioxidant Activities with Flavonoids and Phenols Content: The correlation coefficients between flavonoids, phenols compounds and antioxidant activities of the four extract are shown in **Table 3**. Based on these results, it appears that there is a very strong positive correlation between the total antioxidant activity of the extracts and their content of phenols and flavonoids (P<0.05). Indeed, the high correlation between phenols content and antioxidant activity is well documented [32, 33]. In previous studies, some phenolics were analyzed, and results demonstrated that especially casticin, caffeic acid and chlorogenic acid had been found in high amount in *Vitex agnus-castus* as antioxidant agents [34]. Furthermore, Vitexin was determined in a significant amount in the leaves, as one of the essential antioxidant constituents of *Vitex agnus-castus* [31]. In this study, we have noticed a low correlation in absolute value between phenols and flavonoids in plant extracts and reducing power activity. According to Yen *et al*., the reducing power is associated with some anthraquinones [35]. However, just one of our extract contains anthraquinones.

TABLE 4: PEARSON CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES

Antioxidant activities	Flavonoids	Phenols
CAT	0.95	0.99
DPPH	-0.87	-0.96
FRAP	-0.62	-0.63

CONCLUSION: In the current work, the total phenols content, total flavonoids content, and antioxidant activity have been investigated in the first time for Moroccan *Vitex agnus-castus*. The highest total phenolic and flavonoid contents are obtained from the ethanol extract of VAC leaves. Ethanol and methanol extracts have exhibited an interesting antioxidant activity. Based on these results, it could be concluded that *Vitex agnus-castus* is a new and inexpensive natural source of antioxidant substances which can combat oxidant damage and prevent pathogenesis of many diseases.

ACKNOWLEDGEMENT: The authors are profoundly thankful to the Department of Biology, of University Sidi Mohamed Ben Abdellah for providing all the necessary facilities to carry out this work.

CONFLICT OF INTEREST: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES:

1. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ and Valko M: Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. Trends in Pharmacological Sciences 2017; 38(7): 592-607.
2. Sagbo IJ, Afolayan AJ and Bradley G: Antioxidant, antibacterial and phytochemical properties of two medicinal plants against the wound-infecting bacteria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2017; 7(9): 817-825.
3. Yushchyshena O and Tsurkan O: Phenolic compounds content in *Vitex agnus-castus* L. and *V. cannabifolia* Sieb. growing in Ukraine. Journal of Medicinal Plants Studies 2014; 2(5): 36-40.
4. Šošić-Jurjević B, Ajdžanović V, Filipović B, Trifunovic S, Jaric I, Ristic N and Milosevi´c V: Functional morphology of pituitary-thyroid and -adrenocortical axes in middle-aged male rats treated with *Vitex agnus castus* essential oil. Acta Histochemica 2016; 118: 736-745.
5. Habbab A, Sekkoum K, Belboukhari N, Cheriti A and Aboul-Enein HY: Essential oil chemical composition of *Vitex agnus-castus* L. from Southern-West Algeria and its antimicrobial activity. Current Bioactive Compounds 2016; 12: 51-60.
6. Ahangarpour A, Najimi SA and Farbood Y: Effects of *Vitex agnus-castus* fruit on sex hormones and antioxidant indices in a D-galactose-induced aging female mouse model. Journal of the Chinese Medical Association 2016; 79: 589-96.
7. Miguel M, Bouchmaaa N, Aazza S, Gaamoussi F and Lyoussi B: Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of Moroccan plants. Fresenius Environmental Bulletin 2014; 23(6): 1-14.
8. Neves RCS and Da Camara CAG: Chemical composition and acaricidal activity of the essential oils from *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) and selected monoterpenes. Anais da Academia Brasileira de Ciencias 2016; 88(3): 1221-1233.
9. Allahtavakoli M, Honari N, Pourabolli I, Arababadi MK, Ghafarian H, Roohbakhsh A, Nadimi AE and Shamsizadeh A: *Vitex agnus-castus* extract improves learning and memory and increases the transcription of estrogen receptor α in the hippocampus of ovariectomized rats. Basic and Clinical Neuroscience 2015; 6(3): 185-192.
10. Katiraee F, Mahmoudi R, Tahapour K , Hamidian G and Emami SJ: Biological properties of *Vitex agnus-castus* essential oil (Phytochemical component, antioxidant and antifungal activity). Biotech Health Sci 2015; 2(2): e26797.
11. Aslantürk SÖ and Çelik AT: Antioxidant activity and anticancer effect of *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) seed extracts on MCF-7 breast cancer cells. Caryologia 2013; 66(3): 257-267.
12. El-Kamari F, Taroq A, El- atki Y, Aouam I, Lyoussi B and Abdellaoui A: Chemical composition of essential oils from *Vitex agnus-castus* L. growing in Morocco and its *in-vitro* antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2018; 11(10): 365-368.
13. Edeoga HO, Okwu DE and Mbaebie BO: Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African Journal of Biotechnology 2005; 4(7); 685-688.
14. Pavithra S and Banu N: Free radical scavenging activity and total antioxidant capacity of tin chlorophyllin from *Morinda citrifolia* L. Research Journal of Pharmacy and Technology 2017; 10(2): 453.
15. Jadouali SM, Atifi H, Bouzoubaa Z, Majourhat K, Gharby S, Achemchem F, Elmoslih A, Laknifli A and Mamouni R: Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan *Crocus sativus* L. petals and leaves. Journal of Materials and Environmental Science 2018; 9(1): 113-118.
16. Rahman MM, Islam MB, Biswas M and Alam AHM: *In-vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. BMC Research Notes 2015; 8: 621.
17. Adebiyi OE, Olayemi FO, Ning-Hua T and Guang-Zhi Z: *In-vitro* antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of Grewia carpinifolia. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 2017; 6(1): 10-14.
18. Oyaizu M: Studies on products of browning reactions : Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutr 1986; 44: 307-315.
19. Teugwa CM, Mejiato PC, Zofou D, Tchinda BT and Boyom FF: Antioxidant and antidiabetic profiles of two African medicinal plants: *Picralima nitida* (Apocynaceae) and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). BMC Complementary and Alternative Medicine 2013; 13(1): 175.
20. Kapewangolo P, Hussein AA and Meyer D: Inhibition of HIV-1 enzymes, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Plectranthus barbatus*. Journal of Ethnopharmacology 2013; 149(1): 184-90.
21. Pandey S: Preliminary phytochemical screening and *in-vitro* antibacterial activity of *Bauhinia variegata* Linn. against human pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2015; 5(2): 123-129.
22. Sağlam H, Pabuçcuoğlu A and Kıvçak B: Antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. extracts. Phytotherapy Research 2007; 21(11): 1059-1060.
23. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, and Ju YH: Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. Journal of Food and Drug Analysis 2014; 22(3): 296-302.
24. Chew KK, Khoo MZ, Ng SY, Thoo YY, Wan Aida WM and Ho CW: Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. International Food Research Journal 2011; 18(4): 1427-1435.
25. Chigayo K, Mojapelo PEL, Mnyakeni-Moleele S and Misihairabgwi JM: Phytochemical and antioxidant properties of different solvent extracts of *Kirkia wilmsii* tubers. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2016; 6(12): 1037-1043.
26. Mahmoudi S, Khali M, Benkhaled A, Benamirouche K and Baiti I: Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2016; 6(3): 239-245.
27. Latoui M, Aliakbarian B, Casazza AA, Seffen M, Converti A and Perego P: Extraction of phenolic compounds from *Vitex agnus-castus* L. Food and Bioproducts Processing 2012; 90: 748-754.
28. Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A and Abdelly C: Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. Comptes Rendus Biologies 2008; 331(11): 865-873.

29. Gao M and Liu CZ: Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2005; 21(8-9): 1461-1463.
30. Abdillah S, Tambunan RM, Farida Y, Sandhiutami NMD and Dewi RM: Phytochemical screening and antimalarial activity of some plants traditionally used in Indonesia. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2015; 5(6): 454-57.
31. Gökbulut A, Özhan O, Karacaoğlu M and Şarer E: Radical scavenging activity and vitexin content of *Vitex agnus-castus* leaves and fruits. Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences 2010; 35: 85-91.
32. Waheed I, Ahmad M, Syed NH and Ashraf R: Investigation of phytochemical and antioxidant properties of methanol extract and fractions of *Ballota limbata* (Lamiaceae). Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 2014; 76(3): 251-256.
33. Złotek U, Mikulska S, Nagajek M and Świeca M: The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. Saudi Journal of Biological Sciences 2016; 23: 628-633.
34. Hoberg E, Meier B and Sticher: Quantitative high performance liquid chromatographic analysis of casticin in the fruits of *Vitex agnus-castus*. Pharmaceutical biology 2001; 39(1): 57-61.
35. Yen GC and Chuang DY: Antioxidant properties of water extracts from *Cassia tora* L. in relation to the degree of roasting. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2000; 48(7): 2760-2765.

How to cite this article:
EL kamari F, Taroq A, EL atki Y, Aouam I, Lyoussi B and Abdellaoui A: Total phenols content, flavonoid concentration and antioxidant activities of leaves extracts of *Vitex agnus-castus* L. growing wild in Morocco. Int J Pharm Sci & Res 2019; 10(4): 1670-76. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1670-76.

All © 2013 are reserved by International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. This Journal licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License.

This article can be downloaded to **Android OS** based mobile. Scan QR Code using Code/Bar Scanner from your mobile. (Scanners are available on Google Play store)