



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Et Ecologie Végétale

قسم : بيولوجيا و ايكولوجيا النبات .

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie et physiologie de la reproduction

Intitulé :

Contribution à une étude phytochimique et une évaluation des activités biopharmacologiques de deux plantes cultivées dans l'Est Algérien

Présenté et soutenu par : **BRIHMAT LINA et DJOUABLIA MAROUA**

Le : 14/07/2019

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : BOUDOUR L. Prof -Université Des Frères Mentouri-Constantine1

Rapporteur : ZEGHAD N. MCB- Université Des Frères Mentouri-Constantine1

Examineurs : KARA K. MCA- Université Des Frères Mentouri-Constantine1

Année universitaire
2018 - 2019

Remerciements

Avant tout propos, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donnée la capacité et la volonté jusqu'au bout pour réaliser ce travail.

Nous remercions notre encadreur Madame ZEGAHD Nadia, Maître de Conférences B à l'université des frères Mentouri-Constantine 1, pour avoir encadré et dirigé ce travail, sa disponibilité, ses précieux conseils, la confiance qu'elle nous a accordé et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce travail

Nous remercions Madame BOUDOUR LEILA, Professeur à l'université des frères Mentouri-Constantine 1, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions également Madame KARA KARIMA, Maître de Conférences A à l'université des frères Mentouri-Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

A tous mes enseignants qui m'ont initié aux valeurs authentiques, en Signe d'un profond respect et d'un profond amour. Finalement, nos profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés et Soutenue de près ou de loin.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Avant toute chose je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage pour réaliser ce travail.

A tous les personnes qui m'encouragent toujours aux moments difficiles

A mes très chers parents qui m'ont soutenue et encouragé durant toute la période de mes études et à qui je souhaite une longue et heureuse vie.

A mes chers frères : Bilel, Maïdi, Ahmed et Mohamed Lotfi

A ma chère sœur : Manel

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes cotés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études

A mon binôme LYNA, j'ai partagé avec elle les joies et les difficultés au suivi de notre travail

Enfin, à tous ceux qui m'aime

Maroua

Dédicaces

*Je rends grâce, à mon dieu de m'avoir donné la force, et la
volonté d'être patiente dans mes études.*

Je dédie ce modeste travail

*A mes très chers parents, symboles de courage et de qui ont
consacré et sacrifié leurs vies pour mon bien être.*

A mon cher mari

A Mon cher frère

A Mes chères sœurs

A ma belle famille

Et Ma copine et ma binôme : Marwa

A tous ceux qui me sont chers.

Lina

Liste des abréviations

DPPH : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAG: Equivalent Acide Gallique

EQ: Equivalent Quercétine

IC₅₀: Concentration Inhibitrice à 50 %

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

°C : Degré celsius

g : gramme

PT : phénols totaux

FT : flavonoïdes totaux

FLT : flavonols

FeCl₃ : chlorure de fer(III)

UV-Vis : Ultra violet Visible

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur les plantes étudiées

<i>1/ Calendula officinalis L</i>	09
1-1/ Description botanique	09
1-2/ Classification systématique	09
1-3 / Distribution géographique	10
1-4/ composition chimique	10
1-5/Propriétés médicinales de <i>Calendula officinalis L</i>	11
<i>2/ Thapsia garganica L</i>	12
2-1/ Description botanique.....	12
2-2/Classification systématique.....	12
2-3/ Distribution géographique.....	13
2-4/composition chimique.....	13
2-5/ Propriétés médicinales de <i>Thapsia garganica L</i>	14
 <i>Chapitre II : Synthèse bibliographique sur les composés phénoliques</i>	
1/ Introduction.....	15
2/- Classification.....	16

2-1/ Les acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3).....	16
2-2/ Les flavonoïdes (C6-C3-C6).....	17
2-3/ Les Tannins.....	20
2-3-1/ Tanins hydrolysables.....	20
2-3-2/ Tanins condensés (C6-C3-C6) _n	21
2-4/ Les lignines (C6-C3) _n	22
3/Biosynthèse des composés phénoliques.....	22
3-1/Voie de Shikimate.....	22
3-2/Voie d'acétate malonate	26
3-3/ Voie mixte de biosynthèse des flavonoïdes.....	27
4/ Propriétés biologiques et pharmacologiques des composés phénoliques.....	29
5/ Activités biologiques des composés phénoliques.....	30
5.1/ Activité antioxydante	30
5.1.1/ Généralités.....	30
5.1.2/ Stress oxydant.....	30
5.1.3/ Les antioxydants.....	31
5.1.4/ Différents systèmes d'antioxydant.....	31
5.1.4.1/ Antioxydants enzymatiques.....	31
A/ Catalase.....	31
B/ Glutathion peroxydase(GPx).....	31
C/ Superoxyde dismutase (SOD).....	31
5.1.4.2/ Antioxydants non enzymatiques.....	31

A/ Antioxydants non enzymatiques exogènes	32
B/ Antioxydants non enzymatiques endogènes.....	32
5.2/ Activité cicatrisante.....	32
Partie II : Matériel et méthodes	
1/ Matériel végétal.....	34
2/ Méthode d'extraction.....	34
3/ Caractérisation chimique des extraits.....	35
3.1/ Analyses qualitatives par screening phytochimique.....	35
3.1.1/ Quinones libre.....	35
3.1.2/ Alcaloïdes.....	35
3.1.3/ Tanins.....	35
3.1.4/ Tanins vrais.....	36
3.1.5/ Saponines	36
3.1.6/ Stérols et polyterpènes.....	36
3.1.7/ Flavonoïdes.....	36
3.1.8/ Sucres Réducteurs.....	37
3.2/Analyses quantitatives par spectrophotométrie (UV-Visible).....	37
3.2.1/ Dosage des phénols totaux (PT).....	37
3-2-2/ Dosage des flavonoïdes totaux	38
3-2-3/Dosage des flavonols totaux	38
4/ Evaluation des activités biologiques.....	38
4.1/ Activité antioxydante au DPPH.....	38

4.2/ Activité cicatrisante (test d'excision).....	40
---	----

Partie III : Résultats et discussion

1/Caractérisation chimique des extraits.....	41
--	----

1.1/ Les résultats du screening phytochimique.....	41
--	----

1.2 / Estimation des contenus en composés phénoliques.....	42
--	----

3/ Evaluation des activités biologiques.....	43
--	----

3-1/ Activité antioxydante au DPPH.....	43
---	----

3.2/ Evaluation de l'effet cicatrisant de l'extrait de <i>Calendula officinalis</i> L.....	45
--	----

Conclusion générale

Références bibliographique

Annexe

Résumés

Liste des tableaux

Tableau I : Classification systématique de <i>Calendula officinalis</i> L.....	10
Tableau II : Classification systématique de <i>Thapsia garganica</i> L.....	13
Tableau III : Principaux dérivés d'acide benzoïque.....	16
Tableau IV : Principaux dérivés d'acide cinnamique.....	17
Tableau V : Principaux dérivés de coumarines.....	17
Tableau VI : Principales classes des flavonoïdes.....	18
Tableau VII : Résultats du criblage phytochimique des extraits.....	41
Tableau VIII : Estimation des contenus en composés phénoliques dans les extraits...	42
Tableau IX : Tableau : Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision traitées et non traitées (contrôle) chez le lapin.....	46
Tableau X : Evolution de la contraction des plaies d'excision chez le lapin traité et non traité.....	47

Liste des figures

Figure 1 : Présentation de <i>Calendula officinalis L</i>	09
Figure 2 : Présentation de <i>Thapsia garganica L</i>	12
Figure 3 : Structure chimique des composés phénoliques.....	15
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.....	18
Figure 5 : Structure des tannins hydrolysable (cas d'acide gallique).....	21
Figure 6 : Structure des tanins condensés (cas de tanins condensés à base de flavan-3-ols).....	21
Figure 7 : Structure de lignane.....	22
Figure 08 : Voie de biosynthèse de Shikimate.....	23
Figure 09 : Voie de biosynthèse de phénylpropanoïde.....	24
Figure 10 : Représentation simplifiée du métabolisme des phénylpropanoïdes.....	25
Figure 11 : Condensation de la voie d'acide shikimique et de malonate.....	26
Figure 12 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	28
Figure 13 : Poudres des fleurs de <i>Calendula officinalis L</i> et des racines de <i>Thapsia garganica L</i>	34
Figure 14 : Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	39
Figure 15 : Teneurs en composés phénoliques dans les extraits.....	42
Figure 16 : Evolution du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des extraits	43
Figure 17 : Valeurs des IC50 des extraits et de Trolox.....	44

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales restent toujours le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997).

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie (Bahorun *et al.*, 1996).

L'Algérie par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimé à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (Hanifi, 1991).

Dans ce contexte, le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une étude phytochimique permettant de déterminer qualitativement et quantitativement certains groupes chimiques bioactifs contenus dans des extraits hydroalcooliques de deux plantes médicinales d'intérêt biopharmacologique; *Calendula officinalis L* et *Thapsia garganica L* cultivées dans l'Est Algérien et une évaluation de leurs activités biologiques et se fixe comme objectif sur :

- Extraction et caractérisation du profil en composés phénoliques des extraits des plantes étudiées.
- Evaluation *in vitro* du potentiel antioxydant des extraits des plantes étudiées par l'utilisation d'un modèle expérimental (test DPPH).
- Evaluation *in vivo* de l'effet cicatrisant, de extraits hydroalcoolique de *Calendula Officinalis L*, en raison de sa forte teneur en composés phénoliques.

Le présent travail est organisé comme suite :

La première partie du manuscrit traite des données bibliographiques regroupant dans un premier chapitre les aspects botaniques, taxonomiques et pharmacologiques sur les espèces étudiées.

Un deuxième chapitre s'intéresse aux composés phénoliques, leurs classifications, leurs biosynthèses, et propriétés pharmacologiques.

La deuxième partie est organisée en deux sous parties ; la première sous partie présente le matériel et les méthodes, alors que la seconde sous partie englobe les principaux résultats obtenus et leur discussion.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui permettra de dégager quelques perspectives de prolongement à ce travail, les références bibliographiques et une partie annexe.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur les plantes étudiées

1/ *Calendula officinalis* L

1-1/ Description botanique

Calendula officinalis L est une plante herbacée annuelle, appartenant à la famille des Asteracées mesurant de 30 à 50 cm de haut. La tige est anguleuse, ramifiée, velue. Les fleurs sont orange vif, groupées en capitulés, larges de 3 à 7cm. Elles sont solitaires à l'extrémité des tiges. On retrouve des fleurs tubuleuses et hermaphrodites au centre du capitule, et des fleurs ligulées femelles à la périphérie. Les fruits sont des akènes épineux, presque annulaires. L'odeur de *Calendula officinalis* L est faible, caractéristique, puissante a l'état frais. La saveur est légèrement amère est salée (Marjorie, 2003).



Figure 1 : Présentation de *Calendula officinalis* L (Ghédira et Goetz, 2016).

1-2/ Position systématique

Les Astéracées, un des taxons des plantes à fleurs, sont la deuxième famille en importance de la division Tracheophyta, avec 1100 genres et plus de 2000 espèces reconnues, dont la position systématiques est la suivante (tableau I) :

Tableau I : Classification systématique de *Calendula officinalis* L. (APG III., 2009).

Noms communs : souci, souci officinal, souci des jardins

Arabe : ادريون (adharioun)

Règne	Plantae
Clade	Angiosperme
Clade	Dicotylédone vraies
Clade	Noyau des Dicotylédones vraies
Clade	Astéridées
Clade	Composées
Ordre	<u>Asterales</u>
Famille	Asteraceae
Sous famille	Asteroideae
Genre	<i>Calendula</i>
Espèce	<i>Calendula officinalis</i> L.

1-3 / Distribution géographique

C'est une plante cultivée dans toutes les parties du monde. Son origine principale se trouve dans les Balkans, l'Europe du Sud, de l'Est et en particulier en Hongrie. On l'importe de Hongrie, de Pologne et d'Égypte (Wichtl et Anton, 2009). D'après Quezel et Santa (1962) La plante *Calendula officinalis* L est distribuée essentiellement dans toute l'Algérie.

1-4/ composition chimique

La composition chimique du *Calendula officinalis* L. est très variée.

- Huiles essentielles (0,12% dans les pétales et 0,4% dans les inflorescences) : composant majoritaire alpha-cadinol (25 %), T-cadinol, alpha-ionones et bêta-ionones, dihydroactinidiolide
- Flavonoides (0,88% dans les pétales, 0,33% dans les inflorescences) : (quercétol et isorhamnétol)
- Saponines triterpéniques
- Alcools triterpéniques, libres et estérifiés (monols, diols, triols)
- Polysaccharides (15%) solubles dans l'eau
- Caroténoïdes et xanthophylles (0,017 à 0,078%)
- Divers : Coumarines : scopolétine, umbelliféone et esculétine, Stérols, Mucilage, Résine Tanins, Dérivés polyacétyléniques, Acides phénoliques : acides chlorogénique, cafeique, coumarique, vanillique α -tocopherol Loliolide (Ghédira et Goetz, 2016).

1-5/Propriétés médicinales de *Calendula officinalis* L

Calendula officinalis L. est une plante très utilisée dans la pharmacopée, les fleurs sont la partie de la plante les plus utilisées, parmi les propriétés essentielles de cette plante on cite :

- Propriétés Anti-inflammatoire, par voie orale (Preethi *et al.*, 2009) ;
- Propriétés antispasmodiques par voie locale (Della Loggia *et al.*, 1994) ;
- Propriétés astringentes, antihémorragique, cicatrisantes (Matthew et Leach, 2008), anti-œdémateuses (Zitterl-Eglseer *et al.*, 1997) ;
- Propriétés de stimulation de la formation des granulocytes et la phagocytose (Muley *et al.*, 2009) ;
- Propriétés antiasthmatiques, antihistaminiques, anticholinergiques (Sagar R *et al.*, 2014) ;
- Propriétés de diminution de la phase d'épithélisation des plaies et augmentation de la synthèse du collagène, et diminution du stress oxydatif au niveau de la peau (polyphénols, flavonoïdes, rutine, narcissine) (Fonseca *et al.*, 2010) ;
- Propriétés fongicides, antibactériennes, antivirales ;
- Propriétés cytotoxiques et antitumorales (Jiménez-Medina *et al.*, 2006) ;
- Propriétés antimutagène (saponosides) (Elias *et al.*, 1990) ;

- Effet anti-HIV potentiel (Kalvatchev *et al.*, 1997) ;
- Prévention des radiodermites et dermatites aiguës après irradiation pour cancer du sein (Pommier *et al.*, 2004).

2/ *Thapsia garganica* L.

2-1/ Description botanique

Thapsia garganica L. est une Plante vivace, à tige florifère dressée, peu ramifiée, atteignant environ 1,50 m de haut. Elle possède de grandes feuilles en touffes, très découpées, à division linéaires pourvues d'un pétiole en gaine à la base, les supérieures sont réduits à la gaine épaisse, d'un vert grisâtre comme la tige. Les fleurs sont petites, jaunes disposées en grandes ombelles presque sphériques. Les fruits sont ovales, atteignent plus de 2 cm de long, largement ailés. Les racines sont en forme de rhizomes . La floraison a lieu entre avril et juillet (Meftah *et al.*, 2001).



Figure 2 : Présentation de *Thapsia garganica* L (Berri, 2011).

2-2/Position systématique

La systématique botanique permet de classer *Thapsia garganica* L. parmi les systèmes du règne végétal en se référant à la classification de (APG III ,2009).

Nom commun : le drias (*Thapsia garganica*)

Arab : بونافاع Bounafaa

Tableau II : Classification systématique de *Thapsia garganica* L. (APG III ,2009).

Règne	Plantea
Clade	Angiosperme
Clade	Dicotyléodone
Clade	Dicotyléodone vrai
Clade	Astéridées
Clade	Campanulidées
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Sous famille	Apioideae
Genre	<i>Thapsia</i>
Espèce	<i>Thapsia garganica</i> L.

2-3/ Distribution géographique

Thapsia garganica L. est présente au Maroc, en Algérie, en Tunisie et en Lybie (Dobignard et Chatelain, 2011), mais aussi en Turquie, en Espagne, au Portugal, en Italie et en Grèce (Hand, 2011). Dans la région de l'Achach, au Maroc, elle apprécie les clairières forestières, les pâturages sablonneux et rocaillieux, les steppes, dans la plaine et les basses montagnes (Bammi et Douira, 2004).

2-4/composition chimique

La composition chimique de *Thapsia garganica L.* est essentiellement présentée sous forme de :

- Esters de phénylpropanoïdes, connus sous le nom de neohelmannthicine (Liu *et al.*, 2006) ;
- Composés terpéniques tels que des lactones sesquiterpéniques (Drew *et al.*, 2009) ;
- Composés phénoliques d'acide gallique et composés phénoliques totaux tels que les dérivés de l'acide hydroxycinnamique et les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque, les flavonoïdes comme la quercétine (Djeridane *et al.*, 2007).

2-5/ Propriétés médicinales de *Thapsia garganica L.*

- *Thapsia garganica L.* a été utilisé dans la médecine traditionnelle européenne et arabe pour le traitement des affections pulmonaires, les rhumes et le soulagement des douleurs rhumatismales (Gomez, 2007) ;
- *Thapsia garganica L.* était capable d'induire la libération d'histamine ; réponse inflammatoire et promoteur tumoral (Berri, 2011) ;
- La thapsigargine issu de *Thapsia garganica L.* a été utilisée dans le traitement du cancer de la prostate (Gomez, 2007).

Chapitre II : Synthèse bibliographique sur les composés phénoliques

1/ Introduction

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites secondaires le plus large et le plus répandu du règne végétal. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale. Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, allant de simples molécules phénoliques de faible poids moléculaire tels que les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004).

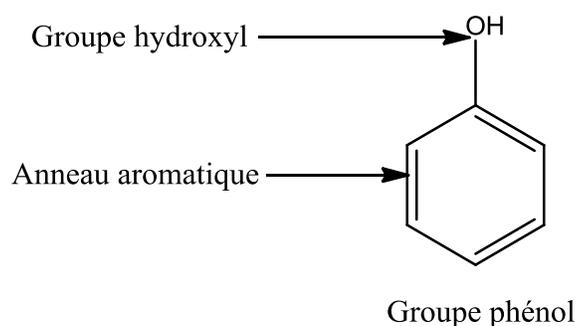


Figure 3 : Structure chimique des composés phénoliques (Manallh, 2012)

Les composés phénoliques sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, tannins, quinones, acides phénoliques et les flavonoïdes, où ces derniers représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (Bruneton, 1993).

2/- Classification

Les métabolites secondaires végétaux peuvent être divisés en trois groupes principaux: (I) les flavonoïdes, les composés polyphénoliques (II) et les terpénoïdes (III) (Crozier *et al.*, 2006).

2-1/ Les acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

Les acides phénoliques sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : anti inflammatoires, antiseptiques urinaire, anti radicalaires, hépato protecteurs, immunostimulants (Bruneton., 1999).

Deux principales classes des acides phénoliques peuvent être distinguées ; les dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1) et les dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3). Les coumarines sont aussi considérées comme des composés phénoliques ayant une structure de base de type benzo-2-pyrone (C6-C3) suite à une cyclisation interne de la chaîne latérale (Zeghad, 2018).

Tableau III : Principaux dérivés d'acide benzoïque (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

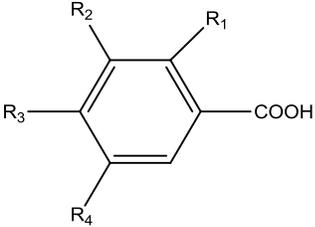
Structure	R1	R2	R3	R4	Composé
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide <i>p</i> hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Tableau IV : Principaux dérivés d'acide cinnamique (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

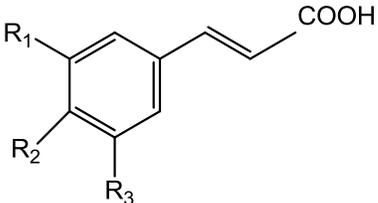
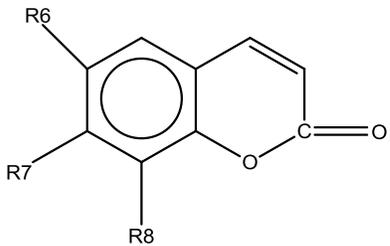
Structure	R1	R2	R3	Composé
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide <i>p</i> coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

Tableau V : Principaux dérivés de coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

Structure	R6	R7	R8	Composé
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH ₃	OH	H	Scopolétole
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

2-2/ Les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆)

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette (C₆-C₃-C₆), provenant du mot latin *flavus* qui signifie jaune. (Bouakaz, 2006). Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits, sont présents en concentrations élevées dans l'épiderme des feuilles et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (Loto, 2011).

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C₂-C₃, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (Yao *et al.*, 2004).

Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C₆-C₃-C₆), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de

carbones liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (Tapas *et al.*, 2008).

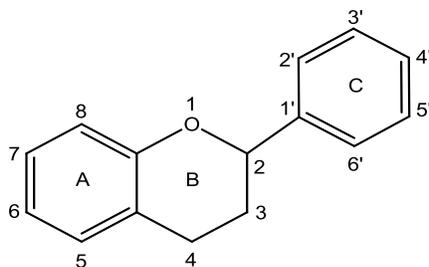
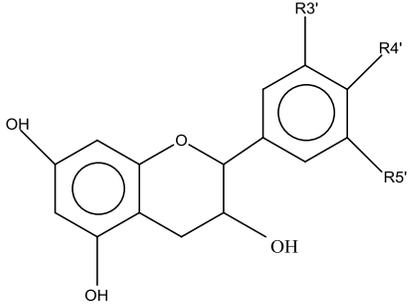
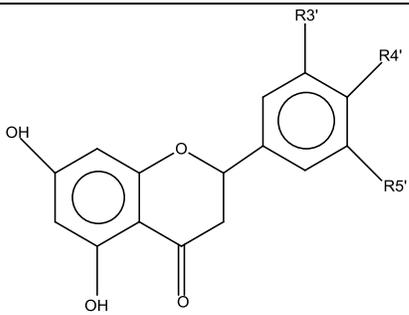
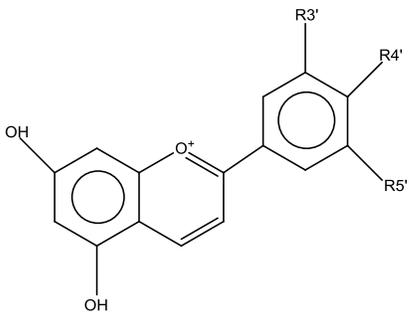


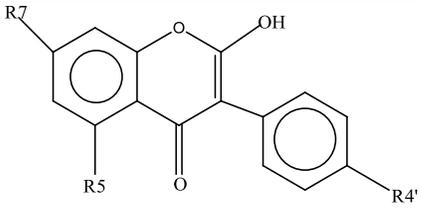
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (Chanvallon *et al.*, 1994).

Les flavonoïdes peuvent être divisés en plusieurs classes notamment les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes (Narayana *et al.*, 2001 ; W-Erdman *et al.*, 2007). Cette classification a été basée sur la nature des substitutions R5 et R7 du cycle A, la nature des groupements R3', R4' et R5' du cycle C ou bien le degré d'oxydation et la diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C (Tableau VI).

Tableau VI : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001 ; W-Erdman *et al.*, 2007).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine

		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R₅	R₇	R_{4'}	

	OH	OH	OH	Genistéine
	H	O-Glu	OH	Diadézine

2-4/ Les Tannins

Les tannins sont des substances polyphénoliques de structure variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles quelquefois combinés aux protéines et aux alcaloïdes (Alignan, 2006). Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés.

2-4-1/ Tanins hydrolysables

Sont des hétéro polymères possédant un noyau central constitué d'un polyol, il s'agit souvent d'un D-glucose. Comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques (Monteiro *et al.*, 2007).

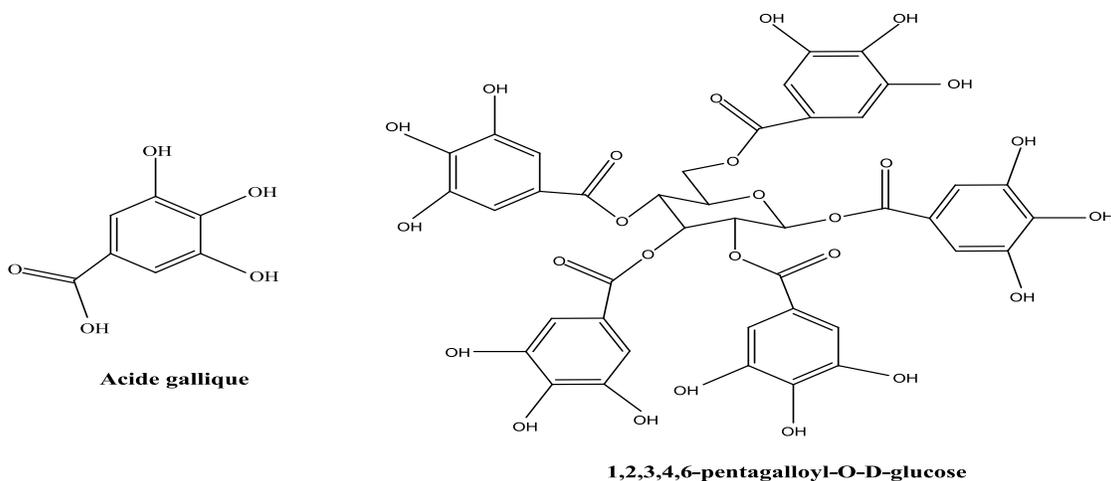


Figure 5 : Structure des tanins hydrolysable (cas d'acide gallique) (Bruneton, 2009).

2-4-2/ Tanins condensés (C6-C3-C6)_n

Contrairement aux tanins hydrolysables, les tanins condensés ne sont pas hydrolysables, ils résultent d'une polymérisation de flavan-3-ols (tanins catéchiques) ou bien de flavan-3,4-diols (proanthocyanidines) liés entre eux souvent par des liaisons de type Carbone-Carbone ; C4-C8 ou bien en C4-C6 des unités adjacentes (proanthocyanidines de type B) (figure 06) mais lorsque la condensation s'effectue entre C2 et C7, dans ce cas les proanthocyanidines sont dits de type A (Bruneton, 2009).

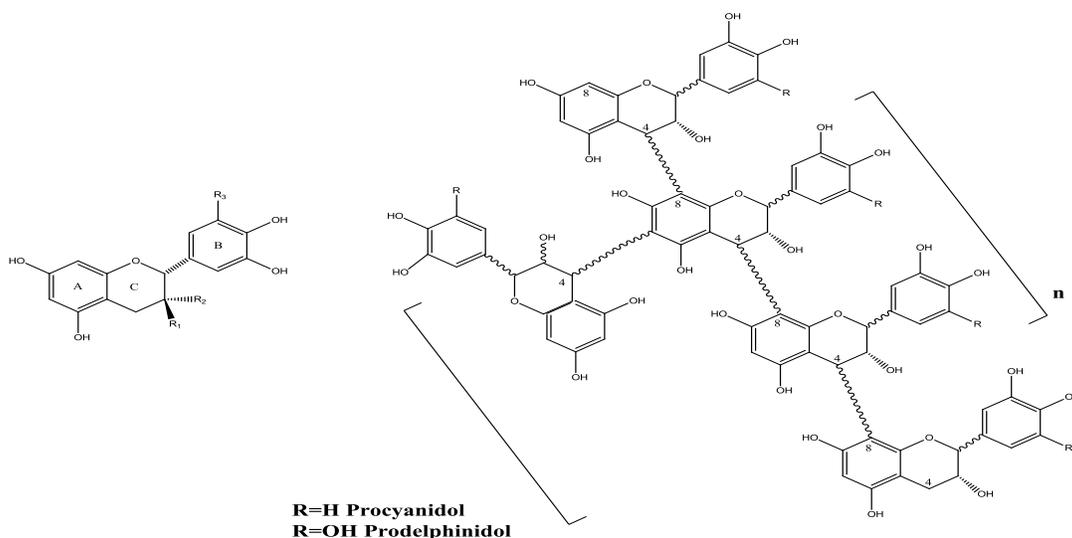


Figure 06 : Structure des tanins condensés (cas de tanins condensés à base de flavan-3-ols) (Bruneton, 2009)

2-5/ Les lignines (C6-C3)_n

Sont un groupe de phytonutriments largement distribués dans le règne végétal (Imran *et al.*, 2015). Ce sont des composés dimères formés par le couplage de deux fragments (C6-C3) monomères dérivées de la voie des phénylpropanoïdes (Gilani & Anderson, 2002). Les lignanes phénoliques se trouvent dans la plupart des plantes riches en fibres, y compris les graines de citrouille, graines de sésame, les céréales, les fruits et les légumes (Imran *et al.*, 2015).

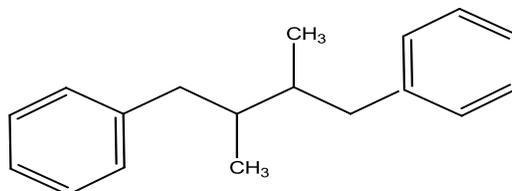


Figure 7 : Structure de lignane (Jost & Jost-Tse, 2016).

3/Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont principalement issus de deux grandes voies métaboliques de biosynthèse notamment la voie de l'acide shikimique, la voie d'acétate malonate ainsi qu'une voie mixte de biosynthèse des flavonoïdes.

3-1/Voie de Shikimate

La voie de shikimate (Floss, 1997) (figure 08) appartient au métabolisme primaire ; C'est la voie de biosynthèse des composés aromatiques notamment les acides aminés aromatiques, parmi lesquels le précurseur du métabolisme des phénylpropanoïdes ; la phénylalanine. La voie de shikimate, appelée également la voie de phénylpropanoïde (Hoffman, 2003 ; Hoffman *et al.*, 2004) (figure12), joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme et conduit à la formation de nombreux composés phénoliques (Kening *et al.*, 1995). La phénylalanine issue de la voie de shikimate marque l'entrée à la voie de phénylalanine suite à sa conversion en acide cinnamique par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) ce qui constitue ainsi le point de départ de la synthèse des principaux métabolites notamment : les acides phénoliques simples, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, des coumarines, des tanins condensés et des polymères de lignines.

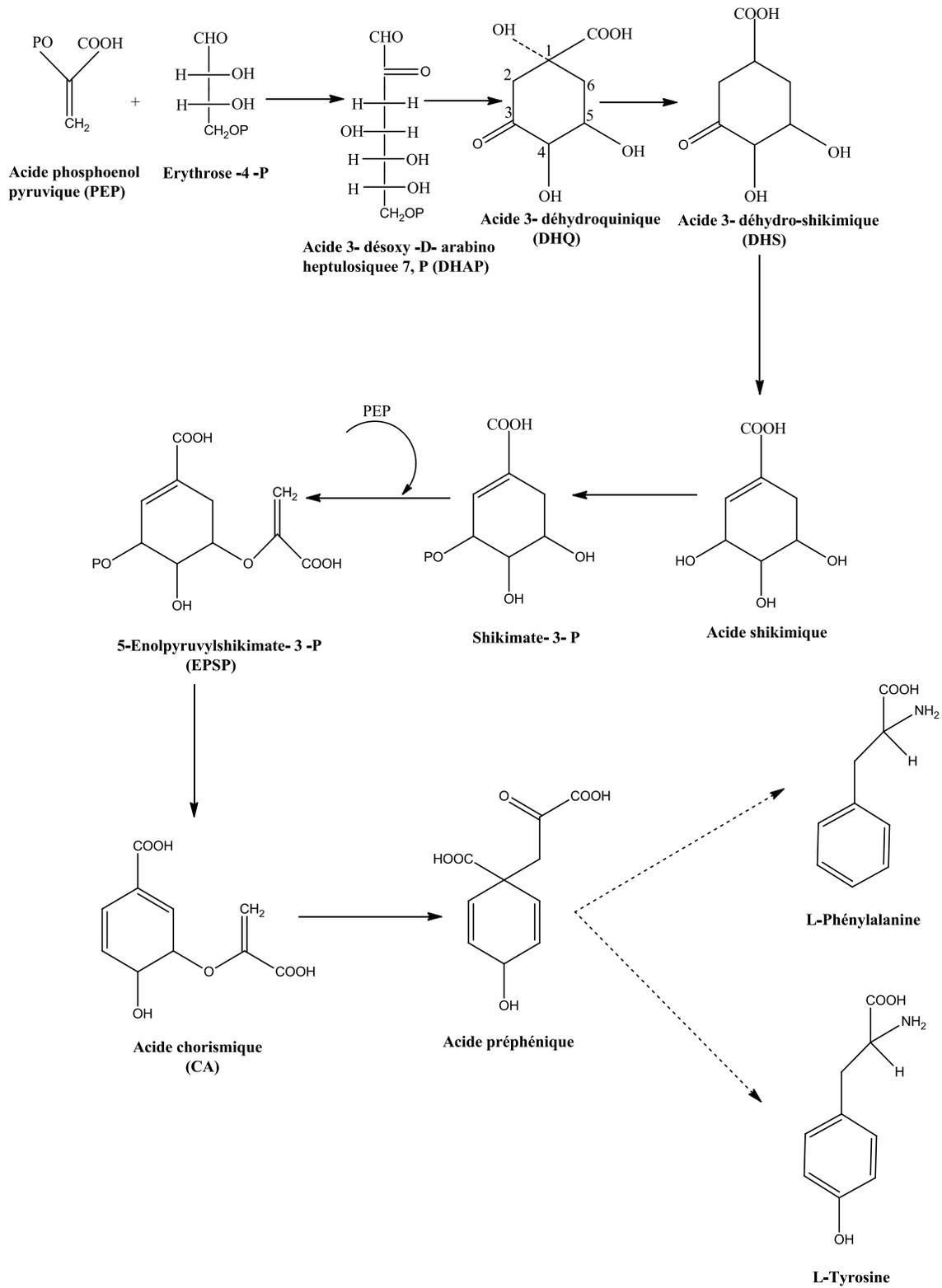


Figure 08: Voie de biosynthèse de shikimate (Floss, 1997)

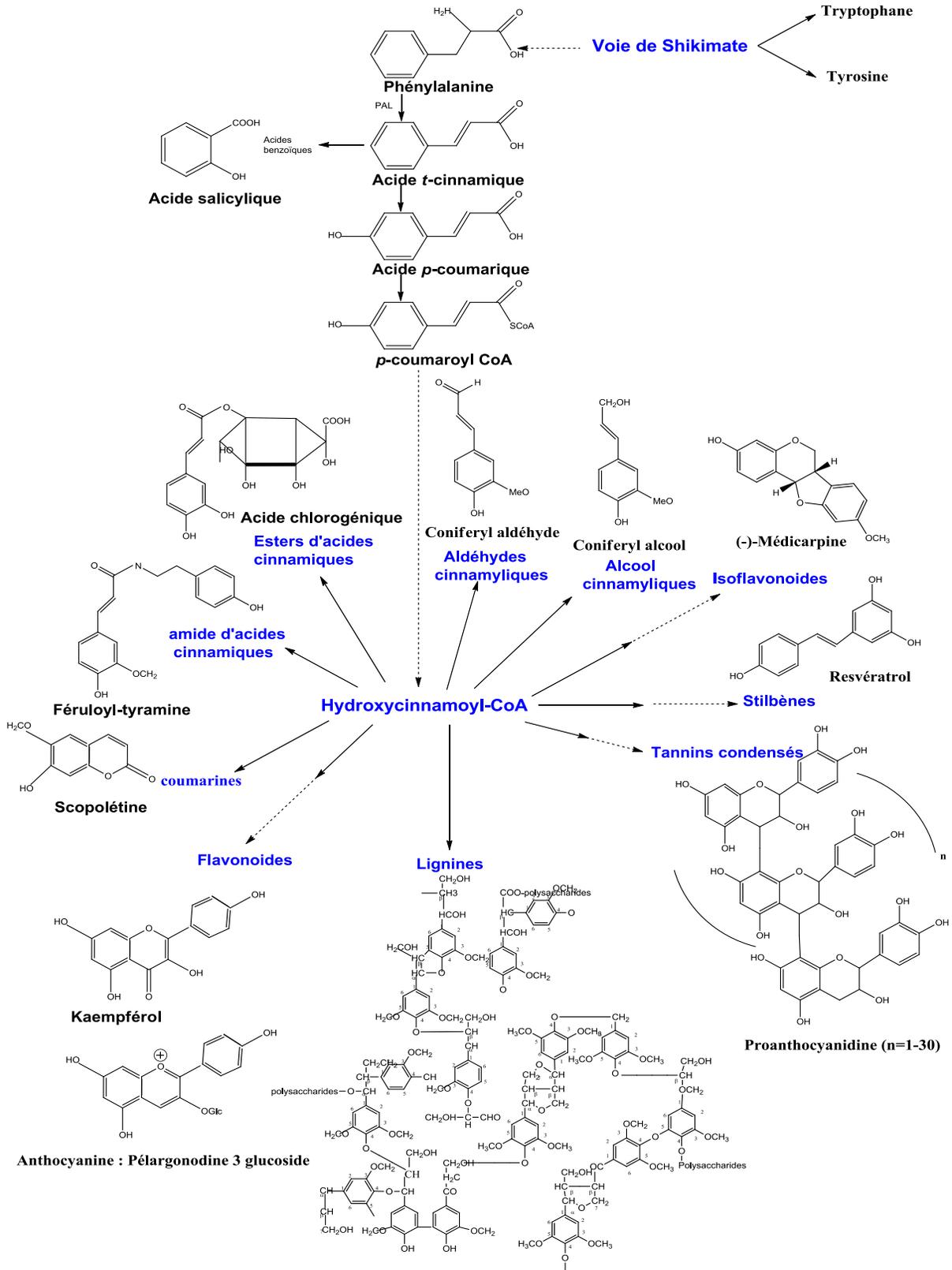


Figure 09 : Voie de biosynthèse de phénylpropanoïde (Hoffman *et al.*, 2004).

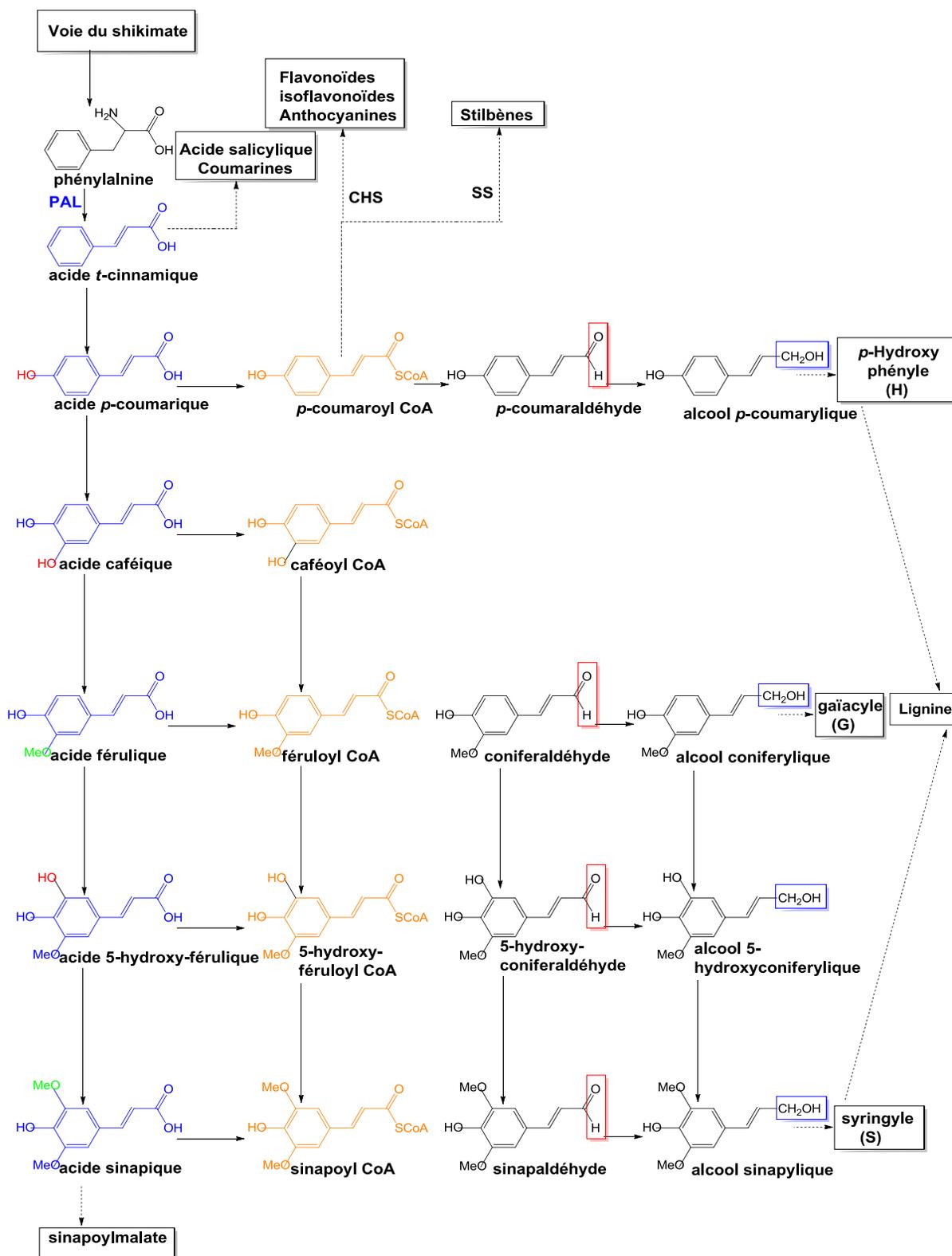


Figure 10 : Représentation simplifiée du métabolisme des phénylpropanoïdes (Hoffman et al., 2004).

3-2/Voie d'acétate malonate

Les composés phénoliques sont également formés par la voie d'acétate malonate suite à une condensation de 2 malonyl CoA et une molécule d'acétyl CoA qui donne une chaîne latérale, cette dernière se cyclise pour donner naissance au noyau A (figure 11). La voie d'acide shikimique et celle d'acétate malonate se condensent pour donner naissance à une voie mixte responsable de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes.

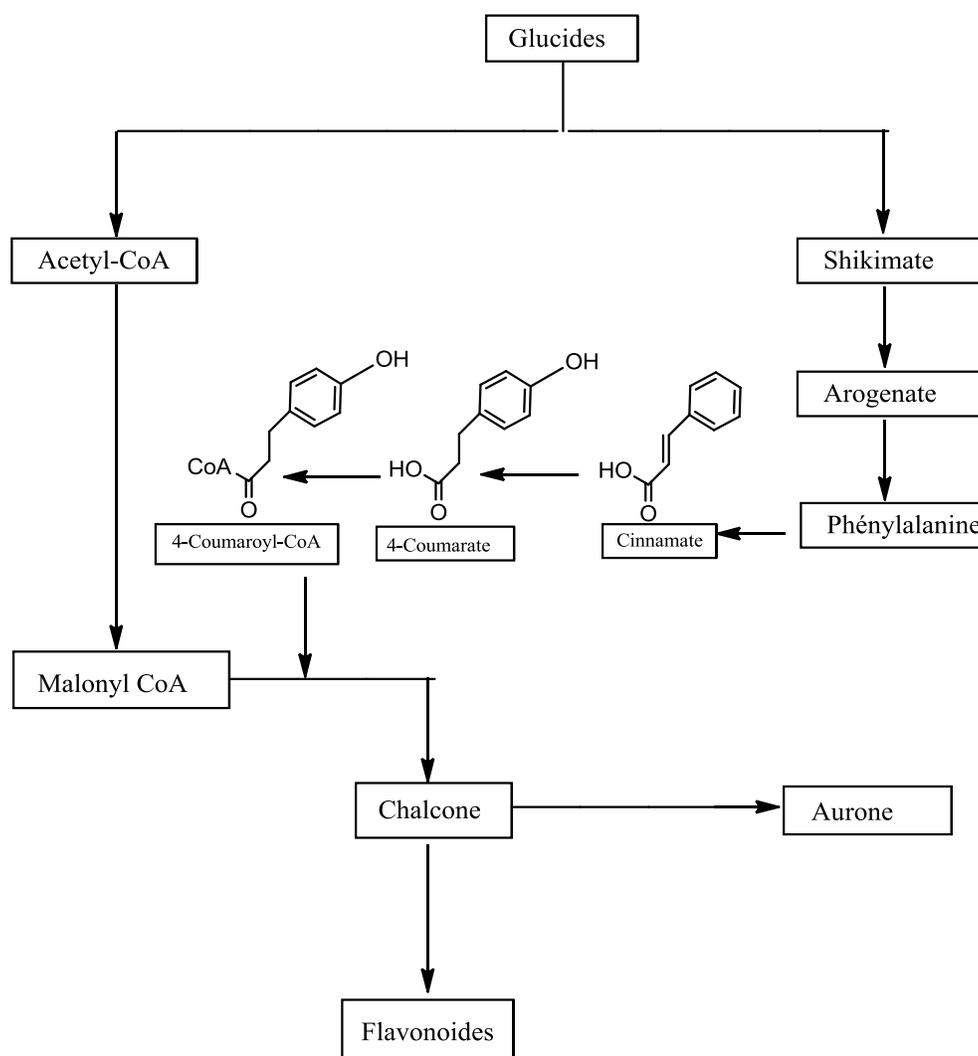


Figure 11 : Condensation de la voie d'acide shikimique et de malonate (Hoffman *et al.*, 2004).

3-3/ Voie mixte de biosynthèse des flavonoïdes

La phénylalanine ammonialyase (PAL) permet d'obtenir l'acide cinnamique qui deviendra acide *p*-coumarique après action de la cinnamate 4-hydroxylase. La réaction de condensation d'une unité de propanoïde avec trois unités de malonyl-CoA sous l'action de la chalcone synthase conduit à l'obtention de chalcone, cette dernière est par la suite considérée comme une intermédiaire caractéristique de la synthèse de différents flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones (cycle A en C6 et cycle B en C6 reliés par une chaîne en C3) parce qu'ils ont la même origine de biosynthèse, cette dernière se fait à partir d'un précurseur commun ; 4, 2', 4', 6' tétrahydroxychalcone, qui est métabolisé en présence de chalcone isomérase en flavanone, ensuite sous l'action de flavone synthase le flavanone se transforme en flavone. En présence de flavonol synthase ou dihydroflavonol-4-réductase le dihydroflavonol se métabolise en flavonol ; kaempférol ou bien flavan 3, 4 diol, ce dernier qui semble être le précurseur des flavan-3-ols et anthocyanidol (figure 12) (Winkel-Shirley, 2001 ; Subsamanian *et al.*, 2007).

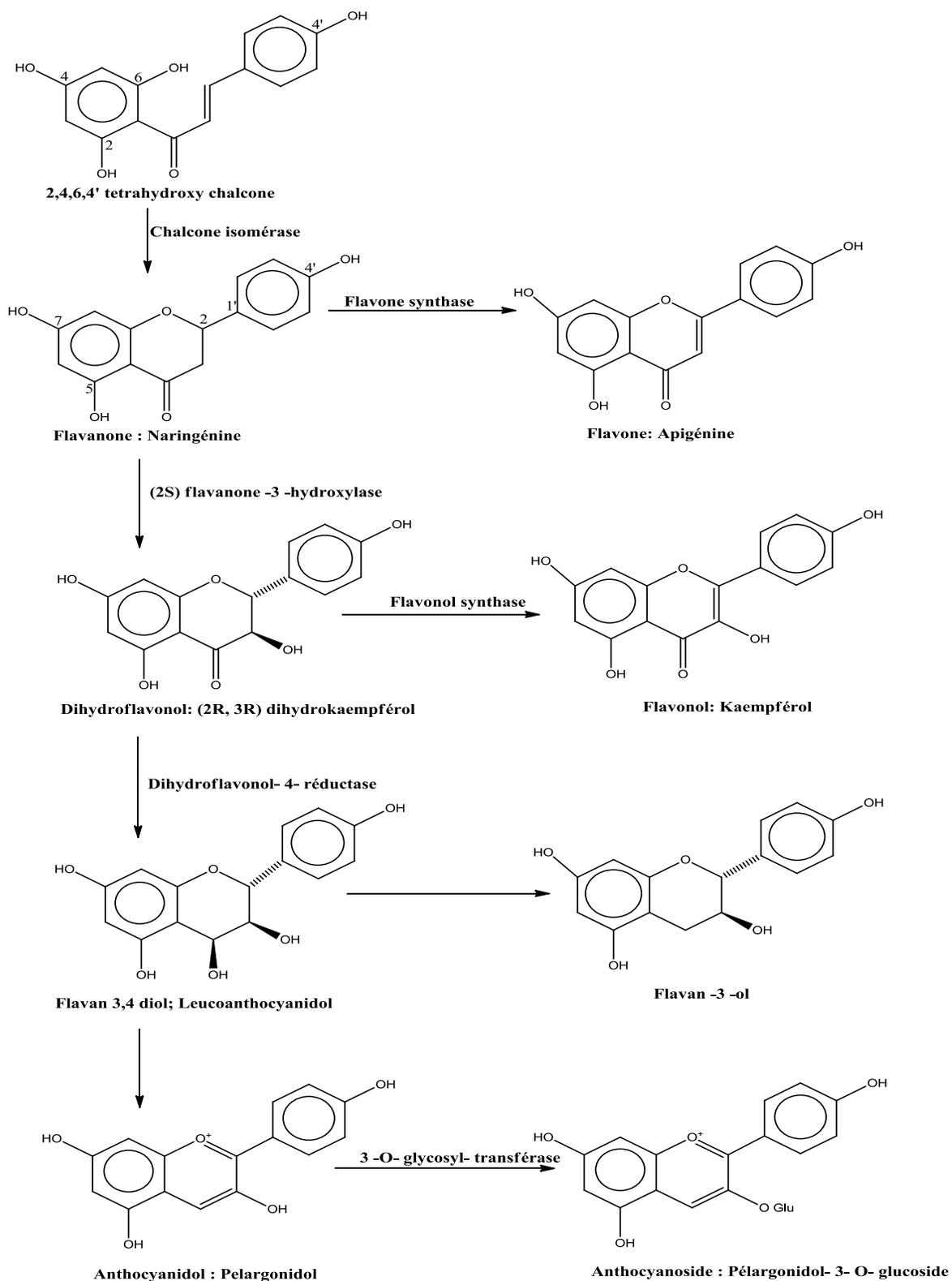


Figure 12 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel-Shirley, 2001 ; Subsamanian *et al.*, 2007).

4/ Propriétés biologiques et pharmacologiques des composés phénoliques

- Les **acides phénols et ses dérivés** sont considérés comme responsables des propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires (Hennebelle *et al.*, 2004) ;
- Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (Bossokpi, 2002) ;
- Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999) ;
- L'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (Rangkadilok *et al.*, 2007) ;
- les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007) ;
- **Les flavonoïdes**, jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipooxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Anderson *et al.*, 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004) ;
- **Les tanins** Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (Hennebelle *et al.*, 2004) ;
- Les plantes riches en tannins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux de gorge, les problèmes de sécrétions, les infections interne ou externe, blessures et brûlures (Bruneton, 1999) ;
- Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (Hennebelle *et al.*, 2004). Ils ont la capacité de capturer les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (Anderson *et al.*, 1996).

- Les lignanes possèdent un certain nombre de propriétés utiles pour les humains, certains protègent contre l'apparition de divers cancers, tandis que d'autres sont antimutogènes, antivirales, antibactériennes, et antifongiques (Costa *et al.*, 1999).

5/ Activités biologiques des composés phénoliques

5.1/ Activité antioxydante

5.1.1/ Généralités

Nos cellules et nos tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (Haleng *et al.*, 2007).

5.1.2/ Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (Pincemail *et al.*, 1999). Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer.

5.1.3/ Les antioxydants

Les antioxydants sont classés soit en composés exogènes (naturel ou synthétique) ou endogènes, responsable de limiter les dommages dus aux radicaux libres. Un bon antioxydant doit répondre à certain nombre de critères :

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres ;
- Chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+), capables de promouvoir la production de radicaux libres ;
- Interagir avec d'autres antioxydants, et dans la mesure du possible, les régénérer ;
- Avoir un effet positif sur l'expression génétique ;
- Être rapidement absorbé ;
- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire (Valko *et al.*, 2006).

5.1.4/ Différents systèmes d'antioxydant

Le système antioxydant naturel est réparti en deux groupes principaux : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques.

5.1.4.1/ Antioxydants enzymatiques : Ils sont composés d'un nombre limité de protéines telle que ; la catalase, la glutathion peroxydase, ainsi que la peroxyde dismutase.

A/ Catalase : Essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

B/ Glutathion peroxydase(GPx) : Elle permet de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur

C/ Superoxyde dismutase (SOD) : Permet de catalyser la dismutation des ions superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Delattre *et al.*, 2005).

5.1.4.2/ Antioxydants non enzymatiques : Ce groupe comprend des antioxydants non enzymatiques exogène et endogène :

A/ Antioxydants non enzymatiques exogènes

- **Acide lipoïque** : En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique il égale la capacité de régénère certain antioxydant endogène et exogènes (Packer *et al.*, 2001).
- **Protéines** : Telles que la ferritine, la transferrine, la céruléoplasmine et l'albumine (Pincemail et Defraigne, 2004).

B/ Antioxydants non enzymatiques endogènes

- **Vitamine C (acide ascorbique)** : est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky *et al.*,1999).
- **Vitamine E (α tocophérol)** : est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols. Ce sont de bons antioxydants alimentaires qui agissent comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant (Kaiser *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1993).
- **Caroténoïdes** : sont des pigments issus des plantes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles (Valko *et al.*, 2006).
- **Composés phénoliques** : en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires. Leur capacité antioxydante réside par le fait à «terminer» les chaines radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Schroter *et al.*, 2002 ;Leopoldini *et al.*,2011).

5.2/ Activité cicatrisante

La cicatrisation est l'ensemble des phénomènes physiologiques naturels aboutissant à partir d'une plaie à la restauration de la structure cutanée. De cette manière les tissus humains et animaux sont capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leurs sont propres.

La réparation des lésions est un alignement complexe de différents processus dynamiques, qui ne sont pas encore complètement compris. Ce phénomène naturel inclut plusieurs aspects et événements moléculaire et cellulaire. Ainsi, dans la présentation schématique usuelle, le déroulement de la cicatrisation est divisé en trois phases: phase inflammatoire, phase de prolifération et formation de tissu et enfin la phase de remodelage tissulaire. Cette division traditionnelle est quelque peu arbitraire, du fait d'un chevauchement partiel de ces phases, par exemple la formation tissulaire commence alors que l'inflammation est installée.

La cicatrisation est réglée et synchronisée par un groupe de cytokines, tels que le PDGF, FGF, TNF, IGF, et le TGF α et β (Gambichler *et al.*, 2005). Ces derniers sont sécrétés par les thrombocytes, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes, cellules endothéliales et les fibroblastes. Ces facteurs interviennent dans toutes les étapes de la cicatrisation.

Lorsqu'elles ne sont ni trop profondes, ni trop étendues, la plupart des plaies ou brûlures cutanées cicatrisent rapidement en quelques semaines. On distingue 3 phases successives: la phase inflammatoire et formation du caillot (0 à 3 jours), la phase proliférative ou formation de tissu (3 à 12 jours) et la phase de remodelage tissulaire.

*Matériel et
méthodes*

1/ Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes (fleurs) de *Calendula officinalis L.* et des racines de *Thapsia garganica L.* Les parties végétales sélectionnées sont collectées à partir de la région de Hamma Bouziane durant le mois de février 2019 et identifiées au niveau du laboratoire de Physiologie Végétale de l'université Constantine-1. Les parties aériennes de *Calendula officinalis L.* ont été séchées à l'abri de la lumière solaire et à une température ambiante alors que les racines de *Thapsia garganica L.* ont été séchées dans l'étuve à 40 °C pendant 24 heures. Le broyage de matériel végétal de chacune des deux espèces est effectué avec un broyeur, La photographie des poudres des fleurs de *Calendula officinalis L.* et des racines de *Thapsia garganica L.* est présentée dans la figure.13

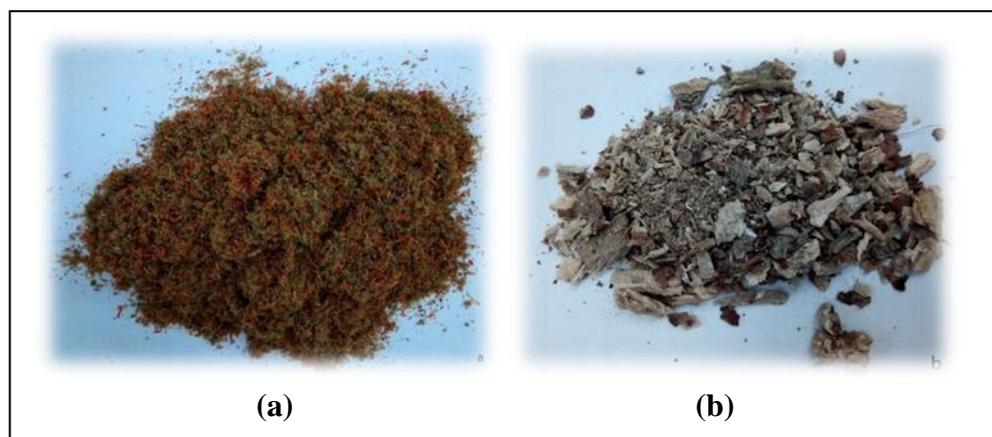


Figure 13: Poudres des fleurs de *Calendula officinalis L.* et des racines de *Thapsia garganica L.*

2/ Méthode d'extraction

Le procédé d'extraction a été réalisé selon la méthode décrite par (Babero *et al.*, 2008) et (Ma *et al.*, 2009). Les poudres des plantes sélectionnées (100 g) ont été extraites par macération par le solvant méthanol/eau (70/30) (3x500 ml) sous agitation magnétique. L'extraction a été assistée par ultrasons (Fisher scientific fb 15046, Leicestershire, Angleterre) pendant 30 minutes à une température ambiante, avec renouvellement du solvant chaque 24h (pendant 3 jours). Les extraits combinés et filtrés sur papier filtre ont été concentrés dans un évaporateur rotatif sous vide à une température <40°C (BuchiR-200, Medellin, Colombia). Le résidu sec est repris par 100 ml d'eau

distillée bouillante. Après une décantation de toute une nuit on récupère la phase limpide qui va subir un affrontement par l'éther de pétrole dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse récupérée est évaporée à sec puis repris par 10 ml de méthanol, les extraits obtenus sont ensuite stockés à une basse température (-25°C) jusqu'à analyse.

3/ Caractérisation chimique des extraits

3.1/ Analyses qualitatives par screening phytochimique

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basé sur des réactions de précipitations ou de colorations. Ces dernières permettent de définir la présence ou l'absence de métabolite secondaire comme par exemple: alcaloïde, quinones, flavonoïdes, saponines, tanins, stérols et sucre réducteurs dans les parties sélectionnées des plantes étudiées.

L'interprétation des résultats des criblages s'est faite selon les qualificatifs suivants :

(-) Résultat négatif, (+) Résultat faiblement positif, (++) Résultat positif, (+++) Résultat Fortement positif.

3.1.1/ Quinones libre

Un gramme (1g) de matériel végétal sec broyé est placé dans un tube sec avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. On applique une agitation et un repos de 24h, les extraits sont filtrés et concentrés au rota-vapeur. La présence de quinones libres, est confirmée par un virement de la phase aqueuse en jaune, rouge ou violet juste après l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10 (Dohou *et al.*, 2003).

3.1.2/ Alcaloïdes

Le test de screening des alcaloïdes fondé sur la capacité de combinaison des alcaloïdes avec les métaux lourds (Test de Mayer). L'extrait hydroalcoolique est repris dans quelques ml d'HCl 50%, la formation d'un précipité jaune, après l'ajout de quelques gouttes de réactifs de Mayer, témoigne la présence d'alcaloïdes (Dohou *et al.*, 2003).

3.1.3/ Tanins

La détection des tanins dans les extraits de *Calendula Officinalis L* et *Thapsia Garganica L* a été faite selon la méthode au FeCl₃. A 1,5 g de matériel végétal sec sont additionnés 10 ml de méthanol 80 %. Après 15 min d'agitation, les extraits sont filtrés et met dans des tubes secs. L'ajoute de FeCl₃ à 1% permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables) et au bleu verdâtre en présence des tanins catéchiques (tanins condensés) et en noirâtre en présence d'un mélange de tanins condensés et hydrolysables (Dohou et al., 2003).

3.1.4/ Tanins vrais

L'addition de quelques gouttes d'HCl concentré à chaque extrait des fleurs de *Calendula Officinalis L* et racines de *Thapsia Garganica L*, repris dans l'eau distillée, suivi d'un chauffage au bain marie bouillant permet de détecter la présence ou non des tanins suite à la formation d'un précipité rouge (Yves-Alain Bekro et al., 2007).

3.1.5/ Saponines

La présence des saponines est déterminées par le test de la mousse, l'extrait a été repris dans 5ml d'eau distillée, puis introduit dans un tube à essai et agité vigoureusement, la formation d'une mousse (hauteur supérieure de 1 cm) stable persistant pendant 15 min , indique la présence de saponines (Yves-Alain Bekro et al., 2007).

3.1.6 Stérols et polyterpènes

La mise en évidence des noyaux terpéniques met à profil la réaction de Libermann. Le test consiste à faire dissoudre l'extrait dans 1ml d'anhydride acétique; 0,5ml d'acide sulfurique au triturât sont par la suite additionnés. L'apparition à l'interphase d'un anneau violet, virant au bleu puis au vert confirme la présence des stérols (Koffi *et al.*, 2009).

3.1.7/ Flavonoïdes

Le test de détermination des flavonoïdes consiste à faire dissoudre les extraits hydro alcooliques de *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* dans 1ml d'HCl et de rajouter par la suite

quelques copeaux de magnésium, l'apparition d'une coloration allant de l'orangé au rouge pourpre confirme l'existence des flavonoïdes (Yves-Alain Bekro et al., 2007).

3.1.8/ Sucres Réducteurs

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence dans les extraits de *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* par le réactif de Fehling. 5ml d'extrait brut ont été rajoutés à 5ml de liqueurs de Fehling. après 2 à 3 min de chauffage au bain- marie à 70°C la formation d'une précipitation rouge brique indique une réaction positive (Yves-Alain Bekro et al., 2007).

3.2/Analyses quantitatives par spectrophotométrie (UV-Visible)

3.2.1/ Dosage des phénols totaux (PT)

La teneur en phénols totaux est déterminée par spectrophotométrie UV-Vis, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) lors de l'oxydation des phénols dans une solution alcaline en mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) qui se traduit par une coloration bleu foncé (Vuorela, 2005).

Pratiquement, 1 ml d'extrait des plantes sélectionnées est ajouté à 5 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué 10 fois par de l'eau distillée. Une solution (4 ml) de carbonate de sodium Na_2CO_3 (0,7 M) est ensuite ajoutée. Après agitation les tubes ont été stockés à l'obscurité pendant 2 heures, après cette période l'absorbance est lue à 765 nm sur un appareil (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotomètre, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre). La teneur des phénols totaux est déterminée à partir d'une équation de régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage (voir annexe) établie avec l'acide gallique (0-0,1 mg/ml) et exprimée en milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g extrait) (Adesegun et al., 2007). La teneur des phénols totaux est calculée par la formule suivante :

$$T=C.V/M$$

T : représente le total des composés phénoliques (g Equivalent Acide Gallique/g d'extrait sec ; g GAE/g d'extrait).

C: concentration des phénols totaux, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : le volume de l'extrait (ml).

M : poids de l'extrait sec (g).

3-2-2/ Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes contenus dans les extraits des plantes sélectionnées sont estimés par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Ayoola *et al.*, 2008). Pratiquement, 1 ml d'une solution éthanoïque d' AlCl_3 (2%) a été ajouté à 1 ml de chaque extrait des plantes étudiées. L'intensité de la couleur est mesurée à la longueur d'onde de 420 nm après 30 minutes d'incubation à une température ambiante (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotomètre, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre). Une gamme étalon à base de quercétine (0-0,1 mg/ml) est également préparée dans les mêmes conditions. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est exprimée en mg équivalents quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g extrait sec).

3-2-3/Dosage des flavonols totaux

La quantification des flavonols a été réalisée par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) additionné d'une solution d'acétate de sodium (Oyedemi *et al.*, 2010). Pratiquement, 2 ml d'une solution d' AlCl_3 (2%), et 3 ml d'une solution d'acétate de sodium (50g/l) sont ajoutées à 2 ml d'extrait. Les tubes à essais sont ensuite incubés à 20°C à l'obscurité pendant 2h et demi. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 440 nm par spectrophotomètre UV-Vis (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotomètre, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre). Une gamme étalon de quercétine (0-0,1 mg/ml) a été préparée dans les mêmes conditions afin de quantifier la teneur des flavonols .

4/ Evaluation des activités biologiques

4.1/ Activité antioxydante au DPPH

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante des différents extraits en raison de sa capacité à produire des radicaux libres stables et la simplicité de l'analyse (Benhammou *et al.*, 2007). La présence des radicaux libres DPPH• dans la solution donne lieu à une coloration violette foncée à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Benhammou *et al.*, 2007). Les antioxydants réduisent le DPPH• (2,2-diphényl-1-

picrylhydrazyl), par conséquent la couleur vire du violet vers le jaune (fig14) (Thomas, 2011). Ainsi, l'intensité de la couleur violette est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

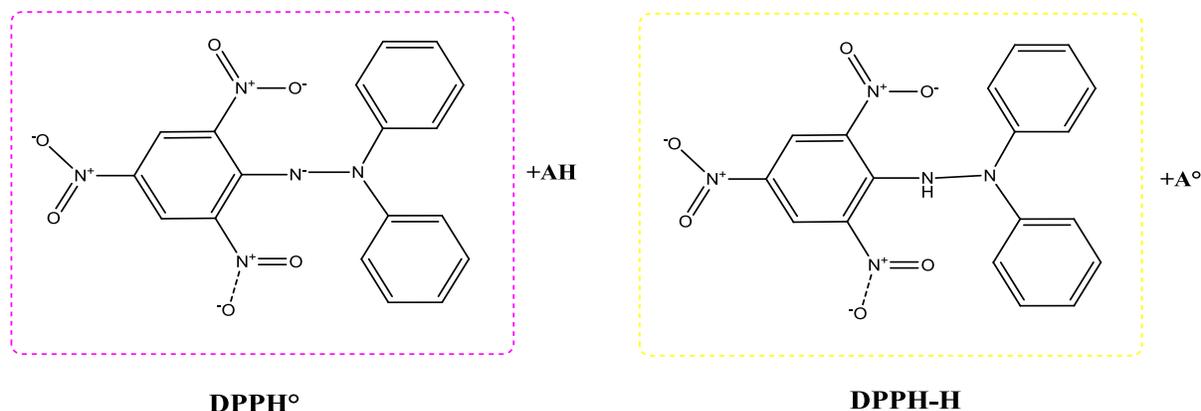


Figure 14 : Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Thomas, 2011)

L'effet de chaque extrait est mesuré par la procédure décrite par Talukder *et al* (2013). Pratiquement, 2 ml de différentes concentrations des extraits (0-1 mg/ml) sont ajoutés à 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%), puis le mélange est laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 minutes. La lecture de l'absorbance de différentes solutions est effectuée à 520 nm. Les résultats sont comparés au contrôle négatif (solution de DPPH• en absence de l'extrait). Le pourcentage d'inhibition de l'extrait est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition}_{\text{DPPH}} (\text{I} \%) = \frac{[A_0 - A_T]}{A_0} * 100$$

A₀ : Absorbance du contrôle négatif (solution de DPPH• en absence de l'extrait)

A_T : Absorbance du test (solution du DPPH en présence de l'extrait)

Tous les tests sont répétés trois fois ($n=3$). Les valeurs des IC₅₀ (mg/ml) (signifiant les concentrations nécessaires des extraits pour piéger 50% des radicaux DPPH•) sont exprimées en moyennes ± écarts types. L'activité antioxydante des extraits est comparée à la vitamine C (antioxydant de référence).

4.2/ Activité cicatrisante (test d'excision)

L'activité cicatrisante de l'extrait hydroalcoolique de *Calendula officinalis L.* a été évaluée sur des plaies pratiquées chez les lapins *albinos*, mâles de poids homogène selon des procédures décrites précédemment (Bensegueni *et al.*, 2007 ; Farnood *et al.*, 2012). Les animaux sont anesthésiés par une injection intramusculaire de chlorhydrate de kétamine à raison de 15 mg/kg, l'anesthésie est complétée par 5 mg/kg de diazépam localement sur le lieu d'excision. Un lambeau de peau de 30 mm environ est excisé (Bensegueni *et al.*, 2007).

Un nombre de six plaies ont été pratiqués sur le même animal, chaque lapin reçoit un des traitements suivants :

- Extrait de *Calendula officinalis L.* à la dose de 500 mg.
- Une crème cicatrisante Cicatryl Bio® à la dose de 500 mg.

Un lapin avec plaies, sans traitement est utilisé comme contrôle.

Le pansement des plaies a été fait tous les jours en raison d'une application par jour avec une quantité précise des extraits testés et de pommade jusqu'à guérison complète.

Le pourcentage de cicatrisation des plaies d'excision des différents lots est calculé tous les trois jours, selon l'équation suivante :

$$\text{Contraction de la plaie (\%)} = [(T_i - T_j) / T_i] \times 100$$

T_i : taille de la plaie initiale

T_j : taille de la plaie du jour spécifique

Les moyennes de pourcentage de contraction des plaies sont données en valeurs moyennes \pm écart types ($n=6$). La comparaison entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Résultats et discussion

1/Caractérisation chimique des extraits

1.1/Les résultats du screening phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante et consiste à détecter les différentes familles des composants existantes dans les parties aériennes (fleurs essentiellement) et les parties souterraines (racines) de *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* par des réactions qualitatives. Les résultats de l'analyse phytochimique des extraits de *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII: Résultats du criblage phytochimique des extraits.

Groupe de métabolites	Extraits des plantes étudiées	
	<i>Calendula officinalis L.</i>	<i>Thapsia garganica L.</i>
Flavonoïdes	+++	++
Tanins condensés	+++	+++
Tanins hydrolysables	+++	+++
Stéroïdes	++	+++
Quinones	+++	-
Alcaloïdes	+++	+++
Sucres réducteurs	+++	+++
Saponines	+++	+++

(-) Résultat négatif, (+) Résultat faiblement positif, (++) Résultat positif, (+++) Résultat

Fortement positif.

D'après les résultats illustrés dans le tableau VII, les flavonoïdes, les tanins condensé et hydrolysables, les stéroïdes, les alcaloïdes ainsi que les saponines constituent les marqueurs les plus importants chez les deux espèces étudiées de *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* Ces résultats vont dans le même sens que les analyses réalisées par Rabia *et al.*, (2012) et Abuduina, (2018) sur les extraits des extraits des mêmes plantes étudiées.

Notre étude a révélé que l'extrait de *Calendula officinalis L.* est riche en quinones contrairement à l'extrait de *Thapsia garganica L.* dont la non détection des quinones a été confirmée par l'absence d'un virement de la phase aqueuse en jaune, rouge ou violet après l'ajout de quelques gouttes de NaOH (1/10).

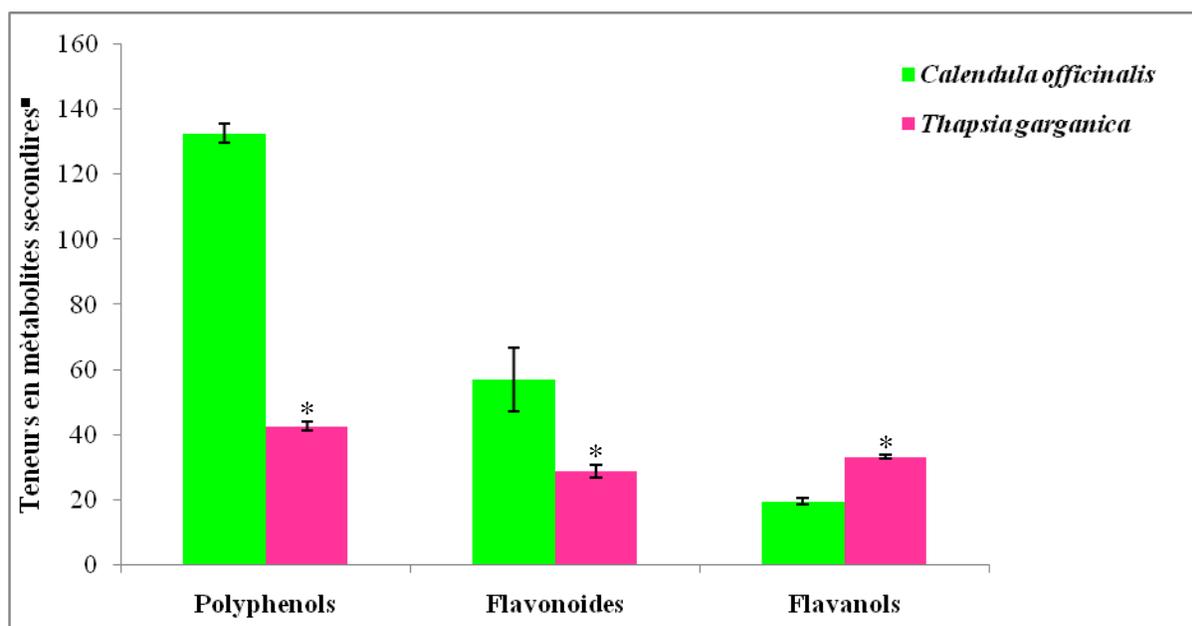
1.2 / Estimation des contenus en composés phénoliques

Les résultats de l'analyse quantitative des phénols totaux (PT), des flavonoïdes totaux (FT), ainsi que des flavanols (FLT) sont exprimés dans le tableau VIII et la figure15.

Tableau VIII : Estimation des contenus en composés phénoliques dans les extraits.

	Extraits des plantes étudiées	
	<i>Calendula officinalis L.</i>	<i>Thapsia garganica L.</i>
Phénols totaux (mg GAE/g)	132.79±0.34	42.72±1.42*
Flavonoïdes totaux (mg QE/g)	57.06±9.77	28.90±2.04*
Flavanols (mg QE/g)	19.70±0.83	33.26±0.69*

mg GAE/g : mg d'acide gallique équivalent/ g d'extrait sec, mg QE/g: mg de quercétine équivalent/ g d'extrait sec, * : $p < 0.0001$; valeurs comparées à *Calendula officinalis L.*



■valeurs moyennes des teneurs en métabolites secondaires ±SD (n=3).

Figure15 : Teneurs en composés phénoliques dans les extraits

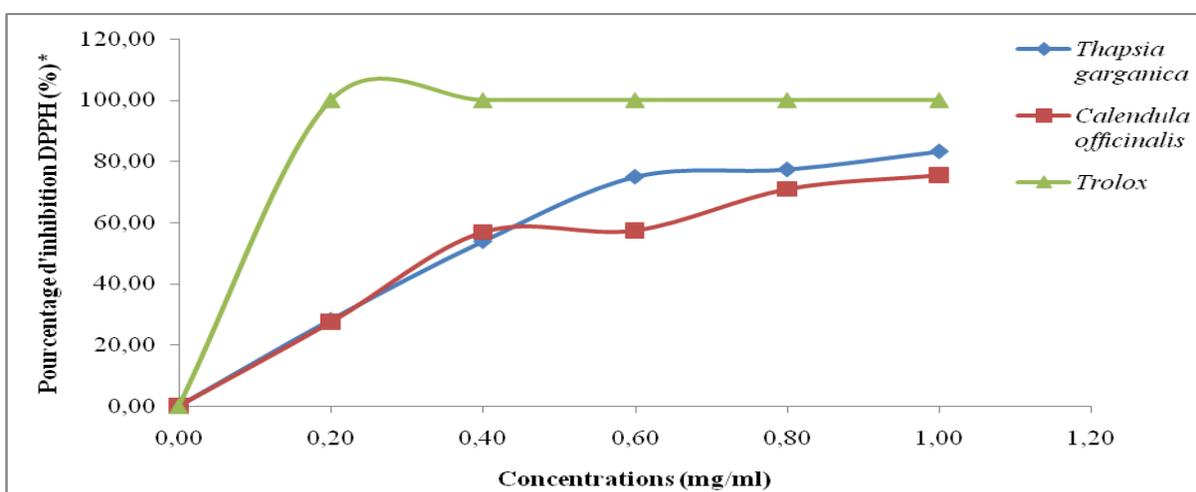
De la lecture des résultats on peut déduire que les taux des phénols totaux (132.79 ± 0.34 mg GAE g^{-1}) et des flavonoïdes totaux (57.06 ± 9.77 mg QE g^{-1}) de *Calendula officinalis L.* est significativement plus important ($p < 0.0001$) que ceux de *Thapsia garganica L.* A l'opposé pour les flavonols totaux (19.70 ± 0.83 mg QE g^{-1}) elle présente un taux relativement faible par rapport à *Thapsia garganica L.* (33.26 ± 0.69 mg QE g^{-1}).

On peut conclure à travers l'évaluation des teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes totaux et flavonols totaux) dans l'extrait de *Calendula officinalis L.* peut constituer une source potentielle de substances phénoliques antioxydantes. Ce résultat est conforté par d'autres travaux sur cette espèce qui souligne que *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* sont parmi les plantes qui renferment des taux élevés en substances phénoliques qui pourraient être mis à profit contre le stress oxydant et les maladies qui en découlent (Djeridane *et al.*, 2010 ; Rabia *et al.*, 2012 ; Cheurfa et Bachagha, 2013 ; Ringane *et al.*, 2013).

3/ Evaluation des activités biologiques

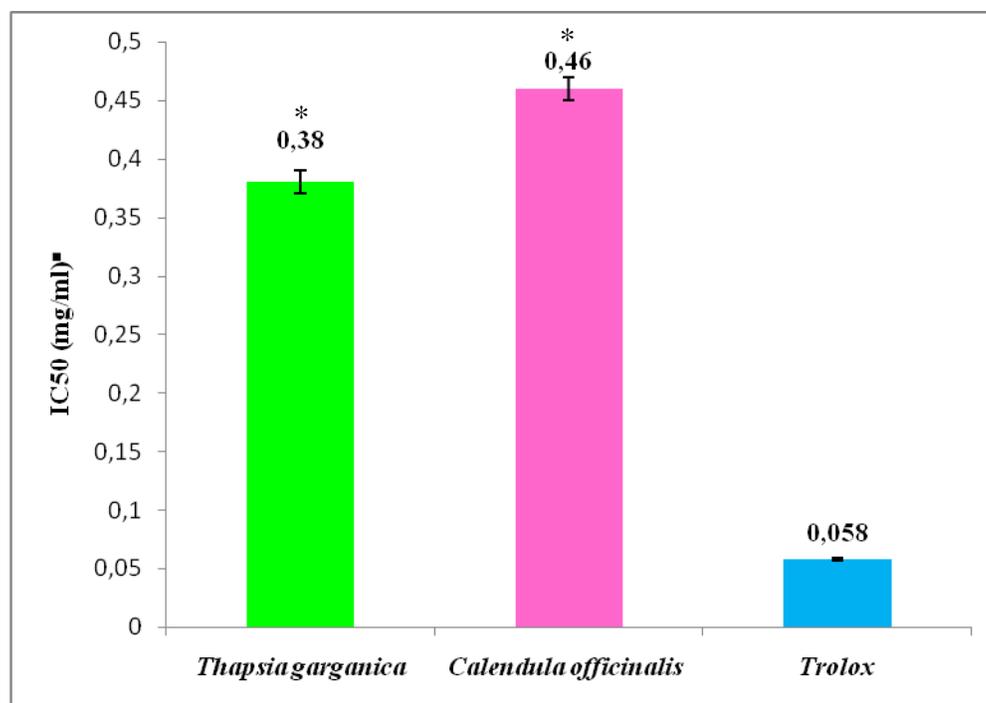
3-1/ Activité antioxydante au DPPH

La cinétique de la réduction du radical libre par les extraits de *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* ainsi que les concentrations inhibitrices IC_{50} sont exprimés dans les figures 16, respectivement.



*valeurs moyennes d'inhibition de DPPH \pm SD ($n=3$).

Figure 16: Evolution du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des extraits.



■ valeurs moyennes d'IC₅₀ ±SD (n=3).

* : $p < 0,0001$; valeur comparée au trolox.

Figure 17 : Valeurs des IC₅₀ des extraits et de Trolox.

La lecture des courbes des cinétiques de l'inhibition du radical DPPH (figure16) montre que :

- Les extraits et le trolox (substance antioxydante témoin) possèdent un pouvoir inhibiteur envers le radical DPPH;
- L'effet inhibiteur des extraits est proportionnel aux doses utilisées ;
- Le trolox (substance antioxydant témoin) a montré un pouvoir inhibiteur supérieur à celui observé pour les extraits de *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.*;
- L'extrait de *Calendula officinalis L.* se distingue de l'extrait de *Thapsia garganica L.* par son effet inhibiteur légèrement plus élevé.

La figure17 montre que :

- Le trolox possède un IC₅₀ de $0,006 \pm 0,001$ mg/ml, jugé significativement inférieur ($p < 0,0001$) par rapport à ceux des extraits ;

-Les valeurs des IC₅₀ des extraits de *Calendula officinalis* L. (0,46±0,01 mg/ml) et *Thapsia garganica* L. (0,38±0,01 mg/ml) sont presque identiques.

D'après ces résultats, il est évident que les extraits des plantes étudiées de *Calendula officinalis* L. et *Thapsia garganica* L; possèdent un pouvoir antiradicalaire vis-à-vis du DPPH qui est relativement identique pour les deux espèces testées, et qui reste toutefois significativement ($p < 0,0001$) moins important que celui du trolox.

Les résultats des IC₅₀ des extraits de *Calendula officinalis* L. et *Thapsia garganica* L. sont respectivement de l'ordre de 0,46±0,01 mg/ml et 0,38±0,01 mg/ml. Ces valeurs sont différentes par rapport à ceux rapportés par Djeridane et al., (2010); Berri, (2011); Cheurfa et Bachagha, (2013) et Abuduina, (2018). Cette différence pourrait être expliquée par les possibles fluctuations qu'on peut observer dans la composition qualitative et quantitative d'une même plante, soumises à des facteurs endogènes (génétique) et exogène (climatique) (Rice-Evans *et al.*, 1996; Van Acker *et al.*, 1996; Bahorun *et al.*, 2004).

3.2/ Evaluation de l'effet cicatrisant de l'extrait de *Calendula officinalis* L.

En raison de sa forte teneur en composés phénoliques, et ses caractéristiques cicatrisantes, l'extrait de *Calendula officinalis* L. a fait l'objet d'une évaluation de son activité cicatrisante sur des plaies d'excision pratiquées sur des lapins Néo-zélandais. L'effet d'extrait est comparé par rapport à une pommade cicatrisante commerciale (Cicatryl®).

Les résultats obtenus de l'évolution de la cicatrisation des plaies d'excision, après application journalière de l'extrait, sont exprimés dans les tableaux IX.

Tableau IX : Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision traitées et non traitées (contrôle) chez le lapin.

Progression de la contraction des plaies d'excision en fonction des jours							
							
	Jour 0	Jour 3	Jour 6	Jour 9	Jour 12	Jour 15	Jour 18
Physiologique							
Extrait de <i>Calendula officinalis</i> L							
Cicatryl®							

Tableau X: Evolution de la contraction des plaies d’excision chez le lapin traité et non traité.

		Contraction des plaies d’excision exprimée en % ^Δ					
Groupe	Affectation	Jour 3	Jour 6	Jour 9	Jour 12	Jour 15	Jour 18
I	Non traité	3.34±	7.82±	24.50±	57.43±	72.34±	89.62±
		0.11	2.19	7.27	1.48	9.23	2.47
II	<i>Calendula officinalis L</i>	11.15±	47.33±	52.24±	66.93±	85.01±	95.57±
		3.48 ^{##} ■	8.66 ^{##} ■	9.99 ^{##}	5.76	2.58	3.91
III	Cicatryl [®]	1.96±	7.82±	30.63±	50.08±	61.29±	90.14±
		1.70	2.19 [#]	5.72	9.40	11.85	3.86

^Δ Valeur moyenne ± écart type (n=3); [#] p<0,01, ^{##} p<0,01 vs contrôle ; [■] p<0,05 vs Cicatryl[®].

Il ressort de la lecture de tableau X que :

-Le groupe traité par l’extrait de *Calendula officinalis L.* montre une contraction des plaies significativement plus rapide (à J3, J6 et J9) que celle observée dans le groupe contrôle ;

-A l’exception des jours 9, 12, 15 et 18, le groupe traité par l’extrait de *Calendula officinalis L.* montrent une progression de la cicatrisation significativement plus rapide que celle observée pour le groupe témoin traité par Cicatryl[®] ;

-Sur toute la période (J12→J18) les groupes traités par l’extrait de *Calendula officinalis L.* ne montre aucune différence de cicatrisation par rapport au contrôle et au lot traité par Cicatryl[®].

A la lecture des résultats de l’évolution de la cicatrisation des plaies d’excision, il peut être observé que l’extrait de *Calendula officinalis L.* présente un effet cicatrisant significativement supérieur pendant la période allant de J3 au J9, ceci est interprété par une diminution de la phase inflammatoire, une favorisation de la contraction des plaies et une réduction de la période d’épithélialisation. Le mécanisme d’action peut être affecté par certaines substances bioactives ayant un effet cicatrisant et doués d’un potentiel antioxydant. Selon Martin (1996) et Palmeri *et al* (1995) les antioxydants qui réduisent les radicaux libres sont capables d’empêcher la

dépréciation au niveau cellulaire par inhibition de l'inflammation qui conduit à l'appauvrissement de collagène, en offrant ainsi une protection contre les dommages de la peau.

Conclusion

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes, qui forment des sources riches en produits naturels pour soigner diverses maladies. Le présent travail a porté sur l'étude qualitative, quantitative et biologique des extraits hydro alcooliques des fleurs de *Calendula officinalis L.* et des racines de *Thapsia garganica L.* Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes et les sucre réducteur, ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques. L'analyse quantitative montre que les taux des phénols totaux, flavonoïdes et flavonols totaux, de *Calendula officinalis L.* sont significativement plus importants que ceux de *Thapsia garganica L.*

Sur le volet biopharmacologique deux activités biologiques ont été étudiées (test DPPH et activité cicatrisante) ; une activité antioxydante par l'utilisation du test DPPH in vitro qui a montré un potentiel inhibiteur important envers les radical libre DPPH pour les extraits des plantes étudiées de *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* et qui est relativement identique pour les deux espèces testées, mais qui reste toutefois significativement ($p < 0,0001$) moins important que celui du trolox. Au regard de son potentiel important en composés phénoliques, l'extrait de *Calendula officinalis L.* a été sélectionnés pour subir une évaluation de son activité cicatrisante sur des plaies d'excision pratiquées sur des lapins Néo-zélandais. Les résultats de l'évaluation de l'activité cicatrisante chez les lapins ont montré que l'extrait de *Calendula officinalis L.* présente un effet cicatrisant significativement supérieur pendant la période allant de J3 au J9, ceci est interprété par une diminution de la phase inflammatoire, une favorisation de la contraction des plaies et une réduction de la période d'épithélialisation. En conclusion, cette étude nous a permis,

-Sur le volet phytochimique :

D'établir la richesse des extraits de *Calendula officinalis L.* et de *Thapsia garganica L.* en composés phénoliques particulièrement l'extrait de *Calendula officinalis L.* ce dernier pourrait être exploité comme source potentiel d'antioxydant.

-Sur le volet pharmacologique :

Les évaluations expérimentales in vitro sur des tests (DPPH) a permis de mettre en évidence un potentiel antiradicalaire pour les deux extraits. Ceci est particulièrement notable pour l'extrait de

Calendula officinalis L. Ce dernier, s'est, par ailleurs, révélé doué d'un effet cicatrisant sur des modèles animaux.

En perspective, il serait intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques, toxicologiques et biologiques des extraits de *Calendula officinalis L.* et de *Thapsia garganica L.* afin de s'assurer de leur innocuité, de mettre en évidence d'autres activités bénéfiques pour la santé et de caractériser leurs principes actifs. Ces travaux complémentaires permettront éventuellement une phytostandardisation ultérieure, critère indispensable à la valorisation industrielle de ces produits en tant que compléments alimentaires à allégation de santé.

*Références
bibliographiques*

A

- **Ababsa N et Boukois K.H.** (2018). Etude phytochimique et activités biologique de l'extraite méthanolique d'*Artemisia herba alba*. Mémoire de master en biochimie de nutrion. Université- Constantine 1.
- **Abuduina A. M.** (2018). Etude phytochimique screening biologique et pharmacologique des fleurs de *Calendula arvensis*. thèse de doctorat. Université Mohamed v-Rabat.
- **Adesegun S.A., Fajana A., Orabueze C.I and Coker H.A.B.** (2007). Evaluation of ntioxidant Properties of *Phaulopsis Fascisepsepala* CBCI (*Acantaceae*). *Oxford Journal*. 6: 227-213.
- **Alignan M.** (2006). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3eme ed. France : Walters Kluwer
- **Anderson C.M., Hallberg A and Hogberg T.** (1996). Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Advanced Drug Research*. 28 : 65-180
- **Ayoola G.A., Coker H.A.B., Adesegun S.A., Depeoju-Bello K.O., Ezennia E.C and Atangbayila T.O.** (2008). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of some selected Medicinal plants used For Malaria Therap in southwestern Nigeria. *Tropical journal of pharmaceutical research*. 7(3): 1019-1024.

B

- **Babero G.F., Liazid A., Palma M., Barroso C.G.** (2008). Ultrasound assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*. 75(5): 1332-1337.
- **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M.** (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*. 46: 1086-1089.
- **Bammi J., and Douira A.** (2004). Contribution à la connaissance de la flore vasculaire de la forêt de l'Achach, plateau central (Maroc). Málaga, *Acta Botanica Malacatina*. 29: 23-41.
- **Berri Y.** (2011). Etude des activités inflammatoire, analgésique, toxiques etantioxydants des extraits de *Thapsia garganica* .Mémoire de Magister En Biochimie Appliquée aux substances végétales bioactives. Université Abderrahmane Mira- Bejaia.

- **Benhammou N., Atik Bekkara F and Panovska K.T.** (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica Desf.* *Advanced in food science.* 29(3): 155-167.
- **Bensegueni A., Belkhiri A., Boulebda N and Keck G.** (2007). Evaluation de l'activité cicatrisante d'un onguent traditionnel de la région de Constantine sur les plaies d'excision chez le rat. *Science et technologie.* pp 83-87.
- **Bouakaz I.** (2006). .Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.
- **Bruneton, J.** (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, *Lavoisier Techniques & Documentation.* Paris.
- **Bruneton J.** (1999). Pharmacognosie. Phytochimie Plantes médicinales, 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. Pp : 227-310-312-313-314.494.
- **Bruneton J.** (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4eme ed. Paris : *Tec & Doc Lavoisier.*
- **Burrowes J.** (2007). Flavonoïds and health: proceeding of the ILSI north America flavonoïds workshop. *Journal of Nutrition.* 137: 718-737.

C

- **Calvo-Flores F. G., Dobado J. A., Isac-Garcia J., and Martin-Martinez F. J.** (2015). Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials. Edition Wiley, Chemistry, Technologie and Application. Edition *john wiley & sons ,ltd.* p 315.
- **Chanvallon C., Blanchemaison P., and Cance –Sanchez B.** (1994). Les flavonoïdes. *Act Med Angiologie.* 12: 3846-50.
- **Costa M.A., Xia Z. Q., Davin L.B., and Lewis N.G.** (1999). Toward Engineering the Metabolic Pathways of Cancer-Preventing Lignans in Cereal Grains and Other Crops. Edition Springer. *Recent Advances in Phytochemistry.* 33: 67 – 87.
- **Cowan M.M.** (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Research.* 12 (4): 564- 582.

D

- **Delattre J., Beaudoux J.L. et Bonnefont- Rousselot D.** (2005). Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques : 1- 23.

- **Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S and Isaac O.** (1994). The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med Dec.* 60(6):516-2
- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F. and Stocker P.** (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology.* 224: 801–809.
- **Dobignard A. et Chatelain C.** (2010-2011). Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord. vol. 1, 2, 3, vol. 4 & 5 in prep. [Consultable sur le site des CJB de Genève.](#)
- **Dohou N., Yamni K., Griman and Idrissi Hassani L.M.** (2003). Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine, *Thymelaea lychooides*. *Acta Botanica Malacitana.* pp 233-239
- **Drew D.P, Krichau N., Reichwald K. and Simonsen H.T.** (2009). Guaianolides in Apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochem Rev.* 8:581–599.

E

- **Elias R., De Méo M., Vidal-Ollivier E., Laget M., Balansard G. and Dumenil G.** (1990). Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *Calendula arvensis* L. and *Hedera helix* L. *Mutagenesis.* 5(4):327-31.

F

- **Farnood Shokouhi S.J., Tajik H. and Mojtaba H.** (2012). Efficacy of topical application of alcoholic extract of yarrow in the healing process of experimental burn wounds in rabbit. *Comparative Clinical Pathology.* pp 177-181.
- **Fonseca Y.M., Catini C.D., Vicentini F.T., Nomizo A., Gerlach R.F. and Fonseca M.J.** (2010). Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology.* 127(3):596-601

G

- **Gambichler T., Moussa G., Sand M., Sand D., Altmeyer P and Hoffmann K.** (2005). Applications of optical coherence tomography in dermatology. *Journal of Dermatology Science*. 40(2): 85-94.
- **Ghédira K. et Goetz P.** (2016). *Calendula officinalis L.* (Asteraceae) : souci. *Phytothérapie*. 14:62-67
- **Gilani G. S. and Anderson J.J.B.** (2002). Phytoestrogens and health. Edition *Aocs Press*. p405.
- **Gómez F.L.M.** (2007). Síntesis de análogos de las taspigarginas. Mémoire en vue d'obtention du grade de doctorat en chimie. Département de chimie organique. Faculté des sciences. Université de Cádiz. puerto real. Espagne.

H

- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C. and Chapelle J.P.** (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*. 62(10): 628-638.
- **Hand R.** (2011). Apiaceae. In: Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Consultable sur leur [site internet](#).
- **Hanifi N.** (1991). Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication d'actes éditions : 47-49.
- **Hennebelle T., Sahpaz S. and Bailleul F.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. 1: 3-6.
- **Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B and Legrand M.** (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*. 6(6): 1446-1465

I

- **Imran M., Ahmad N., Anjum F. M., Kamran-Khan M., Mushtaq Z., Nadeem M. and Hussain S.** (2015). Potentiel protective properties of flax lignin secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition journal*, 14: 1 – 7.

J

- **Jiménez-Medina E., Garcia-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A. and Garrido F.** (2006). A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*. 5(6):119.
- **Jost J. P. and Jost-Tse Y.C.** (2016). L'automédication chez les animaux dans la nature. Editions *connaissances & savoirs*. p 23.

K

- **Koffi N., Beugré K., Guédé N.Z., Dossahoua T and Laurent A.** (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte d'ivoire). *Sciences et Nature*. pp 1-15.

L

- **Leopoldini M., Russo N. and Toscano M.** (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125(2): 288-306.
- **Liu H., Jensen K.G., Linh My Tran L.M., Chen M., Zhai L., Olsen C.E., Sohoel H., Denmeade S.R., Isaacs J.T. and Christensen S.B.** (2006). Cytotoxic phenylpropanoids and an additional *thapsigargin* analogue isolated from *Thapsia garganica*. *Phytochemistry*. 67: 2651–2658.
- **Loto C.A.** (2011). Inhibition effect of tea extract on the corrosion of mild steel in dilute sulphuric acid. *J.Mater. Environ. Sci.* 2 (4) 335-344

M

- **Macheix J.J., Fleuriet A et Jay-Allemand C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. pp 4-5.
- **Manallah A.** (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea L.* Mémoire de magister en Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- Sétif.
- **Martin S. et Andriantsitohaina R.** (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51 : 304–315

- **Masella R.R., Di Benedetto R., Vari C. and Filesi Giovannini C.** (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 16(10): 577-586.
- **Matthew J.L.** (2008). *Calendula officinalis* and Wound Healing: A Systematic Review. *Wounds*, Aug 01 (8), <http://www.woundsresearch.com/article/9064>
- **Maurice N.** (1997). L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. *Lavoisier*. Paris. p. 12-14.
- **Ma Y.Q., Chen J.C., Liu D.H and Ye X.Q.** (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of Citrus peel extracts: effect of ultrasounds. *Ultrasonics sonochemistry*. 16 (1): 57-62.
- **Meftah T., Sengui R., Djennas A. and Benabbes O.** (2001). Connaissance, valorisation et contrôle de l'utilisation de la flore sauvage en médecine traditionnelle (plantes médicinales). Programme U.I.C.N. pour l'Afrique du nord.
- **Michel Démarchez.** (2012). radicaux hydroxyles /radical hydroxyle. [Consulté le 18/06/2019]. Disponible à partir de : <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?mot136>
- **Middleton E., Kandaswami C. and Theoharides T.C.** (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 52: 673-839
- **Monteiro M., Farah A., Perrone D., Trugo L-C. and Donangelo C.** (2007). Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *Journal of Nutrition*. 137: 2196-2201
- **Muley B.P., Khadabadi S.S. and Banarase N.B.** (2009). Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8(5). .

N

- **Nacz M. and Shahidi F.** (2003). Phenolics in food and nutraceuticals. BocaRaton, FL: CRC Press. P : 576 – 172.

- **Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R and Krishna D.R.** (2001). Bioflavonoides classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. 33: 2-16.

O

- **Oyedemi S.O., Bradely G. and Afolayan A.J.** (2010). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. *African journal of pharmacy and pharmacology*. 4(2): 70-78.

P

- **Packer L., Kraemer K. and Rimbach G.** (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. 17(10): 888-895.
- **Pincemail J et Defraigne J.O.** (2004). Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire. Belgique.
- **Pincemail J., Meurisse, M., Limet, R. et Defraigne, J.O.** (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*. 4 (5), 1-7.
- **Pommier P., Gomez F., Sunyach M.P., D'Hombres A., Carrie C. and Montbarbon X.** (2004). Phase III Randomized Trial of *Calendula Officinalis* Compared With Trolamine for the Prevention of Acute Dermatitis During Irradiation for Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 22(8) : 1447-1453.
- **Preethi K.C., Kuttan G. and Kuttan R.** (2009). Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol*. 47(2):113-20.

R

- **Rabia A., Hussein E.S., Nabeel S., Asma A.N. and Hebail, F.** (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural Science*. 4(5) 324-335.
- **Rangkadilok N., Sitthimonchai S., Worasuttayangkurn L., Mahidol C., Ruchirawat M., and Satayavivad J.** (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chem. Toxicol*. 45: 328-336.

- **Retsky K. L., Chen K, Zeind Z and Frei B.** (1999). Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxohistidine formation. *Free Rad Biology and Medicine*. 26(1-2): 90-98.

S

- **Sagar R., Sahoo H.B., Kar B., Mishra N.K., Mohapatra R., Sarangi S.P.** (2014). Pharmacological evaluation of *calendula officinalis L.* on bronchial asthma in various experimental animals. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis.* [serial online] [cited 2018 Mar 19];4:95103. Available from: <http://www.ijnpnd.com/text.asp?2014/4/2/95/129595>
- **Sarni-Manchado P. et Cheynier V.** (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed *Lavoisier*. pp 2-10.
- **Schroeter, H., Boyd C., Spencer J.P.E., Williams R.J., Cadenas E and Rice-Evans C.** (2002). MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging*. 23(5): 861-880.
- **Subsamanian S., Stacey G. and Yu O.** (2007). Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science*. 12(7): 282-283.

T

- **Talukder M.E.U., Jannatul A., Talka B.E., Sayedul I., Atiar R and Robiul H.B.** (2013). *In vitro* antioxidant potential of *Momordica charantia* fruit extracts. *British journal of pharmaceutical research*. 3(4): 936-971.
- **Tapas A-R., Sakarkar D-M. and Kakde R-B.** (2008). Flavonoids as Nutraceuticals : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (3), 1089-1099.
- **Thomas M.** (2011). Nouvelles méthodologie d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de doctorat en chimie analytique-Phytochimie l'université d'Orléans.

U

- **Uttara B., Singh A.V., Zamboni P. et Mahajan R.T.** (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*. 7:65-74

V

- **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M and Mazur M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1): 1-40.
- **Vuorela S.** (2005). Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Department of applied chemistry, microbiology and food chemistry. University of Helsinki. pp : 9-70.

W

- **Winkel-Shirley B.** (2001). Flavonoïd biosynthesis. A colorful model for genetics biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant physiology*. 126: 285-493.
- **Wichtl M. and Anton R.** (2009). Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR. Paris. 38, 41.
- **W-Erdman J., Balentine J.D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly., Hollman J.P., L-Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G and Burrowes J.** (2007). Flavonoïds and health: proceeding of the ILSI north America flavonoïds workshop. *Journal of Nutrition*. 137: 718-737.

Y

- **Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomas-barberan F.A., Datta N., Singanusong R. and Chen S.S.** (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.* (59):113-122.
- **Yoshida H., Kajimoto G. and Emura S.** (1993). Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the American oil chemist's society*. 70(10) : 989-995
- **Yves-Alain B., Boua B., Fézan H., Tra B., et Ehouan E.** (2007). Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). 217 – 225.

Z

- **ZEGHAD N.** (2018). Evaluation des propriétés biopharmacologiques, standardisation chimique et valorisation des agroressources fonctionnelles *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* *Opuntia ficus-indica*. Thèse de Doctorat en Sciences. Université des frères Mentouri- Constantine 1.

- **Zitterl-Eglseer K., Sosa S., Jurenitsch J., Schubert-Zsilavecz M., Della Loggia R., Tubaro A., Bertoldi M. and Franz C.** (1997). Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L). *J Ethnopharmacol.* 57(2):139-44.

Annexes

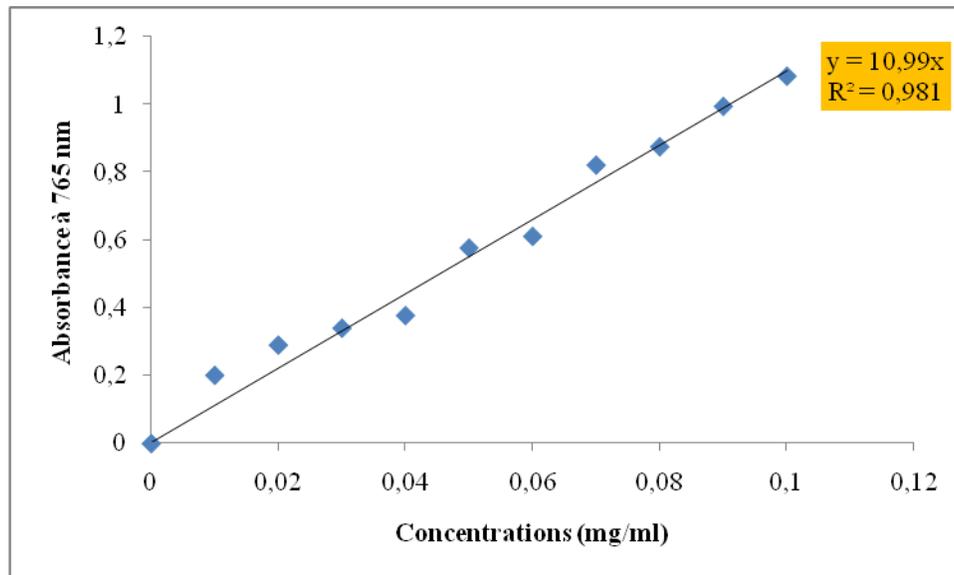
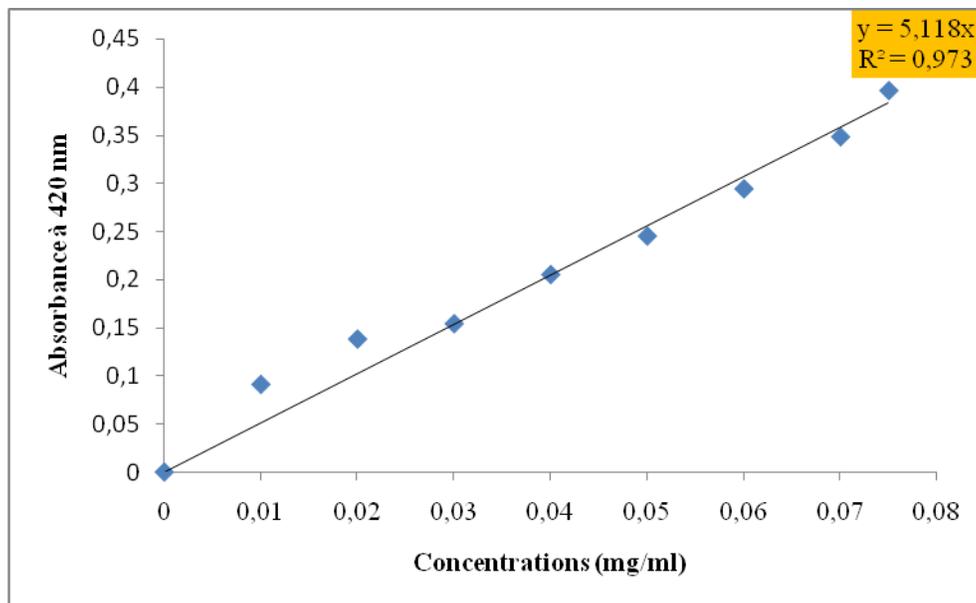
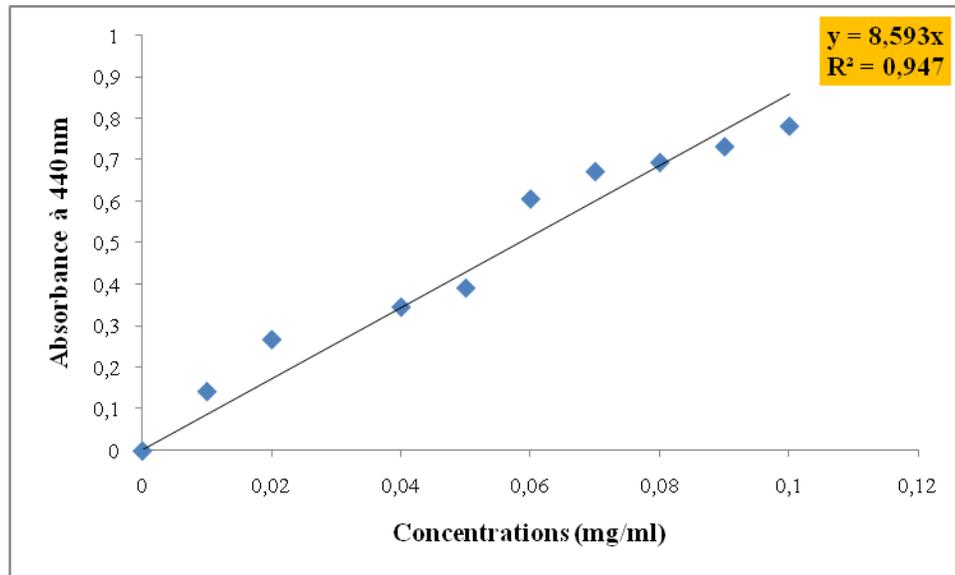
Figure 1 : courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols.**Figure 2**: courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Figure 3 : courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.



Résumés

Résumé :

Le présent travail vise à l'étude phytochimique et la détermination de certaines activités biologiques ; une *in vitro* et autre *in vivo* de deux plantes médicinales cultivées dans l'est Algérien ; *Calendula officinalis L. et Thapsia garganica L.*

Les tests phytochimiques ont révélés la richesse des extraits hydroalcooliques des plantes sélectionnées en composés phénoliques notamment en flavonoïdes et en tanins. L'analyse quantitative à travers l'évaluation des leurs teneurs a montré que les espèces étudiées peuvent constituer une source potentielle de substances phénoliques bioactives. L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* (DPPH) s'est montré que les extraits hydroalcooliques *Calendula officinalis L. et Thapsia garganica L.* sont doués d'un potentiel antioxydant important. Toutefois *Calendula officinalis L.* a été sélectionnée pour une évaluation de son activité cicatrisante *in vivo* sur le model animal par l'utilisation du test d'excision pratiquées sur des lapins Néo-zélandais. L'extrait de *Calendula officinalis L.* a montré un potentiel cicatrisant significativement important pendant la période allant de J3 au J9, ceci est interprété par une diminution de la phase inflammatoire, une favorisation de la contraction des plaies et une réduction de la période d'épithélialisation.

Mots clés : *Calendula officinalis L, Thapsia garganica L,* composés phénoliques, activité antioxydante, activite cicatrisante.

Abstract:

The present work aimed to the phytochemical study and the determination of some biological activities (*in vitro* and *in vivo*) of two medicinal plants from eastern Algeria; *Calendula officinalis L.* and *Thapsia garganica L.*

Phytochemical tests have revealed the richness of the hydroalcoholic extracts of selected plants by phenolic compounds mostly flavonoids and tannins. Quantitative analysis through the evaluation of their contents has shown that the studied species can constitute a potential source of bioactive phenolic substances.

The evaluation of *in vitro* antioxidant activity (DPPH) has shown that the hydroalcoholic extracts of *Calendula officinalis L.* and *Thapsia garganica L.* demonstrated an important antioxidant potential. However *Calendula officinalis L.* was selected for an evaluation of its *in vivo* healing activity on the animal model by the use of the excision test performed on New Zealand rabbits. The extract of *Calendula officinalis L.* showed a significant healing potential activity during the period from day 3 to day 9, this is interpreted by a decrease of the inflammatory phase, a favoring of the contraction of the wounds and a reduction of the period of epithelialization .

Key words: *Calendula officinalis L. et Thapsia garganica L.*, phenolic compounds, antioxidant activity, healing activity.

الملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة الكيمياء النباتية وتحديد بعض الأنشطة البيولوجية لنبتتين طبيبتين من شرق الجزائر : *Calendula* المدروسة غناها بالمركبات الفينولية خاصة الفلافونويد والتانينات. في حين أظهر التحليل الكمي أن النباتات المدروسة يمكن أن تشكل مصدرا هاما للمواد الفينولية النشطة بيولوجيا. بالإضافة إلى ذلك قد أثبت تقييم النشاط المضاد للأكسدة أن المستخلصات الهيدروكحولية للنباتات المختارة لهذه الدراسة أنها ذات إمكانيات هامة من حيث نشاطها المضاد للأكسدة. من جهة أخرى قمنا باختبار نشاط التئام الجروح لنبته *Thapsia garganica L* على نموذج حيواني عن طريق استخدام نموذج الشق حيث أظهرت النتائج أن مستخلص هذه النبتة له إمكانية جد هامة في الشفاء خاصة خلال الفترة الممتدة من اليوم 3 إلى اليوم 9 وهذا يفسر بانخفاض المرحلة الالتهابية وتحفيز عملية انكماش الجروح.

الكلمات المفتاح , النشاط المضاد للأكسدة , *Calendula officinalis L.* , *Thapsia garganica L.*, المركبات الفينولية
نشاط التئام الجروح

**INTITULÉ : CONTRIBUTION À UNE ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE ET UNE ÉVALUATION
DES ACTIVITÉS BIOPHARMACOLOGIQUES DE DEUX PLANTES CULTIVÉES DANS
L'EST ALGÉRIEN**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biologie et physiologie
de la reproduction

Le présent travail vise à l'étude phytochimique et la détermination de certaines activités biologiques ; une *in vitro* et autre *in vivo* de deux plantes médicinales cultivées dans l'est Algérien ; *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* Les tests phytochimiques ont révélés la richesse des extraits hydroalcooliques des plantes sélectionnées en composés phénoliques notamment en flavonoïdes et en tanins. L'analyse quantitative à travers l'évaluation des leurs teneurs a montré que les espèces étudiées peuvent constituer une source potentielle de substances phénoliques bioactives.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* (DPPH) s'est montré que les extraits hydroalcooliques *Calendula officinalis L.* et *Thapsia garganica L.* sont doués d'un potentiel antioxydant important. Toutefois *Calendula officinalis L.* a été sélectionnée pour une évaluation de son activité cicatrisante *in vivo* sur le model animal par l'utilisation du test d'excision pratiquées sur des lapins Néo-zélandais. L'extrait de *Calendula officinalis L.* a montré un potentiel cicatrisant significativement important pendant la période allant de J3 au J9, ceci est interprété par une diminution de la phase inflammatoire, une favorisation de la contraction des plaies et une réduction de la période d'épithélialisation.

Mots clés : *Calendula officinalis L.* , *Thapsia garganica L.* , composés phénoliques, activité antioxydante, activité cicatrisante.

Laboratoire de recherche : Laboratoires pédagogiques-UMC1

Jury d'évaluation : **Président du jury :** BOUDOOR LAILA (Pr - UFM Constantine 1),
 Rapporteur : ZEGHAD NADIA (MCB - UFM Constantine 1),
 Examineur : KARA KARIMA (MCA - UFM Constantine 1).

Date de soutenance : 14/07/2019