



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث 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 عاوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département : Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliquée*

Thème

Investigation phytochimique et potentiel antioxydant d'une
plante Algérienne du genre *Calendula* (Asteraceae)

Présenté par :

DERRADJI Rania Malak & GHIMOUZE Anfel lina

Le: 06/09/2020

Jury

MOSBAH Asma

MCA. UFM Constantine

Président

BOUTAGHANE Naima

MCA. UFM Constantine

Rapporteur

TENIOU Soumia

MAA. UFM Constantine

Examineur

Année universitaire
2019- 2020

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions **le bon dieu** le tout puissant, de nous avoir guidé jusqu'à l'achèvement de ce mémoire, et de nous avoir donné la force, le courage et la patience.

Nos remerciements vont tout particulièrement au Mètre de conférence **Boutaghane Naima** qui a accepté de nous encadrer durant notre deuxième semestre de fin d'étude. C'est à elle que nous devons notre intégration dans le laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (**LOST**) en tant que mastériennes. C'est elle aussi qui a géré et orienté nos travaux pour que nous puissions développer nos connaissances et notre savoir-faire en phytochimie. C'est ici madame que nous témoignons toutes nos reconnaissances pour le temps que vous avez consacré à la lecture et la correction de ce manuscrit que nous souhaiterions être un guide aux prochaines générations estudiantines.

Toutes nos gratitudes doivent aller également au Professeur **Kabouche Zahia** pour son accueil au sein de son laboratoire et d'avoir mis à notre disposition tout le matériel qui s'y trouve.

Nous tenons également à remercier la doctorante **Djeblia Lamiade** nous avoir promulguées de précieux conseils et d'être toujours souriante et de bonne humeur depuis l'initiation de notre mémoire ce qui nous a tellement aidées lors de nos manipulations. C'est grâce à son agréable assistance que nous avons pu nous familiariser avec le matériel du laboratoire. Nous tenons à vous adresser toutes nos reconnaissances pour votre présence ainsi que votre disponibilité et de nous avoir incessamment suivis au cours de la réalisation de ce travail.

Nous remercions aussi tout le personnel rencontré au niveau du **LOST** pour leur gentillesse et leur disponibilité. Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents, frères et sœur ainsi qu'à toute personne qui a contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes parents Bachir et Maya

A mon encadreur Boutaghane Naïma

Ma grand-mère

Mes sœurs Amani et Arwa

Mon frère Ahmed bey

*A toute ma famille pour leur soutien tout au
long de mon parcours universitaire*

*A mes cousines Imen et Nadja pour leur
amour et encouragement*

A tous mes amis et collègues

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux que j'aime

Anfel Lina

Dédicace

Je dédie ce projet et cet événement marquant de ma vie :

A mon très cher père *ABD EL-ALI*, mon précieux offre du dieu, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse et qui doit ma vie, ma réussite et
et mon respect,

A mon adorable mère *MOUNI* qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences,

Une chance m'a été offerte aussi pour dédier ce travail particulièrement à mon encadreur
BOUTAGHANE NAIMA

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point vous remercier comme il se doit,

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A mes chers grands frères *ZINOUE, MAMINE, OUSSAMA* et *YAKOBE*

qui ont été toujours présents pour moi,

Merci pour donner du goût et du sens à ma vie

A toute ma famille, mes proches, et surtout mes chères cousines merci énormément pour votre amour et vos encouragements.

A tous mes meilleurs amis qui m'avez toujours soutenu et qui me donnent de l'Amour, la Force et de la Vivacité surtout dans les moments difficiles.

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

Que Dieu vous garde tous et vous donne une longue et joyeuse vie.

Merci !

Malak

Table des matières

<i>Introduction générale</i>	1
------------------------------------	---

1^{ère} Partie : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Aspet botanique et études chimiques antérieurs

I.1. L'ordre Asterales.....	3
I.1.1. les Asteraceae.....	3
I.1.2. Répartition géographique	3
I.1.3. Position systématique de la famille Asteraceae.....	4
I.1.4. Description botanique de la famille Asteraceae	6
I.1.5. Etudes chimiques antérieures	9
I.1.6. Utilisations économiques et thérapeutiques des Asteraceae	9
I.2. Présentation du genre <i>Calendula</i>	11
I.2.1. Description botanique du genre <i>Calendula</i>	12
I.2.2. Répartition géographique du genre <i>calendula</i>	13
I.2.3 Classification systématique du genre <i>Calendula</i>	14
I.2.4 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Calendula</i>	13
I.2.5 Domaines d'applications et intérêt en phytothérapie	14
I.2.5.1 Utilisation en médecine traditionnelle.....	14
I.2.5.2 Utilisation en cosmétologie	16
I.2.6 Quelques Activités biologiques du genre <i>Calendula</i>	17

Chapitre II : Les Métabolites Secondaires

II.1. Les composés phénoliques	21
II.1.1 Généralités	21
II.1.2 Les flavonoïdes	21
II.1.2.1. Structures chimiques et classification	22

II.1.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes	25
II.1.2.3. Quelques activités biologiques des flavonoïdes	27
II.1.3. Composés triterpéniques	30
II.1.3.1 Généralités	30
II.1.3.2. Biosynthèse des triterpènes	31
II.1.3.3. Structures chimiques et classification	34
➤ Composés aliphatiques (acycliques)	35
➤ Composés pentacycliques	34
➤ Composés tétracycliques	35
II.1.3.4. Propriétés pharmacologiques des triterpènes	36

Chapitre III : Stress oxydatif et Activité antioxydante

III.1. Généralités sur les antioxydants	38
III.2. Le stress oxydatif	39
III.3. Les radicaux libres	39
III.3.1. Mécanisme d'action des radicaux libres.....	40
III.4. Les Antioxydants	42
III.5. Quantification des polyphénols.....	43
III.5.1. Les méthodes spectrophotométriques.....	43
III.6. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante.....	44
III.6.1. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	44
III.6.2. Teste de l'activité antiradicalaire pour le radical ABTS+•.....	44
III.6.3. Test de blanchissement du β -carotène	45
III.6.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	45

2^{ème} Partie : MATERIELS ET METHODES

IV.1. Aperçu et but de travail	47
IV.2. Matériel et méthodes	47
IV.2.1. Matériel végétal	47
IV.2.1.1. Récolte de la plante du genre Calendula	47
IV.2.2. Méthodes d'analyses phytochimiques	47
IV.2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	47
IV.2.3. Méthodes d'analyses physico-chimiques	48
IV.2.3.1. Spectrophotométrie UV-visible	48
IV.3. Quantification des polyphénols	49
IV.3.1. Les méthodes spectrophotométriques	49
IV.4. Screening phytochimique par réactions colorées	49
IV.4.1. Mise en évidence des polyphénols	50
IV.4.1.1. Révélation par le réactif de Stiasny	50
IV.4.1.2. Réaction de la cyanidine	51
IV.4.2. Mise en évidence des alcaloïdes	52
IV.4.2.1. Révélation par le réactif de Mayer	52
IV.4.2.2. Révélation par le réactif de Dragendorff	52
IV.4.3. Mise en évidence des saponines	52
IV.4.3.1. Indice Mousse (IM)	52
IV.4.4. Mise en évidence des triterpènes	53
IV.5. Evaluation des activités biologiques	53
IV.5.1. Dosage des composés phénoliques	53

IV.5.2. L'activité antioxydante	54
IV.5.3. Test de l'activité anti radicalaire par le test de DPPH	55
IV.5.4. Test de l'activité anti-radicalaire pour le radical ABTS+•	55
IV.5.5. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)	56
IV.5.6. Analyse statistique	56

3^{ème} Partie : RESULTATS ET DISCUSSION

V.1. Rendement des extraits	57
V.2. Criblage phytochimique par CCM	58
V.3. Screening phytochimique par réactions colorées	60
V.3.1. Teneur en polyphénols totaux	60
V.4. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante	62
V.4.1. Activité antiradicalaire par le Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)	62
V.4.1.1. Mise en évidence de l'activité radicalaire	62
V.4.1.2. Dosage de l'activité antiradicalaire par le test DPPH	63
V.4.2. Activité antiradicalaire pour le radical ABTS+•	64
V.4.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	67
Conclusion générale	70

Liste des figures

- Figure 01** : Carte de répartition géographique des Asteraceae.
- Figure 02** : Classification sous familiale phylogénétique des Asteraceae.
- Figure 03** : Représentation schématique de la fleur *Matricaria chamomilla* L (Asteraceae).
- Figure 04** : Quelques espèces avec des fleurs ligulées et des fleurs tubulées.
- Figure 05** : Le fruit de *Sonchus oleraceus* L(Asteraceae).
- Figure 06** : 6 Illustrations de *Calendula officinalis* (Souci des jardins).
- Figure 07** : Carte géographique du genre *Calendula*.
- Figure 08** : Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane et du 2-phényl chromone.
- Figure 09** : différentes classes de flavonoïdes.
- Figure 10** : Formation de la chalcone.
- Figure 11** : Schéma conduisant aux différentes classes de flavonoïdes.
- Figure 12** : Critères structuraux essentiels pour une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes.
- Figure 13** : Structure du 2,3-époxydosqualène.
- Figure 14** : Biosynthèse du squalène.
- Figure 15** : Formation du 2,3-époxydosqualène.
- Figure 16** : Schéma récapitulatif de biogénèse des différents triterpènes.
- Figure 17** : Structure de squalène.
- Figure 18** : Les différents squelettes pentacycliques triterpéniques rencontrés.
- Figure 19** : Triterpène pentacyclique.
- Figure 20** : Les différents squelettes tétracycliques rencontrés.
- Figure 21** : Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH : glutathion, Cl⁻ : anion chlorure ; MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase sélénio-dépendante.
- Figure 22** : Schéma des Métabolites secondaires et prévention des certaines maladies.

Figure 23 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH⁺ entre l'espèce radicalaire DPPH⁺ et un antioxydant.

Figure 24 : oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^{•+}.

Figure 25 : Réduction du complexe néocuproïne / cuivre (II).

Figure 26 : macération des parties aériennes de *Calendula* et de concentration des filtrats hydroéthanoliques

Figure 27 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Calendula*

Figure 28 : chromatogramme : 1 des extraits EtOH, Acétate et BuOH) acétate d'éthyle : MeOH : H₂O (10 : 1 : 1) observé sous 254 nm, 365 nm et après la révélation

Figure 29 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne ± SD de trois essais).

Figure 30 : Teneur en polyphénols totaux (en mg /g d'extrait).

Figure 31 : Mise en évidence de l'activité antiradicalaire.

Figure 32 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extrait de plante.

Figure 33 : Valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudié classer en ordre croissant.

Figure 34 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS

Figure 35 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les deux extraits de *Calendula*.

Figure 36 : valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudié classer en ordre croissant.

Figure 37 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC)

Figure 38 : les A_{0,5} des échantillons testés classées par ordre croissant (CUPRAC).

Figure 39 : Photo prises lors du dosage de l'activité CUPRAC

Liste des abréviations

$\cdot\text{O}_2^-$: anion superoxyde

$\cdot\text{OH}$: radical hydroxyl

$^1\text{O}_2$: dioxygène singulet

ABTS : 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

ABTS⁺ : Acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

ADN : Acide désoxyribonucléique

BHA : Hydroxyanisole butylé.

BHT : Butyl-hydroxy-toluène.

CC : Chromatographie sur colonne ouverte.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CHCl_3 : Chloroforme.

Cl^- : anion chlorure ;

CUPRAC : Cupric Réducing Antioxidant Capacity.

DO : densités optiques

DPPH : 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl.

EOA : Espèces oxygénées activées.

ERO : espèces réactives oxygénées.

GSH : glutathion,

H_2O_2 : le peroxyde d'hydrogène

IC50 : Concentration d'inhibition 50.

IM : Indice Mousse

$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$; persulfate de potassium

M.A.T.E : Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement.

MeOH : Méthanol.

MPO : myéloperoxydase,

NOS : nitrite oxyde synthase

ROS : Reactive Oxygen Species.

Se-GPx : glutathion peroxydase séléno-dépendante

SOD : superoxyde dismutase,

SOD : Superoxyde dismutase.

UV : ultra-violet

Liste des tableaux

Tableau 01 : Position taxonomique de la famille des Asteraceae selon Cronquist

Tableau 02 : Position taxonomique de la famille des Asteraceae selon APG III

Tableau 03 : Position taxonomique du *calendula* selon APGIII

Tableau 04 : Gamme de dilutions décroissante de l'extrait butanolique pour la mesure de L'indice de mousse.

Tableau 05 : Les Rendements des différents extraits.

Tableau 06 : les résultats de criblage obtenus.

Tableau 07 : Résultats du dosage des polyphénols totaux de *Calendula*.

Introduction générale

Les plantes ont depuis longtemps présenté un rôle très important pour l'humanité, car elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activités biologiques potentielles. Elles constituent des merveilleuses usines végétales qui nous donnent la joie de guérir par un geste thérapeutique. On s'en sert traditionnellement pour se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture et conserver les aliments (ou les cadavres).

Au fil du temps, des cultures et des civilisations, l'homme a acquis par ses expériences les connaissances nécessaires pour créer son propre remède, on retrouvera des traces écrites qui remontent à l'Inde, à la Chine, à la Mésopotamie et à l'Égypte, tel que le fameux traité « *Papyrus Ebers* » découvert en 1862 datant de 1600 ans avant J-C, dans lequel environ 800 préparations à base de plantes sont inscrites.

Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne surtout avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Cette source semble inépuisable puisque sur les 500 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2002). Déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes : digitaline, quinine, morphine, colchicine, artémisinine... Pourtant, moins de la moitié des plantes aujourd'hui ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques ; ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré (Akoroda, 1981).

Deux grandes stratégies sont utilisées pour la recherche de molécules bioactives issues de plantes. Une d'ordre ethnopharmacologique consistant à faire inventorier les plantes médicinales utilisées par des groupes ethniques (pharmacopées traditionnelles) et une d'ordre chimiotaxonomique. Cette dernière passe par une approche phylogénétique et une approche classification de la taxonomie pour cibler des métabolites secondaires particuliers, ou encore un criblage systématique des espèces, ou toute combinaison des précédentes.

Dans le cadre de la valorisation de la flore du nord Algérien, par la recherche de nouveaux composés d'origine végétale à intérêts thérapeutiques, le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) a entamé un programme de recherche destiné à l'étude chimique et biologique de cette flore.

L'endémisme et/ou l'utilisation éventuelle en médecine traditionnelle demeurent nos critères principaux de sélection de la plante en vue d'une investigation chimique et biologique. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de la plante médicinale *Calendula* appartenant à la famille des Astéracées. Une large variété de produits naturels caractérise les espèces de cette famille, les plus rencontrés sont les sesquiterpènes et les sesquiterpènes lactones (Eldahmy *et al.*, 1985 ; San Feliciano *et al.*, 1989) les diterpènes (Stefan Safer *et al.*, 2011), les triterpènes (Calabria *et al.*, 2008), les flavonoïdes (Flamini *et al.*, 2002), triterpènes saponosides (Calabria *et al.*, 2008) et les acides phénoliques.

Cette plante n'a jamais fait l'objet d'étude antérieure offrant ainsi un caractère original à ce travail de recherche.

Notre travail sera présenté comme suit :

- ❖ **Une première partie** englobe la recherche bibliographique, réunit en trois chapitres distincts :
 - **Le 1^{er} chapitre**, concerne l'étude bibliographique. Cette étude commence par une description botanique du genre *Calendula*, suivi par des travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants, reporte également les résultats relatifs aux activités biologiques et l'utilisation dans la médecine traditionnelle des plantes du genre *Calendula*.
 - **Le 2^{ème} chapitre** porte sur une étude des composés phénoliques : les flavonoides et les composés triterpéniques, tout en présentant leurs définitions classifications, biogénèses et propriétés biologiques.
 - **Le 3^{ème} chapitre** présente les différents antioxydants, leurs classifications et leurs modes d'action.
- ❖ **La deuxième partie**
 - Cette partie évoque la présentation des méthodes d'extraction de la plante du genre *Calendula*, à l'étude phytochimique et à l'évaluation des activités, antioxydante (CUPRAC), anti radicalaire (DPPH, ABTS) de cette plante.
 - Enfin, l'interprétation et la discussion des résultats obtenus dans une troisième partie.

CHAPITRE I

***Aspect botanique et études chimiques
antérieures***

I.1. L'ordre Asterales

L'ordre des Asterales est un ordre de dicotylédone qui inclut environ 11 familles selon la classification phylogénétique **APG III (2009)**. Les familles principales sont : les Alseuosmiaceae, les Argophyllaceae, les Asteraceae, les Calyceraceae, les Campanulaceae, les Goodeniaceae, les Menyanthaceae, les Pentaphragmataceae, les Phellinaceae, les Rouseaceae, les Stylidiaceae. Nous traiterons ici la famille des Asteraceae qui renferme le genre *Calendula* que nous avons travaillée.

I.1.1. Les Asteraceae

Le nom Asteraceae vient du mot grec *Aster* qui signifie étoile en relation avec la forme de la fleur (**Crete, 1965**). Aussi appelée Compositae. C'est la plus large famille de Spermatophytes mais également l'une des plus évoluées. Elle comprend en effet entre 1 600 et 1 700 genres et 24 000 à 30 000 espèces (**Funk et al., 2005**). Si on considère le nombre total estimé d'espèces végétales dans le monde, d'environ 298 000 espèces (**Mora et al., 2011**), la famille des Asteraceae regrouperait donc à elle seule entre 8% à 10% des espèces. D'après Quezel et Santa, en Algérie il en existe 109 genres et 408 espèces (**Quazel et santa, 1963**).

I.1.2. Répartition Géographique

Les plantes de la famille des Asteraceae se rencontrent sur toute la surface de la terre sauf l'Antarctique (Figure 1). Il s'agit d'une famille cosmopolite principalement distribuée en région tempérée, subtropicale, ou tropicale, souvent en région montagneuse (**Cronquist, 2001 ; Singh, 2004**)

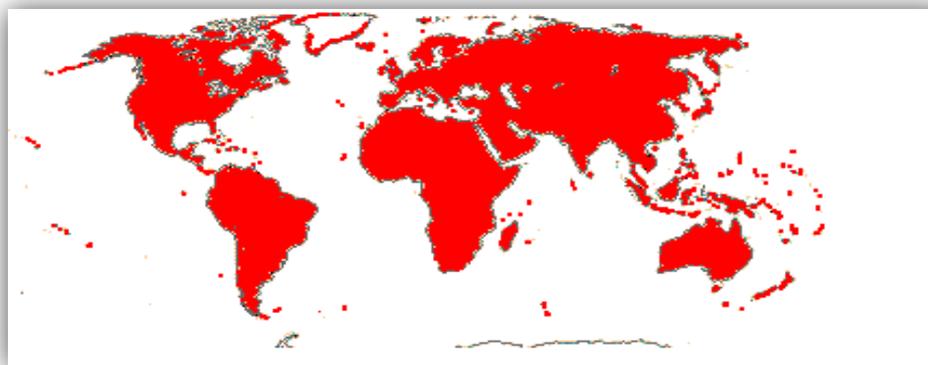


Figure 1 : Carte de répartition géographique des Asteraceae selon l'AP-Website (**Stevens, P. F, 2008**).

I.1.3. Position systématique de la famille Asteraceae

La classification de la famille des Astéracées est très complexe et diverge selon les auteurs. Les plantes appartenant à cette famille ont fait l'objet de nombreux travaux de recherches pour élaborer une classification plus précise de cette grande famille.

Selon la classification établie par **Cronquist, (1988)** les Asteraceae sont des dicotylédones, et cette famille est l'unique représentante de l'ordre des Asterales (Tableau 1).

Tableau 1 : Position taxonomique de la famille des Asteraceae selon **Cronquist(1988)**.

Classification selon Cronquist (1988)	
Règne	Plantae
Sous-Règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermaphytes
Sous-Embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Sous-classe	Asterideae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae

Dans la classification APG (Tableau 2), l'ordre des Asterales contient 11 familles, dont la famille des Asteraceae. La classification n'a pas subi de grands changements depuis la première classification APG I en 1998, si ce n'est des remaniements de familles.

Tableau 2 : Position taxonomique de la famille des Asteraceae selon APG III(2009).

Classification selon APG III	
Classe	Angiospermes
Classe	Eudicotylédones
Classe	Eudicotylédones supérieures
Classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae

La famille des Asteraceae est divisée en sous-familles, elles-mêmes divisées en tribus, bien que leurs nombres, noms et compositions varient selon les auteurs et dans le temps. Ainsi, Bremer en 1994, reconnaissait 3 sous-familles Asteroideae, Barnadesioideae et Cichorioideae, divisées en 17 tribus (**Bremer, 1987, 1994 ; Bremer et al., 1992**).

Deux groupes de chercheurs **Panero et Funk** et **Baldwin et al.**, ont récemment élaboré un nouveau système de classification basé sur des critères de la phylogénie moléculaire. Ils ont pris en compte tous les caractères héréditaires, depuis ce qui est visible (base des classifications traditionnelles) jusqu'aux séquences d'ADN, en passant par les protéines et les données de la paléontologie, divisant cette famille en 12 sous-familles et 43 tribus (figure 2). Ces sous-familles sont : Barnadesioideae, Stifftioideae, Mutisioideae, Wunderlichioideae, Gochnatioideae, Hecastocleidoideae, Carduoideae, Pertyoideae, Gymnarrhenioideae, Cichorioideae, Corymbioideae et Asteroideae. Parmi ces tribus on peut citer : Barnadesieae, Stifftieae, Nassauvieae, Dicomeae, Tarchonanthaeae, Arctotideae, Astereae, Anthemideae, Heliantheae, Cichorieae et Cardueae (**Panero et Funk, 2002, 2007, 2008 ; Baldwin et al., 2002**).

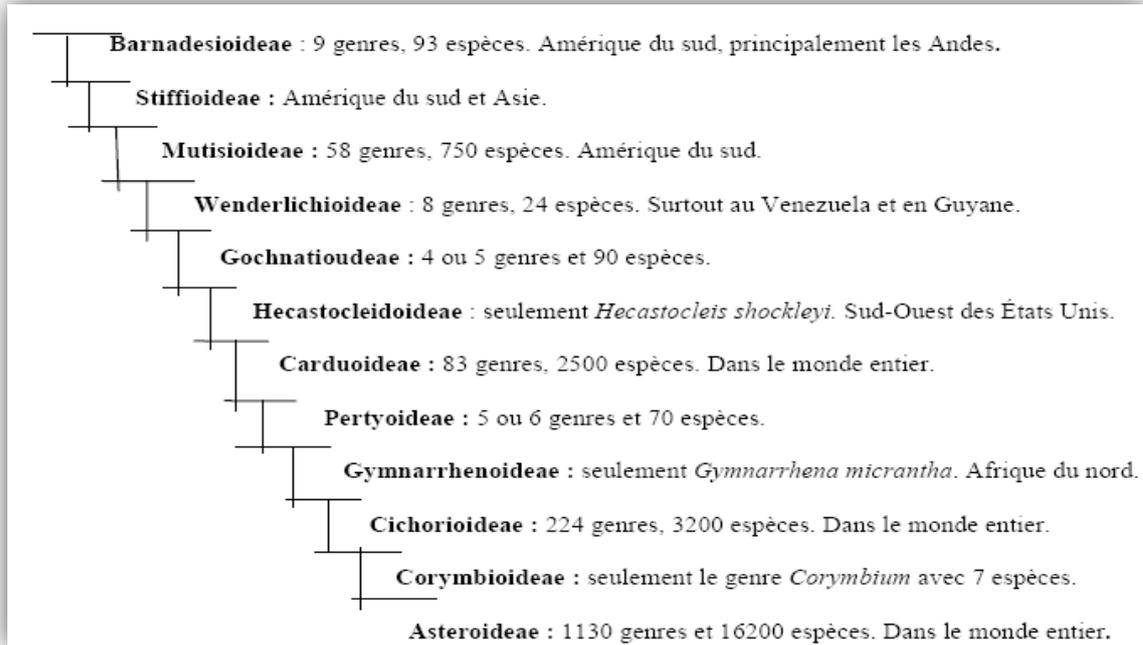


Figure 2 : Classification sous familiale phylogénétique des Asteraceae selon **Panero** et **Funk**.

Il est remarquable que les quatre sous-familles Asteroideae, Cichorioideae, Carduoideae et Mutisioideae comprennent 99% de la diversité spécifique de la famille entière (environ 70 %, 14 %, 11 % et 3 %, respectivement).

I.1.4. Description botanique de la famille Asteraceae

Ce sont généralement des plantes herbacées érigées ou grimpantes, annuelles, bisannuelles ou pérennes, parfois des arbustes et plus rarement des arbres. Certaines peuvent développer un tubercule.

L'aspect de l'appareil végétatif est trop variable pour caractériser les Asteraceae. En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques : le capitule. Le fruit est un akène généralement surmonté d'un Pappus provenant du calice (**Dupont et Guignard, 2012**).

- Les feuilles des Asteraceae sont habituellement alternes, mais peuvent être aussi opposées, parfois en rosettes basales (ou terminales chez les arbustes monocaulés) ou même verticillées. Les feuilles non stipulées sont en général simples, entières ou découpées, parfois composées.

- La fleur des Asteraceae est très particulière : les étamines sont soudées (Figure 3) par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situées des "brosses à pollen". Ceci est adapté à un mode de pollinisation «à piston». La croissance rapide du style permet un brossage du pollen et sa récupération. Une fois que le stigmate a traversé le tube formé par les anthères, les stigmates se déplient et exposent leur face gluante au pollen. Il faut considérer qu'à ce moment-là, du nectar est sécrété.

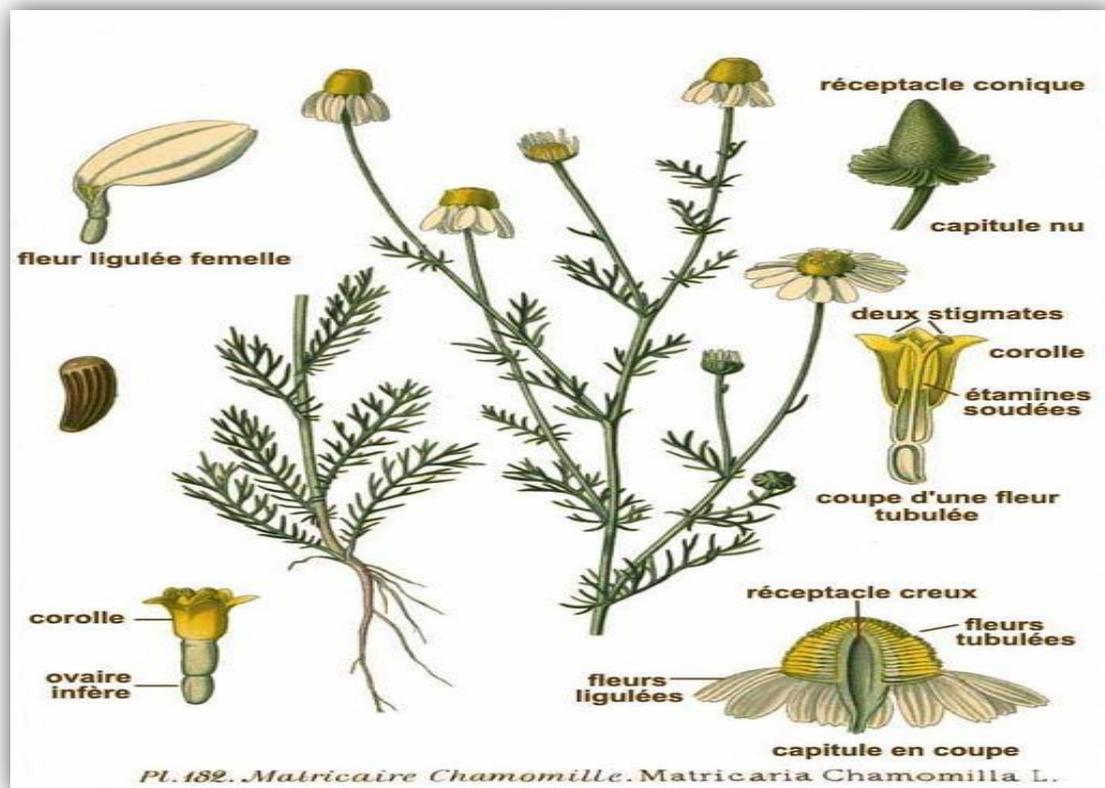


Figure 3 : Représentation schématique de la fleur *Matricaria chamomilla* L
(Asteraceae) ⁽¹⁾

- L'inflorescence en capitule qui comprend un réceptacle sur lequel sont insérées des fleurs formant ainsi une fleur composée, d'où l'ancien nom de la famille (Compositae).



Capitules de *Tussilago farfara* (tussilage pas-d'âne), *Calendula arvensis* (souci des champs), *Aster alpinus* (aster des Alpes), *Pallenis spinosa* (palénis épineux) et *Solidago virgaurea* (solidage verge d'or)



Capitules de *Centaurea pannonica* (centaurée de Pannonie), *Silybum marianum* (chardon-Marie) et *Carlina acanthifolia*

Capitules de *Urospermum dalechampii* (urosperme de Daléchamp), *Cicercita plumieri* (laitue de Plumier) et

Figure 4 : Quelques espèces avec des fleurs ligulées et des fleurs tubulées.

- Le fruit est un akène. généralement surmonte d'un Pappus (**Dupont et Guignard, 2012**).



Figure 5 : Le fruit de *Sonchus oleraceus* L(Asteraceae) ⁽²⁾

I.1.5. Etudes chimiques antérieures

La recherche bibliographique exhaustive réalisée sur les espèces de la famille Asteraceae montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler et identifier un grand nombre de métabolites secondaires. Les plus rencontrés sont les sesquiterpènes et les sesquiterpènes lactones (**Eldahmy et al., 1985 ; San Feliciano et al., 1989**) les diterpènes (**Stefan Safer et al., 2011**) et les triterpènes (**Calabria et al., 2008**) les flavonoïdes (**Flamini et al., 2002**) triterpènes saponosides (**Calabria et al., 2008**), Les acides phénoliques etc...

I.1.6. Utilisations économiques et thérapeutiques des Asteraceae

- ✓ Certaines espèces d'Asteraceae sont des plantes ornementales, comme les asters, les dahlias, les chrysanthèmes, les gerberas, les zinnias et les genres *Helichrysum* et *Tagetis* (**Singh, 2004**).
- ✓ Les espèces d'Asteraceae ont aussi une place à tenir dans la recherche de nouvelles énergies renouvelables puisque les huiles de tournesol et de carthame ont été identifiées comme huiles végétales prometteuses dans la fabrication de biocarburants (**Demirbaş et Kara, 2006 ; Sensöz et Angin, 2008**). Ces huiles sont transformées en biofuel notamment grâce à différents procédés de trans-estérification des triglycérides (**Ma et Hanna, 1999**). L'amélioration de ces procédés de transformation reste un enjeu pour l'obtention d'un biocarburant de qualité (**Antolin et al., 2002 ; Calero et al., 2014 ; Yin et al., 2012**).
- ✓ Le guayule (*Parthenium argentatum*), seconde source de caoutchouc naturel, exploité au début du siècle et en période de crise (1940-1945), pourrait reprendre une place économique importante. Grâce à la sélection variétale et à la stimulation de la production du caoutchouc dans la plante, les rendements à l'hectare vont approcher ceux de l'hévéa. Les procédés d'extraction du caoutchouc ont été améliorés récemment et donnent un caoutchouc identique à celui de l'hévéa (**Serier, 1979**).
- ✓ D'après les nutritionnistes, l'huile de tournesol (*Helianthus annuus*) a d'excellentes qualités diététiques, par exemple pour combattre le diabète (**Shivani et Sunil, 2013**). C'est également une bonne source de vitamine E. L'huile de tournesol entre dans la composition des margarines. Elle sert aussi à la fabrication de savons et de cierges. On l'utilise souvent pour mettre comme huile dans les pâtes, ou d'autres aliments (**Amsol et Prolea, 2002**).

- ✓ Les feuilles jeunes de la chicorée (*Cichorium intybus*) sont utilisées en salades, les feuilles cuites en légume et les racines torréfiées de chicorée à café pour fabriquer un succédané de café plus digeste, en particulier mélangé au lait. Il y a 50 ans, dans les campagnes françaises, le "café" était souvent de la chicorée ou un mélange chicorée-café. De plus, la racine de chicorée est traditionnellement utilisée pour participer à la perte de poids, en complément de mesures diététiques, et pour favoriser l'élimination rénale de l'eau. En effet, une étude a permis de mettre en évidence l'efficacité de l'inuline sur la réduction des taux de lipides dans le sang (**Brighenti, 2007**). La chicorée permettrait une meilleure absorption du calcium et du magnésium, notamment chez les adolescents et les femmes ménopausées (**Adolphi et al., 2009**).
- ✓ Les tubercules de (*Helianthus tuberosus*) se consomment cuits de diverses manières : en salade, chauds en accompagnement, frits, en purée, sautés au beurre, etc. On peut aussi les consommer crus, râpés ou coupés en lamelles, comme des crudités dans de la vinaigrette.

La famille des Asteraceae fournit des espèces très importantes d'un point de vue thérapeutique, ce qui n'est pas surprenant étant donné le nombre de genres qu'elle contient.

De nombreuses espèces sont utilisées en médecine traditionnelle et sont associées à un panel d'activités thérapeutiques aussi large que la diversité de cette famille.

Dans de nombreux cas, l'effet thérapeutique de ces plantes médicinales a été corrélé à la présence de métabolites secondaires de types lactones sesquiterpéniques, caractéristiques de cette famille.

- L'un des cas les plus connus certainement est celui de l'artémisinine, lactone sesquiterpénique aux propriétés antipaludiques, isolée de *Artemisia annua*, longtemps utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour cet usage (**Graziose et al., 2010**).
- D'autres exemples peuvent être cités. Il a été démontré notamment que deux espèces d'arnica, *Arnica montana* et *Arnica chamissonis* ssp. *foliosa*, utilisées traditionnellement dans le traitement des contusions, hématomes, rhumatismes et inflammation de la peau synthétisaient l'hélénaline, la 11 α ,13-dihydrohélénaline et le chamissonolide, lactones sesquiterpéniques pour lesquelles des propriétés anti-inflammatoires ont été mises en évidence, validant leur usage traditionnel (**Lyß et al., 1998**).

- *Arnica* (*Arnica montana*) est utilisée en médecine pour soigner les troubles cardiaques et respiratoires, elle permet aussi de réduire la douleur relative à une pique d'insecte. Possédant des propriétés immunologiques, *Arnica montana* constitue aussi un remède pour certains états infectieux avec adynamie et les affections dues à la fragilité du derme (Alaniz et al., 2010).
- La décoction de bleuet (*Centaurea cyanus*) était prescrite en cas d'irritation des yeux et des paupières et pour lutter contre la conjonctivite, et plus généralement pour les inflammations de la peau et des muqueuses et en cosmétologie (Millanvoye, 1986).
- Le carthame (*Carthamus tinctorius*) est un anti-inflammatoire et permet de stabiliser la tension artérielle. La plante est aussi très efficace pour venir à bout des maladies cardiovasculaires. Le carthame dispose aussi d'une propriété qui permet d'éliminer les mauvais cholestérols de l'organisme humain (Asp et al., 2011).
- Traditionnellement, la racine de l'eupatoire chanvrine (*Eupatorium cannabinum*) est reconnue comme douée de propriétés cholagogues et laxatives. La plante (feuilles, fleurs et racines) est recommandée pour pallier des troubles du foie ou des reins. Cependant, l'eupatoire contient des alcaloïdes pyrrolizidiniques, et présente donc une toxicité à forte dose ou en usage prolongé.

Actuellement, 43 espèces d'Asteraceae sont inscrites dans la liste des plantes médicinales de la Pharmacopée française (11^{ème} Edition).

Les propriétés biologiques attribuées aux Asteraceae sont très nombreuses, notamment des propriétés antitumorale, cytotoxique, immunosuppressive, antioxydante, antiacétylcholinestérase, antimicrobienne, antivirale, antifongique, leishmanicide, trypanocide, antipaludique, hépatoprotective, cytotoxique, larvicide, antiulcéreuse, anti-inflammatoire, antinociceptive, antitussive, expectorante, antidiabétique et hémolytique. Cette liste est loin d'être exhaustive (Zheng et al., 2013 ; Wang et al., 2014 ; Hussain et al., 2013 ; Arora et al., 2013 ; Abad et al., 2012).

I.2. Présentation du genre *Calendula*

Le nom latin *Calendula* aurait son origine aux « Calendes », parce que plusieurs espèces de ce genre fleurissent à toutes les calendes, qui étoient le premier jour de chaque mois chez les Romains. Le genre *Calendula* L. connu aussi par plusieurs dénominations : « Souci » en français, « Marigold » en anglais est par son nom vernaculaire « Djamir, Razehima » en arabe (Quezel et Santa, 1963).

Les plantes aiment particulièrement le soleil. D'ailleurs, le nom « souci » est tiré du latin « solsequia » qui signifie littéralement « qui suit le soleil ». Ainsi, les fleurs de *Calendula* s'ouvrent au petit matin et se referment en même temps que le coucher du soleil. (Baillon et del Castillo, 1886).

I.2.1. Description botanique du genre *Calendula*

Calendula est un genre d'environ 20 espèces de plantes herbacées annuelles ou vivaces de la famille des Asteraceae ordinairement couvertes d'un fin duvet plus au moins glanduleux et odorantes.

D'un point de vue botanique, les plantes du genre *Calendula* sont caractérisées par :

- Les capitules hétérogame, multiflores et radies, bractées de l'involucre dispose en deux séries alternes, étroitement scarieuses sur les bords. Réceptacle plan jusqu'à l'anthèse puis légèrement convexe.
- Les feuilles sont alternes, sinuées ou dentées. Les fleurs sont réunies au sommet des rameaux en capitules stipités.
- Les fleurs marginales femelles et fertiles sur deux rangs, à ligule entière ou tridentée. Fleurs du disque hermaphrodites, stériles, tubuleuse a cinq dents. Les fleurs sont de couleurs jaunes ou orangées, à odeurs souvent forte, peu agréables.
- Les Akènes sont de morphologie très spéciales, constitués par un prisme triangulaire présentant une face dorsale ou externe et convexe et deux faces latérales planes (Quezel et Santa, 1963).



Figure 6 : Illustrations de *Calendula officinalis* (Souci des jardins) ⁽³⁾

I.2.2. Répartition géographique du genre *calendula*

Le genre *Calendula* est réparti en Europe moyenne et méridionale, les îles occidentales de l'Afrique du nord, la région méditerranéenne et l'Orient (**Baillon, 1886**) (figure 7)

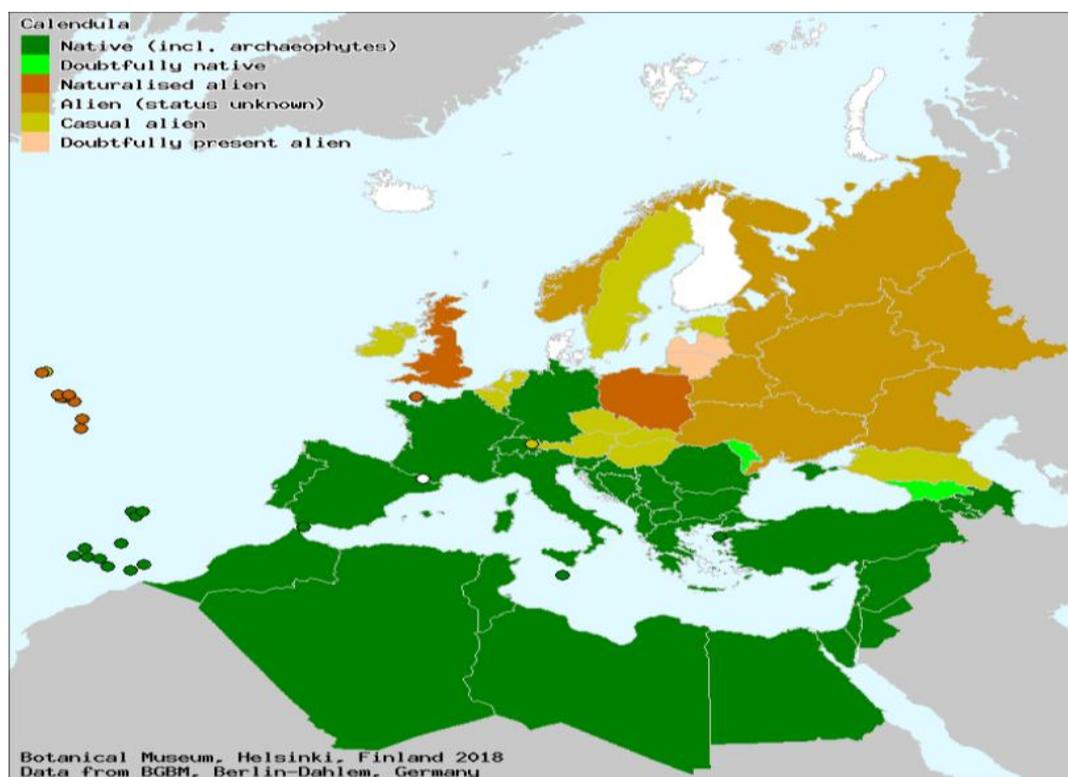


Figure 7 : Carte géographique du genre *Calendula* ⁽⁴⁾

D'après **Quezel et Santa (1963)**, en Algérie, le genre *Calendula* est représenté par sept espèces (et près de vingt-six variétés) qui sont :

- 1) *C. regyptiaca* Desf
- 2) *C. arvensis* L.
- 3) *C. bicolor* Raf.
- 4) *C. Monardi* B. et R.
- 5) *C. fulgida* Raf.
- 6) *C. tomentosa* Desf.
- 7) *C. suffruticosa* Vahl

I.2.3. Classification systématique du genre *Calendula*

Selon la classification actuelle des angiospermes (APGIII 2009) cette famille est située dans l'ordre des Asterales

Tableau 3 : Position taxonomique du *calendula* selon APGIII 2009.

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Dicotylédones
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Sous-famille	<u>Asteroideae</u>
Tribu	Calenduleae
Genre	<i>Calendula</i>

I.2.4. Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Calendula*

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du genre *Calendula*, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires. Les substances dominantes sont les triterpènes avec un grand pourcentage de saponines et triterpènes (Marukami *et al.*, 2001 ; Lehbili *et al.*, 2017) suivi des sesquiterpènes (Pizza et De Tommasi, 1988) et caroténoïdes, en parallèle un bon nombre de flavonoïdes et d'acides phénoliques a été isolés (Ukiya *et al.*, 2006 ; Marukami *et al.*, 2001 ; Ćetković *et al.*, 2003).

I.2.5. Domaines d'applications et intérêt en phytothérapie

I.2.5.1. Utilisation en médecine traditionnelle

La phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes - ou la seule "partie active"- ayant des propriétés thérapeutiques. Elles sont regroupées dans la catégorie des plantes médicinales. L'utilisation thérapeutique des plantes et surtout leur choix ne se trouvent pas dans leur origine systématique, mais bien dans les découvertes fortuites de leurs propriétés thérapeutiques de façon empirique au cours des siècles. Ce qui a permis à l'humanité

d'accumuler d'importantes connaissances sur les plantes médicinales et de transmettre leurs vertus de génération à génération.

Le souci était déjà utilisé en cuisine, en médecine et en cosmétique par les civilisations indiennes, arabes et grecques de l'antiquité. Les fleurs et les racines de cette plante sont utilisées pour Traiter les inflammations de la peau, eczéma et des muqueuses de la bouche et de la gorge, les plaies et les ulcères variqueux, antiseptique, antifongique, antiviral, cholérétique et emménagogue (**Goetz, 2009**). Cette plante est aussi utilisée pour traiter les infections bactériennes de la sphère oto-rhino-laryngologie (**Daoudi et al., 2015**).

De même, Bammou *et al* (2015) ont rapporté l'usage de cette espèce pour traiter les affections du tube digestif, dermatologiques, et celles de système respiratoire (**Bammou et al., 2015**).

Le souci est capable d'offrir une cardioprotection en stimulant la pression du ventricule gauche, le flux aortique, en réduisant la taille d'un éventuel infarctus myocardique, et l'apoptose des cardiomyocytes. Il modifie le signal létal par ischémie en un signal de survie en modifiant la voie de l'oxydation et de l'inflammation (**Ghédira et Goetz, 2016**).

Des travaux scientifiques ont été effectués pour confirmer ou infirmer certains usages traditionnels de cette plante comme les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antibactériennes et emménagogues (**Hmamouchi, 1999**).

En Algérie, *C. officinalis*, *C. arvensis* et *C. algeriensis* sont utilisées depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour calmer les douleurs de tête et de dents, et comme antiseptique et vulnéraire. En usage interne, une infusion obtenue des fleurs est utilisées dans les cas d'engorgement du foie, de céphalées et comme dépuratif. En usage externe, la décoction serait utile pour soigner les affections des yeux (en application sous forme de compresses), les brûlures, ulcères, les crevasses, les abcès, les furoncles, l'acné, les engelures, les irritations cutanées, l'eczéma et les plaies de toute nature. Le principe colorant contenu dans les fleurs pourrait être utilisé comme colorant pour teindre les cheveux (**Baba Aissa, 1991**).

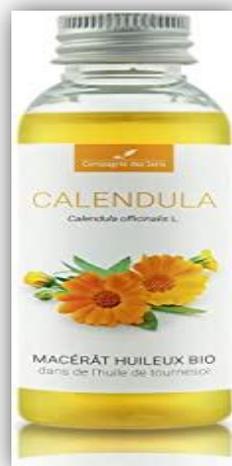
I.2.5.2. Utilisation en cosmétologie

C. officinalis est actuellement utilisée en cosmétologie, on trouve différentes préparations sur le marché, notamment les pommades pour bébé, huile de massage, crème protectrice pour le visage et des savons.

L'extrait de *C. officinalis* entre dans la composition des produits de beauté comme les crèmes, le lait corporel, les dentifrice préparées par les laboratoires **Weleda** et **Yves Roch**



Le macérât huileux de *Calendula* préparé par La Compagnie des Sens est utilisé en cosmétique, pour l'hydratation de la peau, des cheveux, des cils, des ongles, mais aussi dans la fabrication des produits cosmétiques maison (savons, crèmes, baumes... etc).



Une gamme de produits contenant des extraits de *C. glabrum*, *C. villosum*, *C. coriaceum* et *C. brasiliense* est commercialisée au Japon, au Canada et en Angleterre par les laboratoires Lion Corp® (shampooing antipelliculaire, crèmes de soin pour cheveux, crème et émulsions à usage cosmétique...).

I.2.6. Quelques Activités biologiques du genre *Calendula*

✓ **Activité antioxydante**

Les extraits aqueux et hydroalcooliques du *C. officinalis* sont capables d'éliminer complètement les radicaux libres du système de Fenton ainsi que d'autres systèmes oxydatifs avec la même efficacité que le BHA synthétique (antioxygène) (**Gordana et al., 2004**).

En 2011 l'équipe de **Ercetin et al., (2012)**, ont réalisé des travaux sur les extraits des feuilles et fleurs de *C. arvensis* et *C. officinalis* et ils ont montré que les extraits de méthanol et d'acétate d'éthyle de fleurs de *C. arvensis* avait la plus forte activité de piégeage des radicaux DPPH .

L'extrait de *C. officinalis* a été trouvé pour piéger les radicaux superoxydes génères par la photoréduction de la riboflavine et des radicaux hydroxyles génères par la réaction de Fenton et a inhibé la peroxydation lipidique in vitro. L'extrait a également piégé l'oxyde nitrique et la IC₅₀ s'est révélée être de 575 mg/mL. L'extrait a également produit un piégeage dose-dépendante de l'oxyde nitrique en culture. L'administration orale d'extrait de *Calendula* a inhibé la production de superoxyde dans les macrophages *in vivo* de 12.6% et de 38.7% à des doses de 100 et 250 mg/kg. L'administration orale d'extrait *Calendula officinalis* à des souris pendant 1 mois a augmenté significativement l'activité de la catalase. L'extrait a produit une augmentation significative des niveaux de glutathion dans le sang et le foie. La glutathion réductase a été augmentée, alors que la glutathion peroxydase s'est avérée être diminuée après l'administration de l'extrait de *Calendula* (**Preethi et al., 2006**).

✓ **Activité anti-inflammatoire**

- Le souci (*Calendula officinalis*) présente un effet complexe : il est anti-inflammatoire, anti-infectieux, épithéliogène (comparable à l'allantoïne) et exerce une action cicatrisante des caroténoïdes (provitamine A).
- L'extrait aqueux de *calendula* a des effets de réduction de l'inflammation et de la toxicité liée à des radiations ionisantes (**Hu et al., 2014**). L'extrait de *C. officinalis* accélère la guérison de la mucosité orale du hamster entraînée par 5-FU (60 mg/kg) (**Tanideh et al., 2012**).
- *C. officinalis* possède une action anti-inflammatoire due à ses extraits aqueux par voie interne et externe (envers l'œdème à la carragénine et l'érythème au thurfynolnicotinate) (**Peyroux et al., 1981 ; Mascolo et al., 1987**).

- La production de TNF-alpha par une culture de macrophages traitée avec du lipopolysaccharide (LPS) s'est révélée significativement inhibée par l'extrait de *Calendula*. De plus, des niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires IL-1beta, IL-6, TNF-alpha et IFN-gamma et de protéine de phase aigüe, protéine C-réactive (CRP) chez des souris produites par injection de LPS ont été inhibés de façon significative par l'extrait. Les niveaux de cyclooxygénase-2 (Cox-2) induits par le LPS chez la souris ont également été inhibés par le traitement par l'extrait (**Preethi, 2009**).
- L'application en usage externe à des souris d'un extrait éthanolique à 70% des fleurs à une dose de 1,2 mg/oreille (correspondant à 4,16 mg de drogue brute) a réduit de 20% l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton. L'application externe d'un extrait au dioxyde de carbone supercritique des fleurs (à raison de 300 mg/cm²) supprime l'œdème de l'oreille chez les souris induit par l'huile de croton.
- Les esters de faradiol isolés à partir des fleurs (administrés à raison de 240 mg/cm²) inhibent l'œdème de l'oreille chez la souris induit par l'huile de croton (**Zitterl-Eglsseer et al., 1997**). L'administration intra gastrique d'un extrait aqueux de fleurs (100 mg/kg de poids corporel) inhibe l'œdème plantaire induit par la carragénine chez le rat (**Peyroux et al., 1981**).

✓ **Action utérotonique**

L'extrait alcoolique de *C. officinalis* exerce in vivo une action utérocontractrice et vasodilatatrice au niveau de la muqueuse utérine. Ceci explique la réputation des fleurs de souci d'être emménagogues (**Shipochliev, 1981**).

✓ **Activité antimicrobienne**

L'effet antimicrobien des extraits hydroéthanoliques des fleurs et pétales de *C. officinalis* à différentes concentrations a été évalué contre huit types de bactéries (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* et *Enterococcus pneumoniae*). Les extraits de pétales étaient plus actifs contre toutes les bactéries en particulier *Pseudomonas aeruginosa* (zone d'inhibition de 25mm à la concentration de 100 mg/mL), et *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 14 mm à la concentration 50 mg/mL) ; tandis que les extraits des fleurs étaient moins efficaces que la partie des pétales (**Hamad et al., 2017**).

✓ **Activité antivirale**

Une teinture des fleurs supprime *in vitro* la réplication des virus de l'herpès simplex, de la grippe A2 et de la grippe APR-8 (Bogdanova *et al.*, 1970).

L'extrait chloroformique des fleurs inhibe *in vitro* la réplication du VIH-1 dans des cellules lymphocytaires sévèrement infectées MOLT-4 (IC₅₀ 0,4 mg/ml) (Kalvatchev *et al.*, 1997).

L'extrait chloroformique a également inhibé l'activité de la transcriptase inverse du VIH-1 de manière dose dépendante (DE₅₀ 51,0 mg/ml) (Kalvatchev *et al.*, 1997).

✓ **Activité anti-tumoral**

Les extraits de *Calendula* sont cytotoxiques et antigénotoxiques. Une nouvelle technique d'extraction LACE (laser activated *calendula* extract) montre que *in vitro* une inhibition de la croissance cellulaire par arrêt du cycle et par activation de l'apoptose (Jimenez *et al.*, 2006).

✓ **Activité immuno-modulateur**

Calendula a la capacité de stimuler le système immunitaire, il est clair qu'il existe à la fois suppression de l'inflammation et de l'infiltration des lymphocytes. En 2000, la capacité significative de stimuler la prolifération en présence de CMH complexe a été mise en évidence (Amirghofran *et al.*, 2000).

✓ **Activité anti-œdémateuse**

Les activités anti-œdémateuses de 2 esters du faradiol : faradiol-3-ester d'acide myristique, ester d'acide faradiol-3-c-palmitique ainsi que le c- taraxastérol ont été testées au moyen de l'inhibition de l'œdème de l'oreille de souris induit par l'huile de croton. Les deux esters du faradiol ont montré une activité anti-œdémateuse pratiquement identique et dose-dépendante. Le monol libre, c-taraxastérol, a eu un effet légèrement inférieur. En outre, le faradiol était plus actif que ses 2 esters et c-taraxastérol et a montré le même effet qu'une dose équimolaire de l'indométacine (Zitterl-Eglseer *et al.*, 1997).

✓ **Activité cardiovasculaire**

C. officinalis est capable d'offrir une cardioprotection en stimulant la pression du ventricule gauche, le flux aortique, en réduisant la taille d'un éventuel infarctus myocardique, et l'apoptose des cardiomyocytes. Il modifie le signal létal par ischémie en un signal de survie en modifiant la voie de l'oxydation et de l'inflammation (activation de l'Akt et du Bcl2, dépression du TNF α).

CHAPITRE II

Les Métabolites Secondaires

II.1. Les composés phénoliques

II.1.1. Généralités

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Urquiaga et Leighton, 2000**). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Macheix *et al.*, 2005**). Cependant, ils ont tous la même origine, la voie de phénylpropanoïde précédée par la voie de shikimate.

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle de signaux de reconnaissance entre les plantes (allélopathie), soit lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. Ces composés jouent donc un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix *et al.*, 2005**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...etc) (**Macheix *et al.*, 2005**).

Parmi les nombreux composés phénoliques que sont les flavonoïdes, acide benzoïques, acides hydroxycinnamiques, coumarines, stilbènes, subérines et les lignanes, nous nous intéresserons aux flavonoïdes. D'une part parce qu'ils sont plus représentés dans notre étude et d'autre part parce qu'ils présentent quelque fois des activités biologiques importantes.

II.1.2. Les flavonoïdes

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes, et à ce jour, plus de 6500

structures naturelles ont été isolées et caractérisées, répartie en 12 squelettes de base. Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C₁₅ caractérisée par un enchaînement C₆-C₃-C₆ (1,3-diphénylpropane); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (Figure 8) (De Rijke *et al.*, 2006).

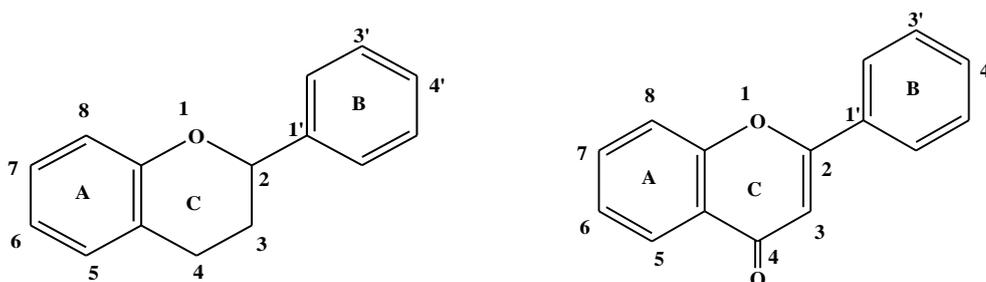


Figure 8 : Structures du 2-phényl chromane ou noyau flavane (à gauche) et du 2-phényl chromone (à droite).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E. Chevreuil en 1814, mais ont été réellement découverts en 1937, par Albert Szent-Györgyi, qui mit en exergue leur influence pour réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ils se trouvent d'une manière systématique dans toutes les plantes vasculaires, comme celles appartenant aux familles des Asteraceae et des Fabaceae. Ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, flavanols, dihydroflavonols, isoflavones, chalcones, aures, anthocyanes et les tanins.

II.1.2.1. Structures chimiques et classification

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation, du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe se distinguent par les substitutions des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes, existent : les flavones, flavanols, flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavane-3,4-diols, chalcones, aures, anthocyanes et isoflavones (Figure 9) (Bruneton, 1999 ; Harborne, 1980).

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme *C*- ou *O*-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les *O*-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les *C*-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (**Bruneton, 1999**).

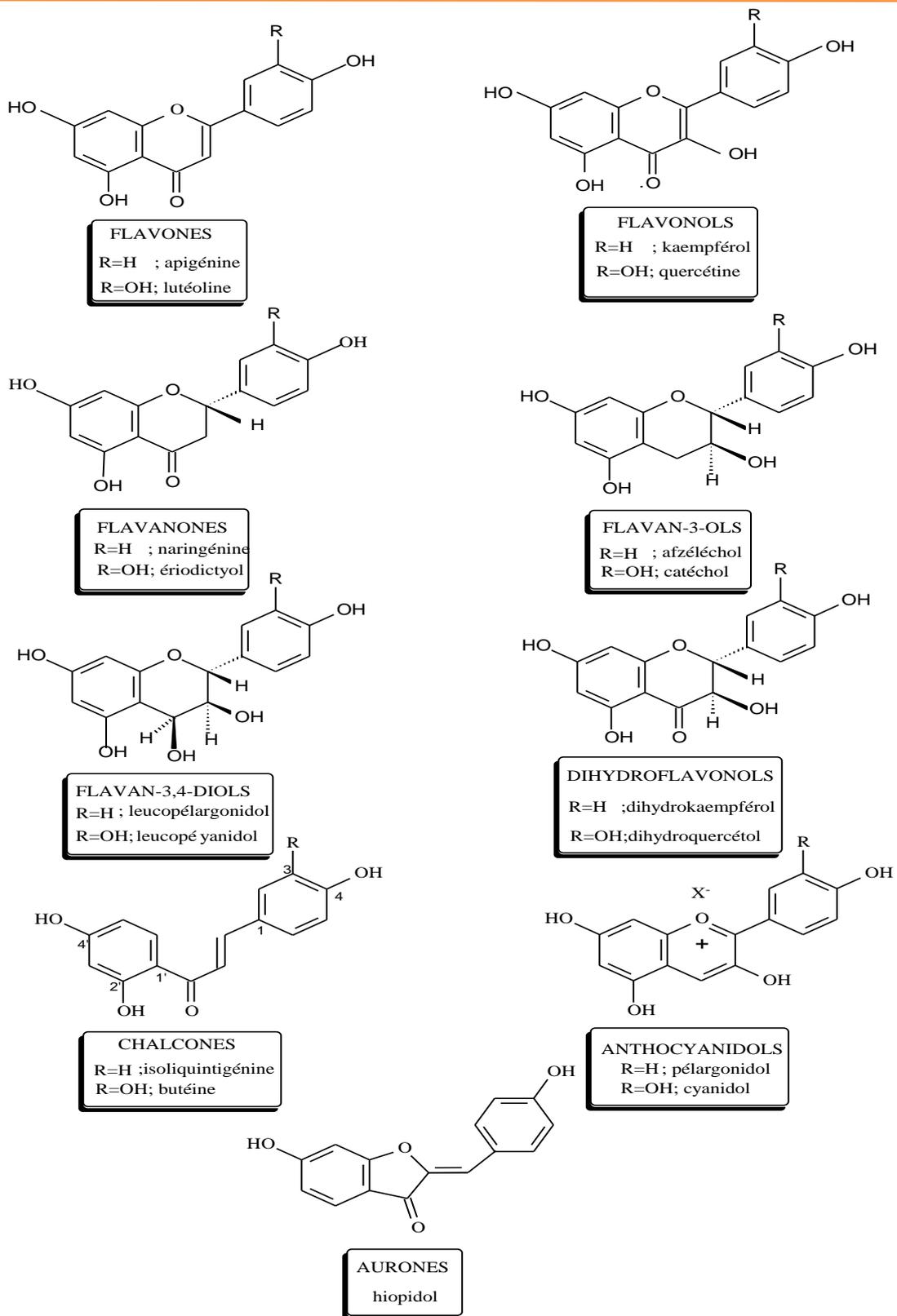


Figure 9 : différentes classes de flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont le plus souvent constitués d'unités osidiques se fixant sur le squelette de base ou l'aglycone quand celui-ci est notamment porteur de groupements

hydroxyles. La partie osidique peut être mono, di ou trisaccharidique. Les monosaccharides sont généralement le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose. En règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui sont les sites de glycosilation (**Bruneton, 1993**).

II.1.2.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Au plan biosynthétique, les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune, ils résultent de la condensation de 3 unités de malonyl-CoA en formant le noyau A, et d'un acide cinnamique activé qui sera à l'origine du noyau B et de la chaîne propanique. Cette condensation est catalysée par la chalcone synthétase (CHS), enzyme-clé dans la formation des flavonoïdes, qui conduit à un précurseur appelé la chalcone (Figure 10).

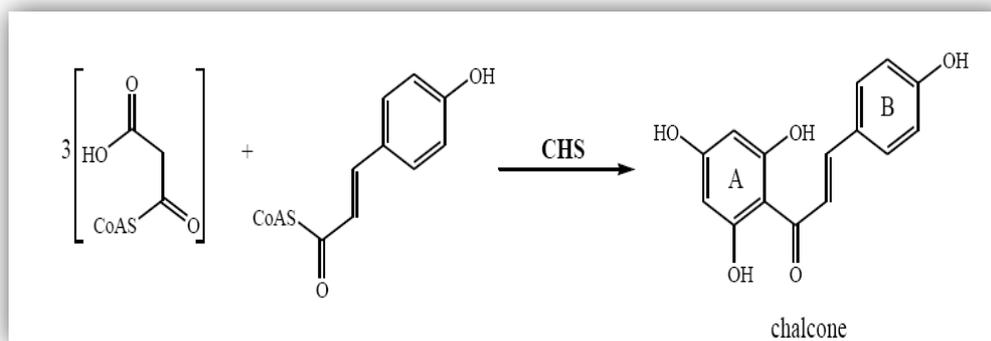


Figure 10 : Formation de la chalcone.

La chalcone néoformée donne une 2S-flavanone (la naringénine), par une transformation stéréospécifique catalysée par une chalconeisomérase (CHI). La naringénine est au centre de la synthèse de différentes classes de flavonoïdes par l'action d'enzymes diverses (Figure 11). Les flavonesynthases (FSI) introduisent une double liaison en 2,3 pour donner une flavone. La flavanone-3-hydroxylase (F3H) catalyse l'hydroxylation en position 3 d'une 2S-flavanone pour donner un (2R,3R)-dihydroflavonol. Le dihydroflavonol peut ensuite être transformé en flavonol par la flavonol-synthase (FLS), ou bien en leucoanthocyanidine par le dihydroflavonol réductase (DFR). L'anthocyanidine synthase (ANS) conduit ensuite à l'anthocyanidine qui va, à son tour, être glycosylée par la glycosyltransferase (GT) formant

un anthocyane, la pélagonidine-3-O-glucoside. La catéchine est formée par action de DFR sur la leucoanthocyanidine (Winkel-Shirley, 2001).

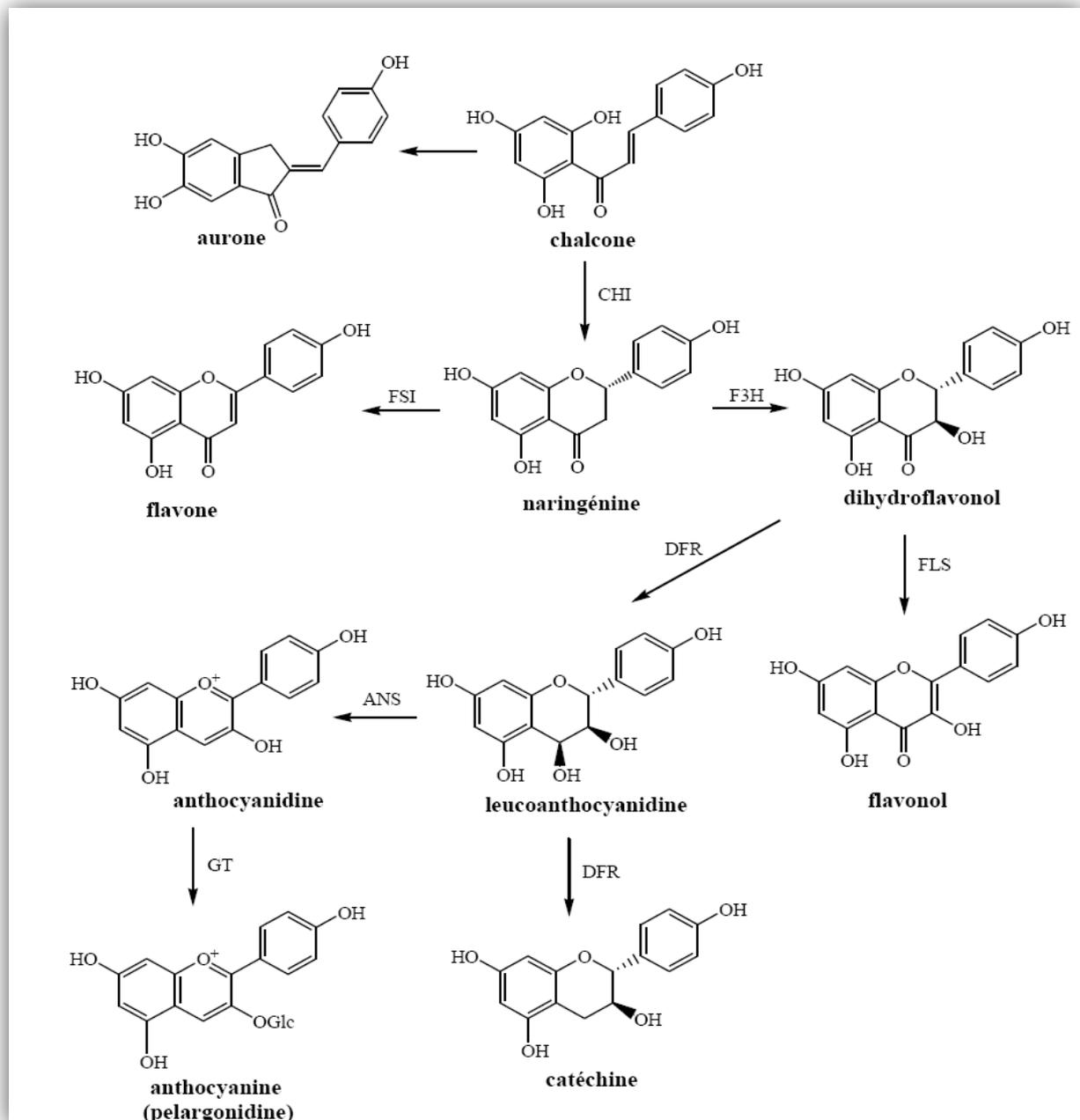


Figure 11 : Schéma conduisant aux différentes classes de flavonoïdes.

II.1.2.3. Quelques activités biologiques des flavonoïdes

✓ Propriétés anti-radicalaires

Les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement prises en compte dans le domaine médical où on leur reconnaît diverses activités très intéressantes : anti-inflammatoire, antivirale, antibactérienne, anti-allergique et antitumorale (**Xu et al., 2007**).

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été exploitée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox (**Rice-Evans et al., 1996**), les flavonoïdes sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde par transfert d'hydrogène.

L'activité anti-radicalaire des flavonoïdes (**Halbwirth, 2010 ; Kale et al., 2008 ; Mladinka et al., 2010 ; Rufer et Kulling, 2006**) est conditionnée par :

- Pour le cycle C : la présence d'une double liaison en 2,3 avec un groupement oxo en 4 et une hydroxylation en 3
- Pour le cycle A : une dihydroxylation en 5 et 7
- Pour le cycle B : une *ortho*-dihydroxylation

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (**Halbwirth, 2010 ; Leopoldini et al., 2010**). Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule (**Halbwirth, 2010**). Les 3 sites de chélation principaux (**Mladinka et al., 2010**) se situent :

- Entre l'hydroxyle en position 5 et le carbonyle en position 4
- Entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en position 4
- Entre les deux hydroxyles en positions 3' et 4' sur le cycle B

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante (**Middleton et al., 2000**).

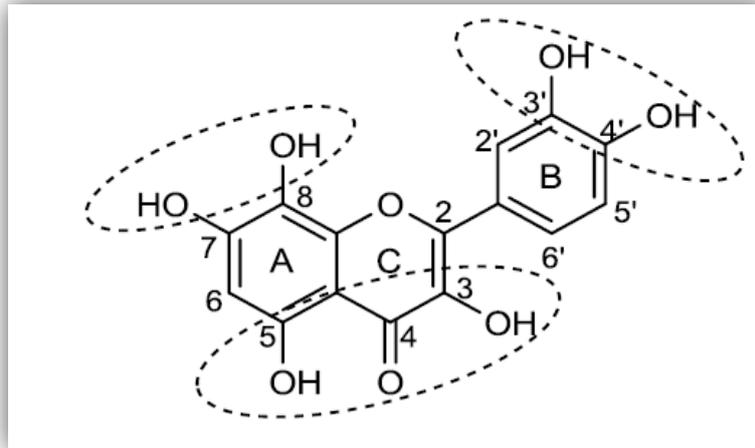


Figure 12 : Critères structuraux essentiels pour une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (Amić *et al.*, 2003).

✓ Propriétés anticancéreuses

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement ; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses. D'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. En effet certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) présentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate. Ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques i.e. FAS (Fatty Acid Synthase) (Brusselmans *et al.*, 2005).

Des travaux montrent aussi que la lutéoline a une activité cytotoxique modérée contre les cellules humaines BC de cancer du sein avec une valeur de IC_{50} de 38 μ M et contre les cellules NCI-H187 de cancer du poumon avec une IC_{50} de 19 μ M. L'acacétine montre également un effet modéré avec une IC_{50} de 25 μ M sur les cellules NCI-H187.

L'équipe de Deng *et al.* a montré que la (*S*)-5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone (naringenin-7,4'-diméthyléther) a un effet cytotoxique contre les cellules LNCaP de cancer de prostate hormono-dépendant, les cellules Lu1 de poumon humain et les cellules MCF-7 humaines de cancer du sein, avec des valeurs de DE_{50} de 6.7, 4.7 et 1.1 μ M, respectivement. (Deng *et al.*, 2010).

La genkwanin 4'-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside] et sakuranetin 4'-O-[α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside], isolés de *Chromolaena odorata* ont été évalués *in vitro* pour leur activité cytotoxique contre les lignées cellulaires

cancéreuses LLC et HL-60. Le composé genkwanin 4'-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside] a montré une cytotoxicité contre les lignées de cellules cancéreuses LLC et HL-60 avec des valeurs de IC₅₀ respectives de 28.2 et 11.6 μ M. Le composé sakuranetin 4'-O-[α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside] a montré une faible activité cytotoxique contre LLC (valeur IC₅₀ supérieure à 50 μ M).

✓ **Activité antibactérienne**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes. Des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules. Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes (quercétrine chez le cochon d'inde infectés par *Shigella*, sophoraisoflavone en injection intrapéritoneale chez des souris infectées par *Salmonella typhimurium*) (Cushnie *et al.*, 2005).

Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5-hydroxyisoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp.* l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens (Cushnie *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. coli*, là encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle à l'activité. Certains pourraient inhiber la topoisomérase IV et ainsi perturber la décaténation et le clivage de l'ADN, provoquant un message SOS et une inhibition de la croissance bactérienne. La sophoroflavanone G, certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2,4,2'-trihydroxy-5'-methylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH cytochrome c réductase (Cushnie *et al.*, 2005).

✓ **Activité antifongique**

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (Grayer *et al.*, 1994). Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) sont actives contre *Candida albicans*. Alors que

plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus* (Cushnie *et al.*, 2005).

Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008 ; Grayer *et al.*, 1994). De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparaît comme importante pour l'activité mais pas essentielle (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

✓ **Activité anti-inflammatoire**

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations. Ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (González-Gallego *et al.*, 2007) et certains sont capables d'inhiber l'histamine (Kim *et al.*, 2004).

II.1.3. Composés triterpéniques

II.1.3.1. Généralités

Les triterpènes sont un groupe très diversifié de produits d'origine naturelle largement présents chez les plantes (Vincken *et al.*, 2007). Au moins, 4000 composés triterpéniques avec des squelettes hydrocarbonés différents sont répertoriés. Ce sont des composés en C-30 issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxy-squalène (Figure 13), ou plus rarement du squalène lui-même (Bruneton, 1999 ; Manitto, 1981 ; Dey et Harborne, 1991).

Ils sont très souvent hydroxylés en position C-3 du fait de l'ouverture de l'époxyde (Thimmappa *et al.*, 2014). Les triterpènes présentent une très forte unité structurale. Les différences majeures sont d'ordre stéréochimique, ayant trait à la conformation adoptée par l'époxy-squalène avant la cyclisation initiale (Bruneton, 1999 ; Manitto, 1981 ; Dey et Harborne, 1991).

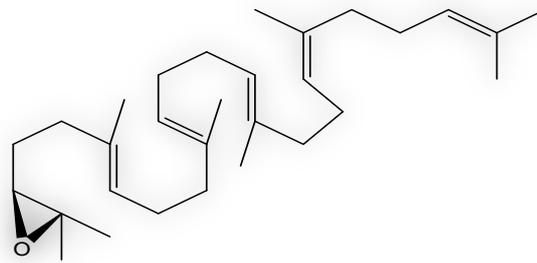


Figure 13 : Structure du 2,3-époxydosqualène.

II.1.3.2. Biosynthèse des triterpènes

Les triterpènes sont produits à partir du squalène, lui-même formé par la condensation de deux unités farnésyl de pyrophosphate (FPP) via la condensation d'unités isopréniques par la voie mévalonique (Figure 14), qui se déroule comme suit : Deux molécules d'acétyl-CoA réagissent ensemble en donnant naissance à l'acétoacétyl-CoA, lequel en fixant une troisième molécule d'acétyl-CoA (condensation de type Claisen) forme l'hydroxyméthylglutaryl-CoA, qui est réduit en mévalonate (MVA). Deux phosphorylations consécutives fournissent successivement le phosphomévalonate et le diphosphomévalonate. Ce dernier intermédiaire est ensuite soumis à une phosphorylation de son hydroxyle tertiaire suivie d'une décarboxylation concomitante qui conduit à l'isopentényl pyrophosphate (IPP). Finalement l'IPP est isomérisé en DMAPP (diméthylallyle de pyrophosphate) par une isomérase (**Dewick, 1999 ; Bonanno *et al.*, 2001**). Le géranyl pyrophosphate GPP, précurseur de monoterpènes, est formé par addition d'une molécule d'IPP sur une molécule de DMAPP selon une condensation tête à queue. Une addition similaire d'IPP conduit au FPP.

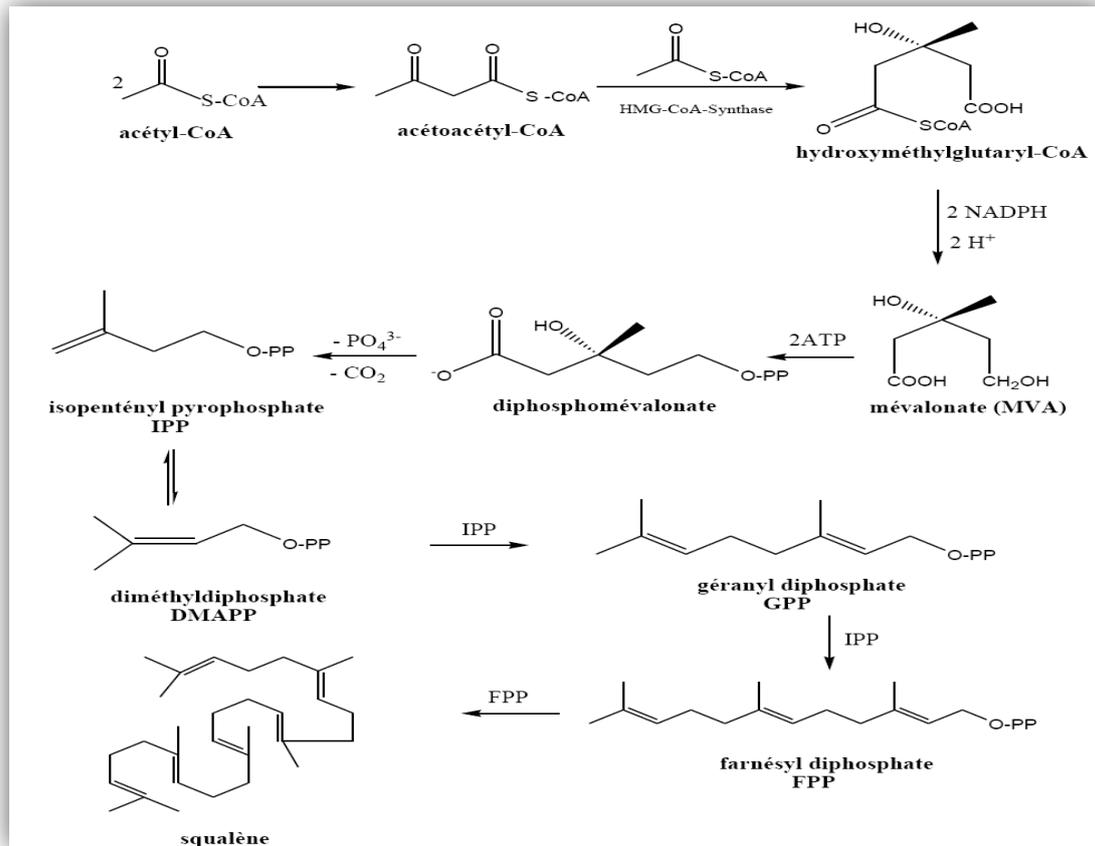


Figure 14 : Biosynthèse du squalène.

Dans la plupart des cas, le squalène est ensuite converti en 2,3-squalène époxyde (Figure 15) par une squalène époxydase, puis est cyclisé grâce à une oxydosqualènecyclase pour donner les différentes classes de triterpénoïdes.

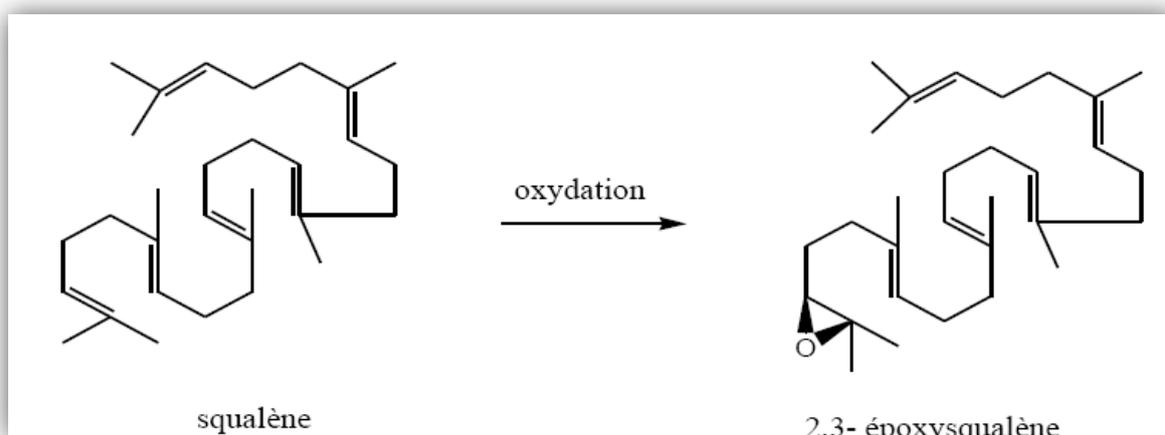


Figure 15 : Formation du 2,3-époxy-squalène.

Le processus biologique de cyclisation de l'époxyde du squalène implique, pour la formation des intermédiaires carbocationiques (cation dammaranyle et cation protostanyle),

des polycyclisations biochimiques stéréospécifiques (chaise-chaise-chaise-bateau et chaise-bateau-chaise-bateau) selon une addition électrophile intramoléculaire où les doubles liaisons C=C sont orientées d'une façon particulière (figure 16) (Bruneton, 2009 ; Vogel, 1998).

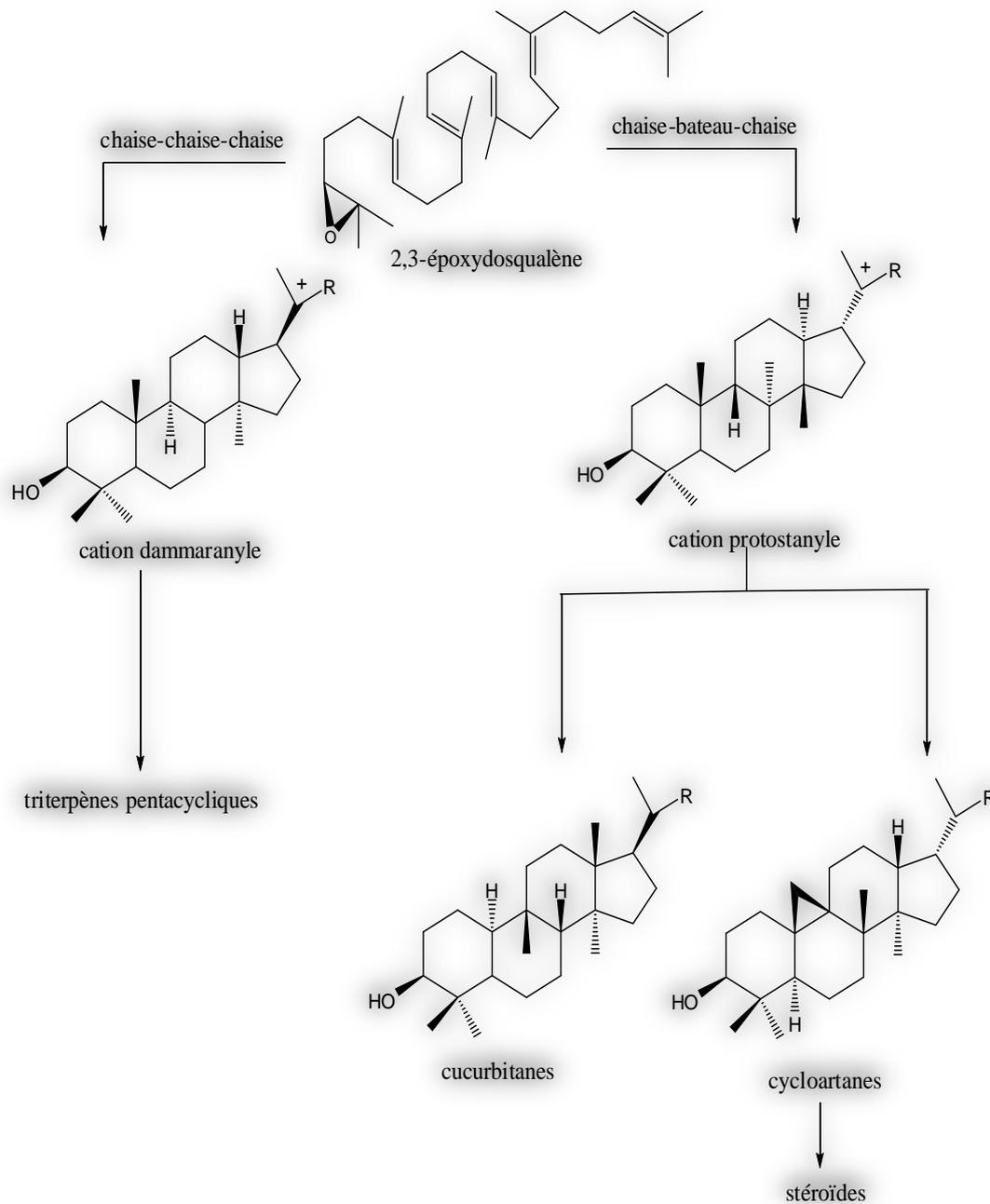


Figure 16 : Schéma récapitulatif de biogénèse des différents triterpènes

II.1.3.3. Structures chimiques et classification

Les triterpènes peuvent être classés en trois groupes : acyclique, tétracyclique, pentacyclique (**Bruneton, 1999**).

➤ Composés aliphatiques (acycliques) :

Tel que le squalène (figure 17), surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire dans la biogenèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes.

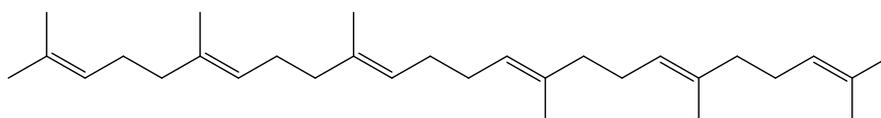


Figure 17 : Structure de squalène.

➤ Composés pentacycliques :

Les composés pentacycliques sont issues des squelettes oléane, ursane, lupane, friedelane et hopane (figure 18) (**Hostettmann et Marston, 1995**).

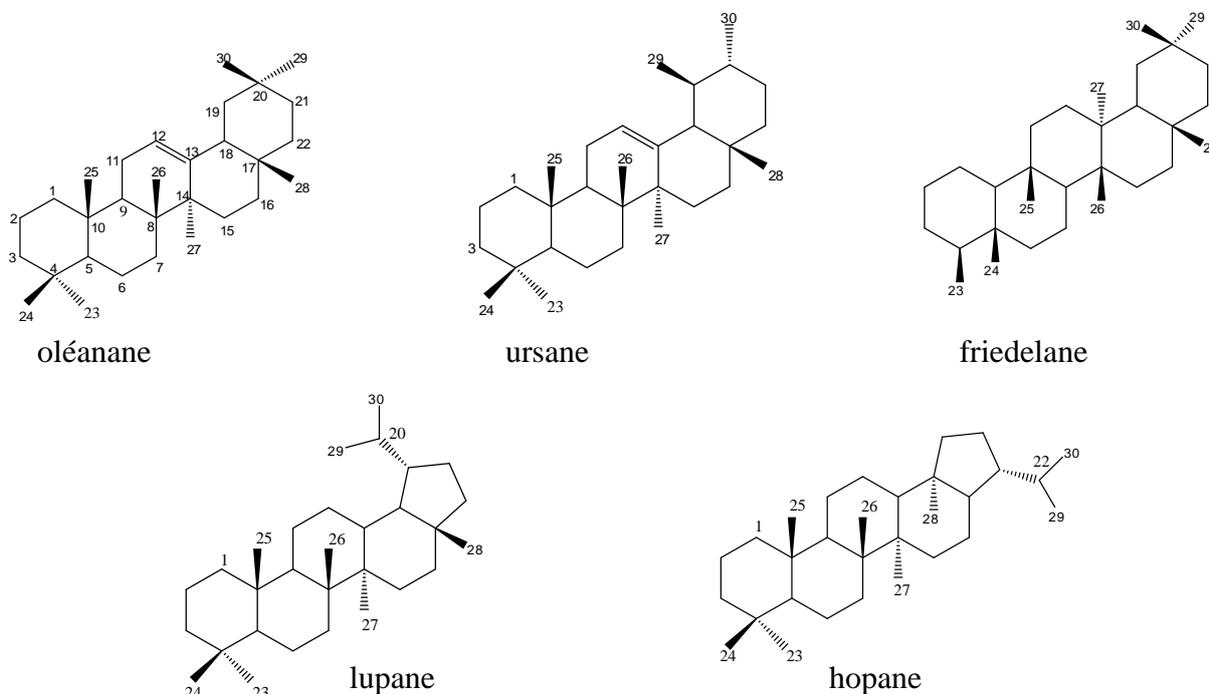


Figure 18 : Les différents squelettes pentacycliques triterpéniques rencontrés.

Ils sont le plus souvent hydroxylés en position 3. Les triterpènes libres très fréquents chez les plantes sont l' α - amyryne et la β - amyryne (figure 19).

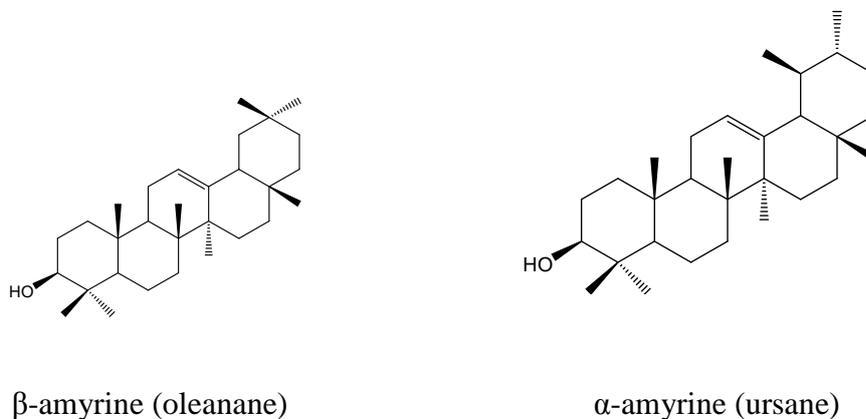


Figure 19 : Triterpène pentacyclique.

Les modifications secondaires des triterpènes sont assez limitées : hydroxylations supplémentaires, insaturations, fonctionnalisation des méthyles angulaires et lactonisations sont les plus indiquées. Une exception est remarquée dans plusieurs familles de Rutales telles que Rutaceae, Meliaceae, Simaroubaceae et Cneoraceae chez lesquelles le squelette tétracyclique initial peut être profondément remanié : oxydation, ouverture-recyclisation élimination de la chaîne ...etc (**Bruneton, 2009**).

Ces composés sont fréquemment utilisés dans des compositions pharmaceutiques pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques dont l'on peut citer, entre autres : anti-inflammatoires, hépatoprotectrices, diurétiques, analgésiques, antimicrobiennes, inhibitrices d'activités enzymatiques, antitumorales, antinéoplasmiques...etc (**Aguirre et al., 2006 ; Laszczyk, 2009**).

➤ **Composés tétracycliques :**

Les composés tétracycliques dérivent de trois squelettes principaux : dammarane, cucurbitane et lanostane (figure 20).

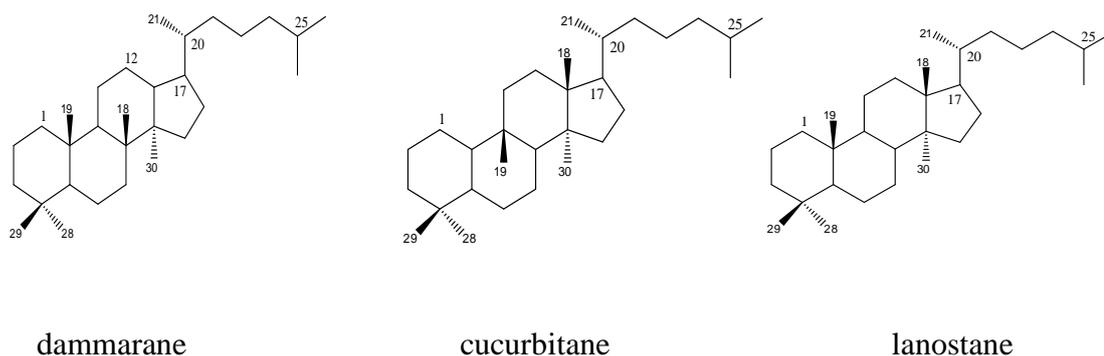


Figure 20 : Les différents squelettes tétracycliques rencontrés.

II.1.3.4. Propriétés pharmacologiques des triterpènes

La grande diversité structurale des métabolites secondaires triterpéniques conduit à une grande diversité en termes d'activité biologique (**Buddhan *et al.*, 2007**). Il est donc difficile de cerner l'activité de tous ces métabolites. Par conséquent, nous avons choisi de citer quelques propriétés pharmacologiques (**Bruneton, 1999 ; Manitto, 1981**). Ces composés manifestent entre autres :

- Des potentialités thérapeutiques certaines avec des propriétés cytostatiques, anti-inflammatoires, analgésiques, insecticides, molluscicides...etc.
- Un intérêt considérable dans le secteur de l'industrie pharmaceutique, particulièrement la production de médicaments stéroïdiques ayant des propriétés contraceptives, anabolisantes, anti-inflammatoires...etc.
- L' α et β -amyrines, possèdent des activités anti-inflammatoire et analgésiante (**Susunaga *et al.*, 2001**).
- Le bétulinol a des propriétés médicinales très diversifiées (anti-inflammatoire, antiphlogistique). Il est utilisé aussi en cosmétique et comme émulsifiant ; (**Patocka, 2003**).
- L'uvaol, erythrodiol, acide maslinique et l'acide oléanolique isolés de l'huile d'olive appelée « orujo » ; sont décrits pour la prévention contre le stress oxydatif et sont connus comme inhibiteurs de la pro-inflammation des cytokines dans les macrophages des murines péritonéales (**Marques-Martin *et al.*, 2006**).
- L'acide ursolique réputé pour ses effets anticancéreux, anti-inflammatoire et anti-allergique et cardioprotectif. Une étude récente a montré que l'administration de

l'acide ursolique chez des souris diabétiques diminue significativement le taux de glucose dans le sang (**Jang et al., 2009**).

- L'acide arjunolique et l'acide asiatique, ont montré une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Shigella sonnei*.
- L'acide bétulinique est reconnu pour son action anti-inflammatoire, (**Safayhi et Sailer, 1997**) et l'activité antitumorale (**Fulda et al., 1997 ; Schmidt et al., 1997 ; Zuco et al., 2002**).

CHAPITRE III

Stress oxydant et activité antioxydante

III.1. Généralités sur les antioxydants

Radicaux libres, espèces réactives d'oxygène (ERO), stress oxydant et antioxydants, deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels et même pour le grand public.

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive Oxygen Species) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire (Tarnawski *et al.*, 2005).

Les ROS désignent une appellation collective et comprennent les radicaux libres et certaines molécules qui sont des agents d'oxydation et ou facilement convertis en radicaux. Les ROS (Figure 21) dont les plus courants : le radical hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxygène singulet ($^1\text{O}_2$) endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques ou neurodégénératives et accélèrent le processus de vieillissement (Luximon Ramma *et al.*, 2002 ; Dasgupta et De, 2007). Elle serait même impliquée dans la pathologie du paludisme et des ulcères gastriques (Gülçin *et al.*, 2006 ; Gülçin *et al.*, 2012).

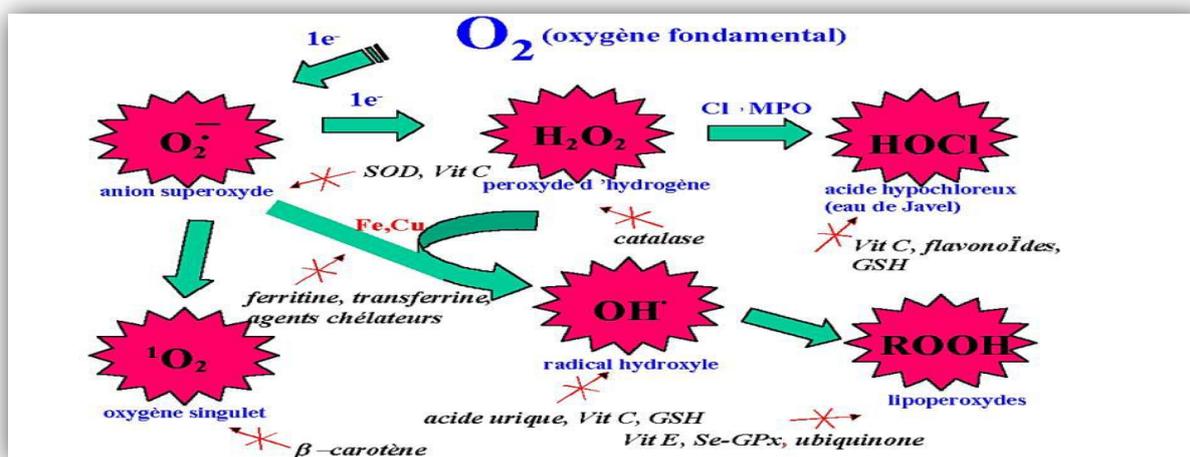


Figure 21 : Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH : glutathion, Cl⁻ : anion chlorure ; MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase sélénio-dépendante (Pincemail, 1999).

III.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle), le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés. En situation normale, les EOA sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif. Dans certaines conditions, une surproduction d'EOA due à l'activation de divers mécanismes biochimiques peut submerger rapidement les défenses antioxydantes : c'est le stress oxydatif. Celui-ci est de plus en plus impliqué pour expliquer les dégâts cellulaires observés dans les états inflammatoires aigus, le vieillissement, le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires (**Pincemail, 1999**).

III.3. Les radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés, c'est-à-dire non couplés à un électron de spin opposé. Cela entraîne une très haute réactivité chimique avec les éléments voisins. (**Leverve, 2009 ; Rochette, 2008**). Les espèces radicalaires sont électrophiles et vont chercher à arracher un électron à une molécule voisine afin d'apparier leur électron célibataire. Cet état est donc seulement transitoire, de l'ordre de la microseconde (**Gambini et Granier, 2013**) car le radical va soit accepter un autre électron, soit transférer le ou les électrons libres sur une autre molécule (lipide, protéine, acide nucléique) afin de rapparier son ou ses électrons célibataires et d'obtenir ainsi un état plus stable. (**Fontaine et al., 2002**) Il s'agit donc d'un intermédiaire de réaction. Cela va entraîner une réaction en chaîne qui va produire de nouveaux radicaux libres car la molécule agressée par le radical libre devient à son tour radicalaire.

Les radicaux libres sont indispensables à la vie car ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense de l'organisme. En effet, ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à l'apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes. (Favier, 2003). L'organisme en produit en continu.

III.3.1. Mécanisme d'action des radicaux libres

L'organisme se défend contre les radicaux libres, grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont débordés ou insuffisants, les radicaux libres ont tout le loisir d'être nuisibles : ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (leur structure est modifiée), ils agressent également les protéines, les microfibrilles de collagène, l'acide hyaluronique, les acides nucléiques des chromosomes et l'ADN lui-même est transformé entraînant l'apparition d'une série d'anomalie dont le risque de cancérisation. Lorsque les radicaux libres lèsent les acides gras insaturés on parle de lipidoperoxydation des membranes cellulaires. Cela déclenche alors une réaction en chaîne sur les divers acides gras du voisinage jusqu'à ce qu'ils soient neutralisés.

Dans le schéma (figure 22) (Leverve, 2009), la génération de ROS (Reactive Oxygen Species) est initiée pendant la respiration. Cette génération est facilitée par l'implication de divers facteurs physiologiques et environnementaux (UV, radiation, ozone, cigarette, pollution,...). Dans l'organisme la fabrication d'un assortiment de ROS à partir de l'O₂ moléculaire et de la L-arginine se réalise par l'intermédiaire de différentes enzymes tels que le MPO (myloperoxidase), la NADPH oxydase, le SOD (superoxyde dismutase) et le NOS (nitrite oxyde synthase). La présence de ces composés dans l'organisme engendre plusieurs phénomènes au niveau cellulaire, à savoir, les dommages de protéines de réparation de l'ADN, de caspases et la peroxydation lipidique. Notons que le dommage de l'ADN est suivi par une mutation et une activation de NF-κB (nuclear factor-kappa B). Tous ces phénomènes donnent naissance à une vaste gamme de maladies.

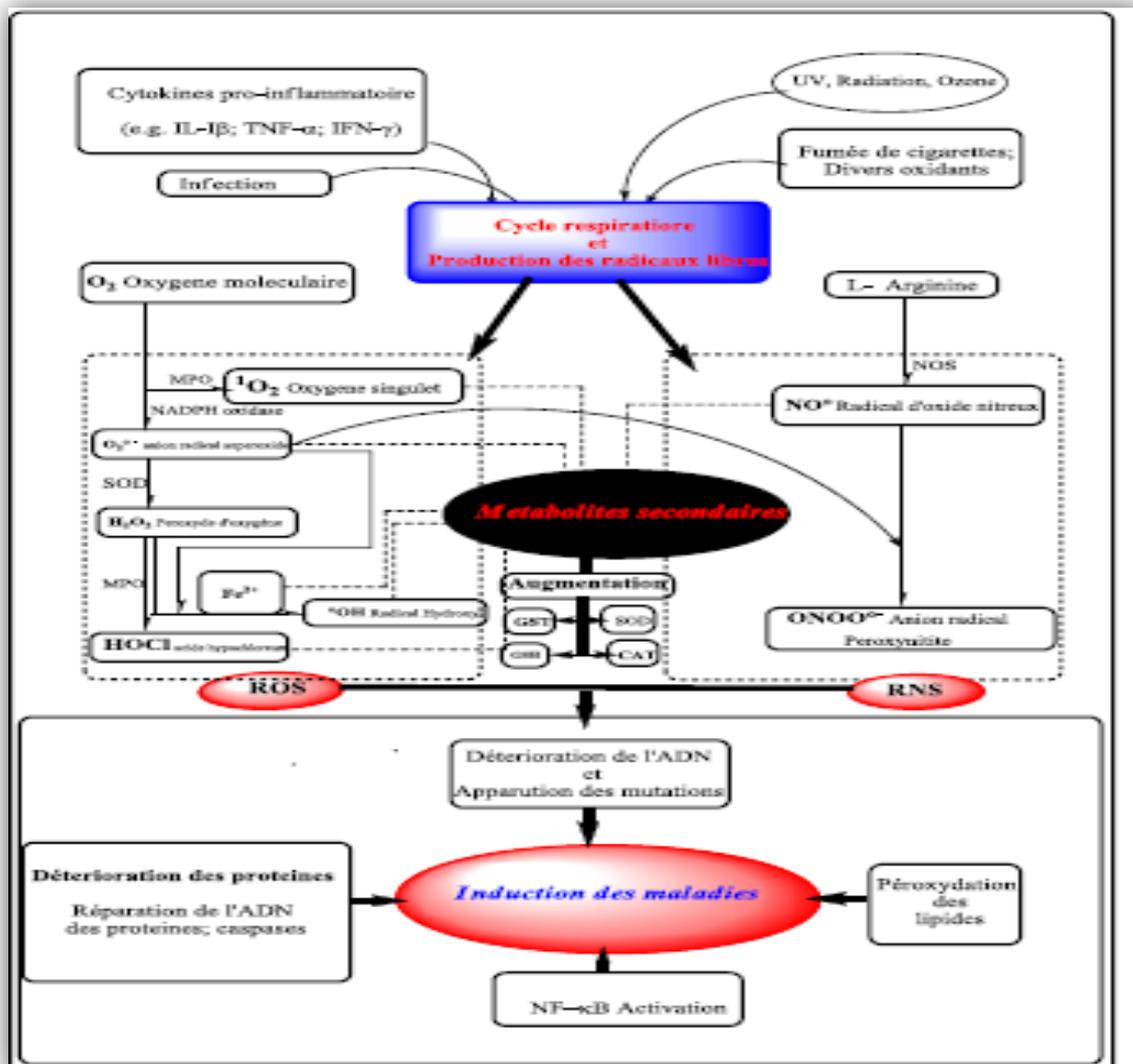


Figure 22 : Schéma des Métabolites secondaires et prévention des certaines maladies.

Les métabolites secondaires inhibent les générations des radicaux libres en piégeant non seulement la mère, la fille mais aussi les produits en induisant une augmentation de la SOD, CAT, la GST et la GSH, ce qui entraîne l'obstruction de la formation de diverses maladies (**Mandal et al., 2011**) . Il est indéniable que les polyphénols présentent d'importantes propriétés sur divers systèmes biologiques. Ces effets pourraient avoir des applications en thérapeutique. Mais toutes ces potentialités ne sont pas encore concrétisées même si de nombreux travaux soutiennent l'utilisation possible de ces composés en thérapeutique. Cependant, les dérivés de la rutine sont utilisés en thérapeutique pour améliorer la résistance capillaire. Les flavonoïdes sont les constituants habituels des vasculoprotecteurs et veinotoniques utilisés en phlébologie. Par ailleurs, l'utilisation de plantes renfermant des flavonoïdes, seules ou en association, est en progression constante en raison d'une demande croissante par les consommateurs de produits d'origine naturelle et en raison de l'intérêt porté aux plantes aussi bien médicinales qu'alimentaires contenant cette classe de composés d'origine naturelle ayant des propriétés justifiant leur emploi dans la prophylaxie des maladies cardiovasculaires, alzheimer, des cancers.

III.4. Les antioxydants

Par définition, un composé antioxydant doit être capable de retarder et d'inhiber significativement l'oxydation du substrat, et cela à de faibles concentrations par rapport à celles du substrat oxydable (**Halliwell et Gutteridge, 1990**). Dans l'organisme, la défense antioxydante endogène est assurée par les molécules réductrices comme le glutathion ou l'ubiquinol ou par des enzymes telles que les superoxydes dismutases, les catalases ou les peroxydases. La cellule peut également s'adapter en régulant les gènes codant pour des produits antioxydants ou pro-oxydants. Lorsque le stress induit par les EROs est supérieur aux capacités antioxydantes de la cellule, celle-ci peut initier son processus d'apoptose, évitant ainsi une toxicité générale au niveau du tissu ou de l'organisme.

Dans certaines pathologies ou au cours du vieillissement, les antioxydants endogènes sont insuffisants pour contrôler le taux d'EROs et maintenir l'homéostasie redox. C'est pourquoi, l'apport d'antioxydants exogènes, apportés notamment par l'alimentation, suscite un grand intérêt dans la prévention du stress oxydant et de ses conséquences (**Visioli et al., 2011**).

Des activités antioxydantes liées aux saponines, aux triterpènes aux esters gras dérivant tous des plantes ont été reportées (**Djeridane et al., 2006**). Mais l'activité antioxydante des extraits de plante est essentiellement attribuée aux composés phénoliques en particulier aux flavonoïdes.

Ainsi dans la détermination de l'activité antioxydante d'extraits de plante, la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux est aussi déterminée dans le but d'établir une corrélation essentielle entre teneur en composés phénoliques et activité antioxydante et ou entre teneur en flavonoïdes et activité antioxydante.

Les antioxydants de synthèse tels que le butyl hydroxy anisole (BHA) et le butyl hydroxy toluène (BHT) sont certes très efficaces mais susceptibles de manifester des effets secondaires et voir même toxiques (**Manian et al., 2008**). Plusieurs molécules à propriétés antioxydantes sont isolées des plantes (**Lee et al., 2000 ; Cakir et al., 2003 ; Kumaran et Karunakaran, 2007**). Il est donc louable de chercher des antioxydants naturels efficaces sans ou présentant moins d'effets secondaires pour remplacer les synthétiques ou pour plus de choix à partir des plantes alimentaires et médicinales.

III.5. Quantification des polyphénols

L'estimation des polyphénols se fait couramment à travers les méthodes colorimétriques.

III.5.1. Les méthodes spectrophotométriques

Elles sont couramment utilisées, principalement pour leur simplicité, leur sensibilité élevée. La teneur en polyphénols totaux est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu (760-765 nm, (**Kim et al., 2003 ; Djeridane et al., 2006**). Une courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalence d'acide gallique.

Les flavonoïdes sont quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium ; les tests de vanilline / acide chlorhydrique et butanol / acide chlorhydrique sont respectivement utilisés pour l'analyse de la catéchine et des proanthocyanidines.

III.6. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

III.6.1. Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (blois, 1958). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Popovici *et al.*, 2010). La réduction du radical libre DPPH[°] (2,2'-diphényl-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004). Comme indiqué ci-dessous il y aura un changement de sa couleur violette en virant au jaune (figure 23), dont l'intensité de la couleur jaune est proportionnelle au pouvoir antioxydant présent dans le milieu à donner des protons et plus le changement de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort (Mansouri *et al.*, 2005)

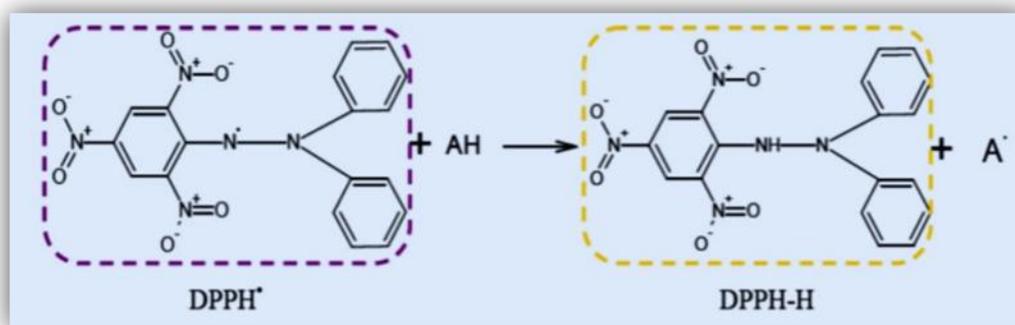


Figure 23 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH⁺ entre l'espèce radicalaire DPPH⁺ et un antioxydant. (Mansouri *et al.*, 2005).

III.6.2. Test de piégeage du radical-cation ABTS^{•+}

Ce radical cation de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}) est couramment utilisé pour évaluer l'efficacité antioxydante des composés purs et des mélanges complexes. Il pourrait être généré par voies enzymatiques, chimiques et électrochimiques (Roberta *et al.*, 1999 ; Rice-Evans et Miller, 1999 ; Bourbonnais *et al.*, 1998 ; Campos *et al.*, 1996 ; Miller *et al.*, 1993 ; Childs et Badsky, 1975).

Il est formé par oxydation de ABTS stable par un oxydant qui est le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) ou avec une enzyme de peroxydation pour générer le radical ABTS^{•+} qui

présente une coloration vert bleu (figure 24). La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde appropriée. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cation entraîne sa réduction en ABTS^+ et à la décoloration à 734 nm de la solution (**Re et al., 1999**)

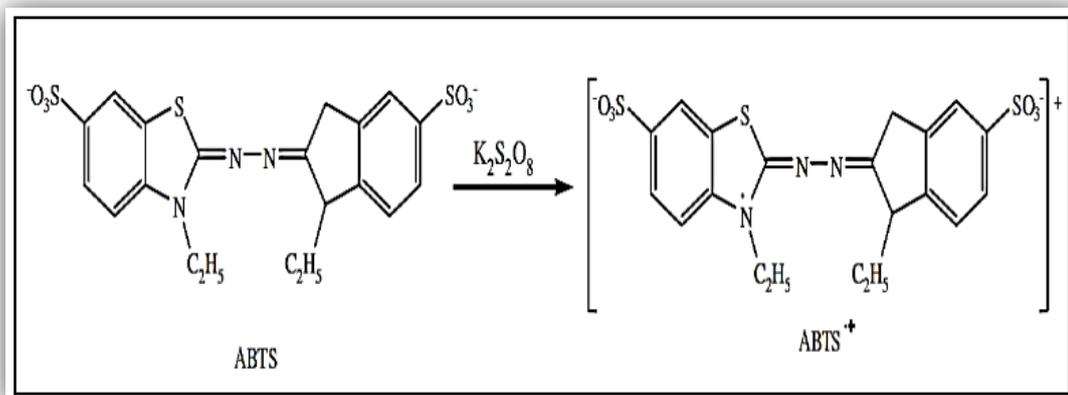


Figure 24 : oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^+ (**Gülçin, 2012**).

III.6.3. Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce teste, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaque les onze doubles liaisons du β -carotène, ce qui entraine une décoloration qui est suivie par spectrométrie à 470 nm, Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (**Kubola et Siriamornpun, 2008**). la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (**Laguerre et al., 2007**).

III.6.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

C'est une méthode développée par Apak et al en 2004. Le test consiste au suivie de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu^{2+}) [$\text{Nc}2 - \text{Cu}^{2+}$]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre–néocuproïne est réduit (Figure 25).

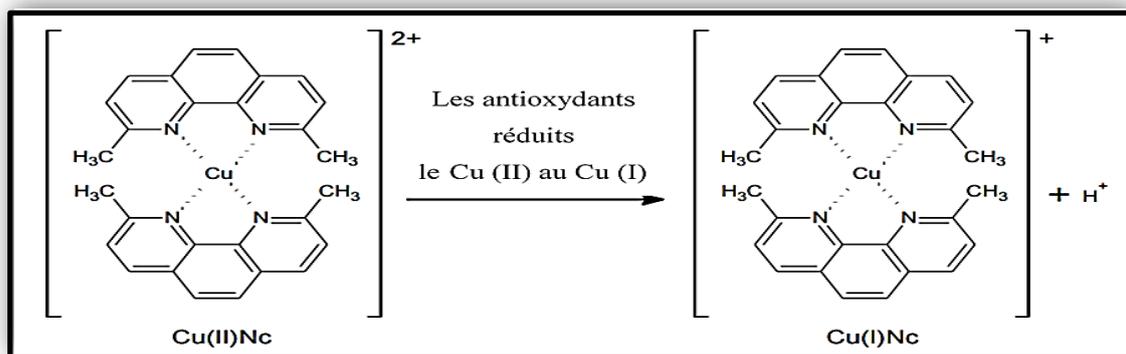


Figure 25 : Réduction du complexe néocuproïne / cuivre (II) (Özyürek *et al* 2011).

Cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

Matériels et méthodes

IV.1. Aperçu et but de travail

Après l'extraction des parties aérienne de *Calendula*, les principaux constituants chimiques présents dans les trois extraits chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique ont été caractérisés par les deux techniques classiques de caractérisation : le criblage par réactions colorées et la CCM.

Notre étude a porté aussi sur le dépistage des activités antioxydantes, des extraits méthanolique et chloroformique.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Matériel végétal

IV.2.1.1. Récolte de la plante du genre *Calendula*

La plante *Calendula* a été récoltée dans la région de l'Hnancha de la wilaya de Souk-Ahras au mois d'Avril 2019. La récolte de la plante a été effectuée très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents.

L'identification botanique de la plante étudiée a été réalisée par Monsieur KABOUCHE Kamel. Après l'avoir séché dans un endroit sec, le matériel végétal est ensuite réduit en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.

IV.2.2. Méthodes d'analyses phytochimiques

IV.2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Elle est utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications. Ainsi les analyses sur couche mince (CCM) permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Les plaques utilisées durant la réalisation de ce travail sont des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium en phase normale Kieselgel 60 F254, Merck 250 µm (20 × 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié qui constitue la phase mobile. Cette dernière est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant révélation par une solution de la vanilline sulfurique (0.5 g de la vanilline, dissous dans

100 ml du méthanol, plus 1 ml d'acide sulfurique). Cela permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suite aux différentes séparations chromatographiques.

IV.2.3. Méthodes d'analyses physico-chimiques

IV.2.3.1. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres UV-visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre (NICOLET evolution 100). Grâce à son monochromateur le lecteur offre une grande sensibilité aux essais.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, un lecteur de microplaque de type Perkin Elmer (EnSpire Alpha Plate Reader) multimode, des microplaques en plastique de 96 puits et des micropipettes réglables ont été utilisés au cours de l'exploration de l'activité antioxydante. La poudre (1,2 Kg) est soumise à une macération dans le mélange éthanol-eau à 70% (2 x 12 L, 48h) à la température ambiante. L'extrait hydro-alcoolique obtenu est filtré puis concentré sous basse pression pour donner un résidu de 248 g (Figure 26).

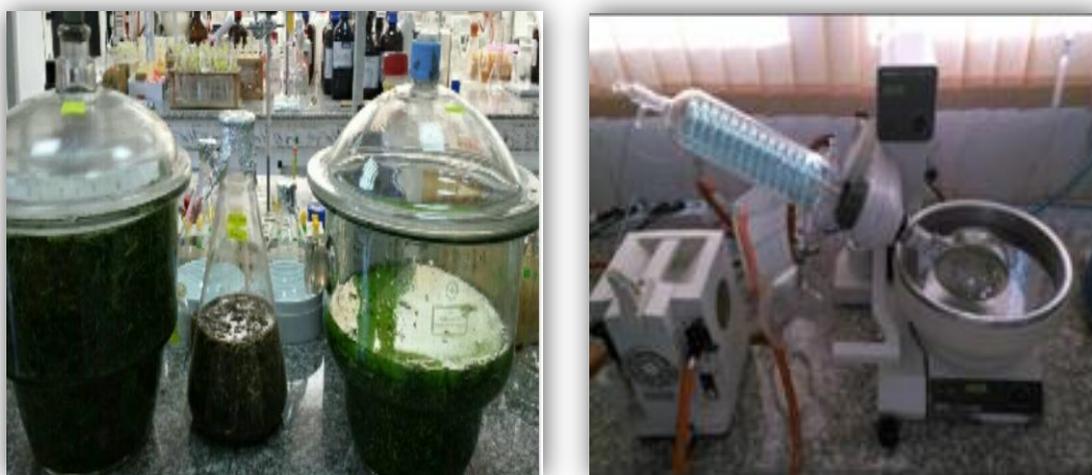


Figure 26 : macération des parties aériennes de *Calendula* et de concentration des filtrats hydroéthanoliques.

240g de l'extrait brut a subi des extractions successives avec des solvants à polarité croissante, en commençant par l'éther de chloroformique (3 x 300 mL CHCl_3) puis l'acétate d'éthyle (3 x 300 mL AcOEt), et enfin le *n*-butanol (3 x 300 mL *n*-BuOH). Les extraits organiques obtenus sont évaporés à sec pour fournir 15,5 g de l'extrait CHCl_3 , 3,56 g de

l'extrait AcOEt et 70,8 g de l'extrait *n*-BuOH (Figure 27). Tous les extraits ont été évaporés à 45 °C, sous une basse pression en utilisant l'évaporateur rotatif.

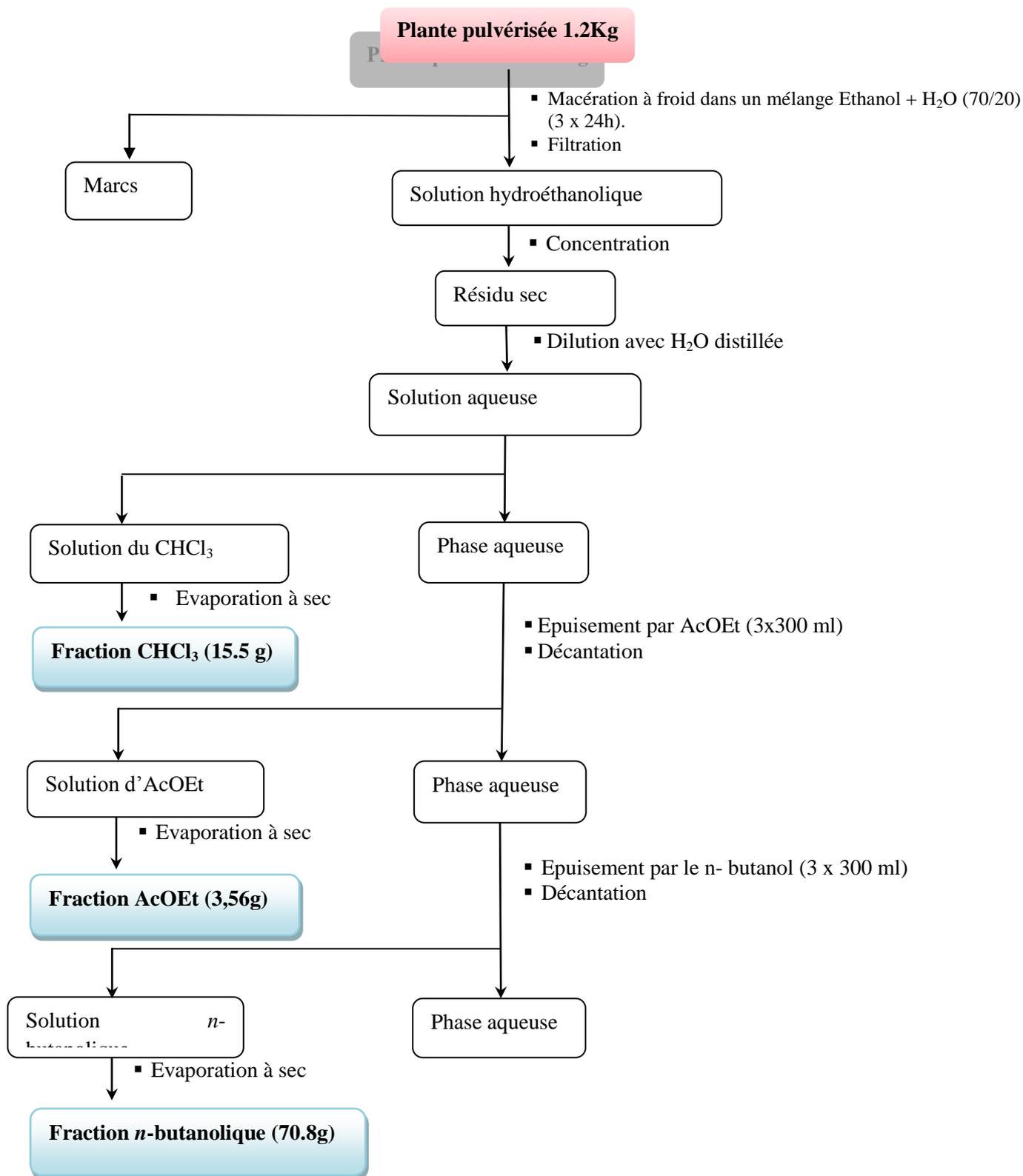


Figure 27 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Calendula*.

IV.3. Quantification des polyphénols

L'estimation des polyphénols se fait couramment à travers les méthodes colorimétriques.

IV.3.1. Les méthodes spectrophotométriques

Elles sont couramment utilisées, principalement pour leur simplicité, leur sensibilité élevée. La teneur en polyphénols totaux est déterminée par le test de Folin-Ciocalteu (760-765 nm, (**Kim et al., 2003 ; Djeridane et al., 2006**). Une courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalence d'acide gallique.

Les flavonoïdes sont quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium ; les tests de vanilline / acide chlorhydrique et butanol / acide chlorhydrique sont respectivement utilisés pour l'analyse de la catéchine et des proanthocyanidines.

IV.4. Screening phytochimique par réactions colorées

Le screening phytochimique est un moyen pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée.

Les tests préliminaires de caractérisation sont basés soit sur l'analyse qualitative, soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration.

A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés. La plupart des tests sont effectués selon la technique de **Harbone (1973)**.

IV.4.1. Mise en évidence des polyphénols

Les polyphénols (tanins et flavonoides ...) ont la capacité de former des complexes colorés avec des sels avec les métaux lourds, leur présence au sein d'une plante a été étudié est mise en évidence par l'apparition d'une coloration ou la formation d'un précipité noirâtre intense après l'ajout de perchlorure de fer $FeCl_3$ à l'extrait de cette plante.

IV.4.1.1. Révélation par le réactif de Stiasny

Les tanins peuvent être mis en évidence dans le milieu grâce à la réaction colorée avec la solution aqueuse de $FeCl_3$. Cependant la différenciation des tanins peut être effectuée grâce à la révélation par le réactif de Stiasny (formaldéhyde chlorhydrique), en effet les tanins

condensés précipitent à chaud par addition à l'infusé du réactif de Stiasny. Contrairement aux tanins hydrolysables qui peuvent être mis en évidence par l'addition de chlorure ferrique ce qui va se traduire par l'apparition d'un composé qui colore la solution.

Dans des tubes à essai, 2.5 ml de chacun des extraits sont mélangé avec 0.5 ml de la solution aqueuse de FeCl_3 à 1%. La présence de tanins catéchiqes ou galliques se traduit par le développement d'une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

Pour différencier entre les tanins l'utilisation du réactif de Stiasny s'est avéré nécessaire dont le principe est le suivant :

- A 10 ml de chaque extrait 5 ml de réactif de Stiasny sont ajouté (10 ml de formaldéhyde + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré). La présence d'un précipité rouge confirmant la présence des tanins dans le milieu.
- La séparation de précipité par filtration est suivie par une neutralisation de la solution par l'acétate de sodium à fin d'ajouter quelques gouttes de FeCl_3 à 1%. L'apparition d'une coloration bleu noir indique la présence de tanins galliques.
- À 2 ml de chaque extrait sont additionnées quelques gouttes d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 10%. L'apparition d'une coloration bleu-noir ou vert-noir indique la présence de polyphénols.
- Les tanins catéchiqes sont identifiés par le réactif de Stiasny (10 ml de formaldéhyde + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré). L'ajout de 5 ml de ce réactif à 10 ml de chaque extrait entraîne la formation d'un précipité rouge caractérise les tanins catéchiqes.

IV.4.1.2. Réaction de la cyanidine

Afin de mettre en évidence la présence des flavonoïdes dans nos extraits, la réaction dite « la cyanidine » a été utilisée.

En présence de 1ml de l'acide chlorhydrique et 1ml de l'eau distillé et de quelques copeaux de magnésium, la solution d'extrait prend la couleur rose orange (flavones) ou rose

violacé (flavonones) ou rouge cerise (flavonols) apparaît sur la couche surnageant du mélange ce qui indique la présence d'un flavonoïde libre.

IV.4.2. Mise en évidence des alcaloïdes

IV.4.2.1. Révélation par le réactif de Mayer

Pour mettre en évidence les alcaloïdes, le réactif de Mayer a été utilisé. L'ajout de quelques gouttes de ce réactif (10 g de KI et 2,70 g de HgCl₂ dissous dans 20 ml d'eau) à 2 ml de la solution d'extrait entraîne la formation d'un précipité blanc ou blanc-jaune en présence d'alcaloïde.

IV.4.2.2. Révélation par le réactif de Dragendorff

En présence de quelques gouttes du réactif de dragendorff (composé d'un mélange de 0,80 g de nitrate basique de bismuth, 10 ml d'acide acétique glacial et 40 ml d'eau distillée), la formation d'un précipité de coloration rouge-orangé caractérise également la présence des alcaloïdes.

IV.4.3. Mise en évidence des saponines

IV.4.3.1. Indice Mousse (IM)

Pour identifier rapidement les saponosides dans une plante, il suffit de mettre en évidence leur pouvoir aphrogène en observant la mousse très fine qui se forme après une simple agitation énergique (pendant 15 secondes) de cette poudre en présence d'eau et sa persistance au moins 10 minutes.

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100. La détermination de l'indice de mousse (IM) est la méthode la plus abondante pour la confirmation de la présence des saponines.

Dans une série de 6 tubes à essai, sont introduits successivement 1 à 6 ml de chaque extrait, tous les tubes sont complétés à 10 ml avec de l'eau distillée selon le Tableau 4 et agités vigoureusement dans le sens de la longueur pendant 15 secondes.

Tableau 4 : Gamme de dilutions décroissante de l'extrait butanolique pour la mesure de l'indice de mousse.

Numéro de tube	1	2	3	4	5	6
Extrait n-BuOH 1% (ml)	1	2	3	4	5	6
Eau distillé (ml)	9	8	7	6	5	4

Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

$$IM = \text{inverse } C \times D$$

C : Concentration initiale de l'extrait

D : Dilution dans le tube ou la mousse >1

IV.4.4. Mise en évidence des triterpènes

Les triterpènes ont été mis en évidence par la réaction de Liebermann- Burchard. Les extraits chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique et éthanolique sont additionné chacun de 0.5ml d'anhydride acétique puis de 0,5ml de chloroforme, après dissolution, les mélanges sont transférées dans des tubes à essai aux quels est ajouté 1ml d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, avec coloration de la couche surnageante de vert ou de violet, traduit la présence de triterpènes.

IV.5. Evaluation des activités biologiques

IV.5.1. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des différents extraits (éthanolique, et chloroformique) de notre plante a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon Georgé *et al* qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) de réactif de Folin par les groupement oxydables des

composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**). Brièvement, 125µl de l'échantillon est mélangée avec 500 µl d'eau distillée et 125µl de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation du mélange suivie d'un repos de 3 minutes on rajoute 125µl d'une solution de carbonate de sodium à 2 %. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml. 3 ml du réactif de Folin-Ciocalteu à 1 N sont additionnés, après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la lecture des densités optiques (DO) est faite à 760 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à concentrations finales allant de 50 à 500 µg/ml. La teneur des composés phénoliques est exprimée en équivalents de mg d'acide gallique (EAG) /g de plante sèche. Tous les essais sont reproduits au moins trois fois.

IV.5.2. L'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux mais il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise (**Cristina et al., 2009**).

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence la présence de l'activité antioxydante *in vitro* des deux extraits (EtOH et CHCl₃) en utilisant trois essais complémentaires :

- ✓ L'activité antiradicalaire pour le radical libre DPPH•
- ✓ L'activité antiradicalaire pour le radical-cation ABTS⁺•
- ✓ Le pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC

Les résultats, sauf pour le dosage CUPRAC, ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC₅₀). L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée à celle de standard (BHA)

L'indice IC₅₀ se définit comme étant la concentration nécessaire de l'antioxydant pour piéger 50% de radicaux DPPH•/ABTS⁺•/O₂⁻ alors que A_{0,5} est la concentration de l'antioxydant pour laquelle l'absorbance vaut 0,5. Les deux indices IC₅₀ et A_{0,5} sont donnés en

µg/ml de milieu réactionnel, du coup la capacité antioxydante d'un échantillon est d'autant plus élevée que son IC₅₀ ou A_{0,5} est petit.

IV.5.3. Test de l'activité anti radicalaire par le test de DPPH :

L'activité antiradicalaire des différents extraits de l'espèce du genre *Calendula* a été évaluée en utilisant la méthode fondée sur l'utilisation du DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) comme un radical relativement stable, selon le protocole décrit par (Blois, 1958) avec de légères modifications. Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl picryl hydrazyle ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

Brièvement, un volume de 40 µl de différentes concentrations de chaque échantillon ainsi que l'antioxydant standard (α -tocophérol), est déposé dans chaque puits, 160 µl de la solution méthanolique de DPPH (0,1mM) est ajouté par la suite. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en ajoutant 40 µl du méthanol à 160 µl de la solution méthanolique de DPPH. Après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Le test est répété 3 fois.

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait})}{\text{Abs contrôle}} \times 100.$$

IV.5.4. Test de l'activité anti-radicalaire pour le radical ABTS^{•+}

L'activité antiradicalaire des deux extraits EtOH et CHCl₃ est déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical ABTS^{•+} «2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) » qui est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons. Ce radical cationique est facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleue.

Le radical cation ABTS^{•+} a été préparé à partir de l'ABTS^{•+} (7 mM) et du persulfate de potassium K₂S₂O₈ (2,45 mM), ces deux produits sont mélangés en solution aqueuse. Le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant l'utilisation. La solution obtenue est ensuite diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de 0,7±0,025 à 734 nm avant son usage.

Pour cela, 40 µl d'échantillon de chaque concentration est déposé en triplicata sur les quelles 160 µl de solution fraîchement préparée sont ajoutés. Cette opération est aussi valable

pour les deux standards employés. Un blanc est parallèlement préparé suivant le même protocole tout en remplaçant l'échantillon testé par le méthanol. Après 10 minutes d'incubation l'absorbance est mesurée à 734 nm.

L'activité de piégeage du radical $ABTS^{•+}$ est calculée en tant que pourcentage de décoloration de radical cation $ABTS^{•+}$ selon cette équation :

$$AA (\%) = [1 - (A \text{ Extrait} / A \text{ blanc})] \times 100$$

IV.5.5. Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)

L'activité antioxydante par réduction cuprique des extraits a été déterminée par la méthode CUPRAC (Apak *et al.*, 2004). Dans les plaques de 96 unités des solutions ont été ajoutées : 50 μ l de Cu(II) (10 mM), 50 μ l de neocuproïne (7.5 mM), 60 μ l de tampon NH_4Ac (1 M, pH = 7), et 40 μ L de l'extrait à différentes concentrations. Après une heure du temps et à l'aide d'un lecteur de microplaques, l'absorbance a été enregistrée à 450 nm. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0.5}$ (μ g/mL) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

IV.5.6. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyennes \pm déviation standard (SD). Les valeurs de $IC_{50}/A_{0.5}$ ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel OriginPro 8. Plus elles sont petites, plus l'activité antioxydante des extraits est grande

Résultats et discussion

V.1.Rendement des extraits

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Il est déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre. (Abe *et al.*, 2010). Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule :

$$R (\%) = [M1/ M0] \times 100$$

R % : Rendement en extraits exprimée en g /100g de matière sèche,

M1 : quantité de l'extrait récupérée exprimée en g,

M0 : quantité de la poudre végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g,

Tableau 5 : Les Rendements des différents extraits.

Matériel végétale	Extrait	Masse(g)	Rendement%
1200g	acétate d'éthyle	3.56	0,29
	Chloroformique	15.35	1,27
	Butanolique	70,8	5,9

Les rendements en extraits acétate d'éthyle et chloroformique sont faibles par rapport à l'extrait butanolique.

En général, le calcul des rendements permet d'apprécier les extraits totaux qu'on peut tirer de chaque espèce. Ces rendements permettent également d'envisager la quantité d'organes à prélever en cas de besoin pour une éventuelle étude ultérieure, ce qui, rendrait l'utilisation rationnelle.

V.2. Criblage phytochimique par CCM

Le criblage phytochimique a été réalisé sur les extraits obtenus par épuisement successif avec différents solvants à polarité croissante. Ainsi, nous avons obtenu 3 extraits, l'extrait chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique.

La chromatographie sur couche mince après la révélation par l'UV à 254-365 nm et par une solution de la vanilline sulfurique a montrée plusieurs taches dans chaque extrait de type triterpenoïdes, flavonoïdes et saponosides. Ces deux derniers types de métabolites secondaires ont été mis en évidence et purifiés à partir de différents végétaux. Par exemple, Lehbili *et al* ont identifié et purifié 2 flavonoïdes et 18 saponosides à partir de l'extraithydroéthanolique de *Calendula stellata* (Lehbili *et al.*, 2017).

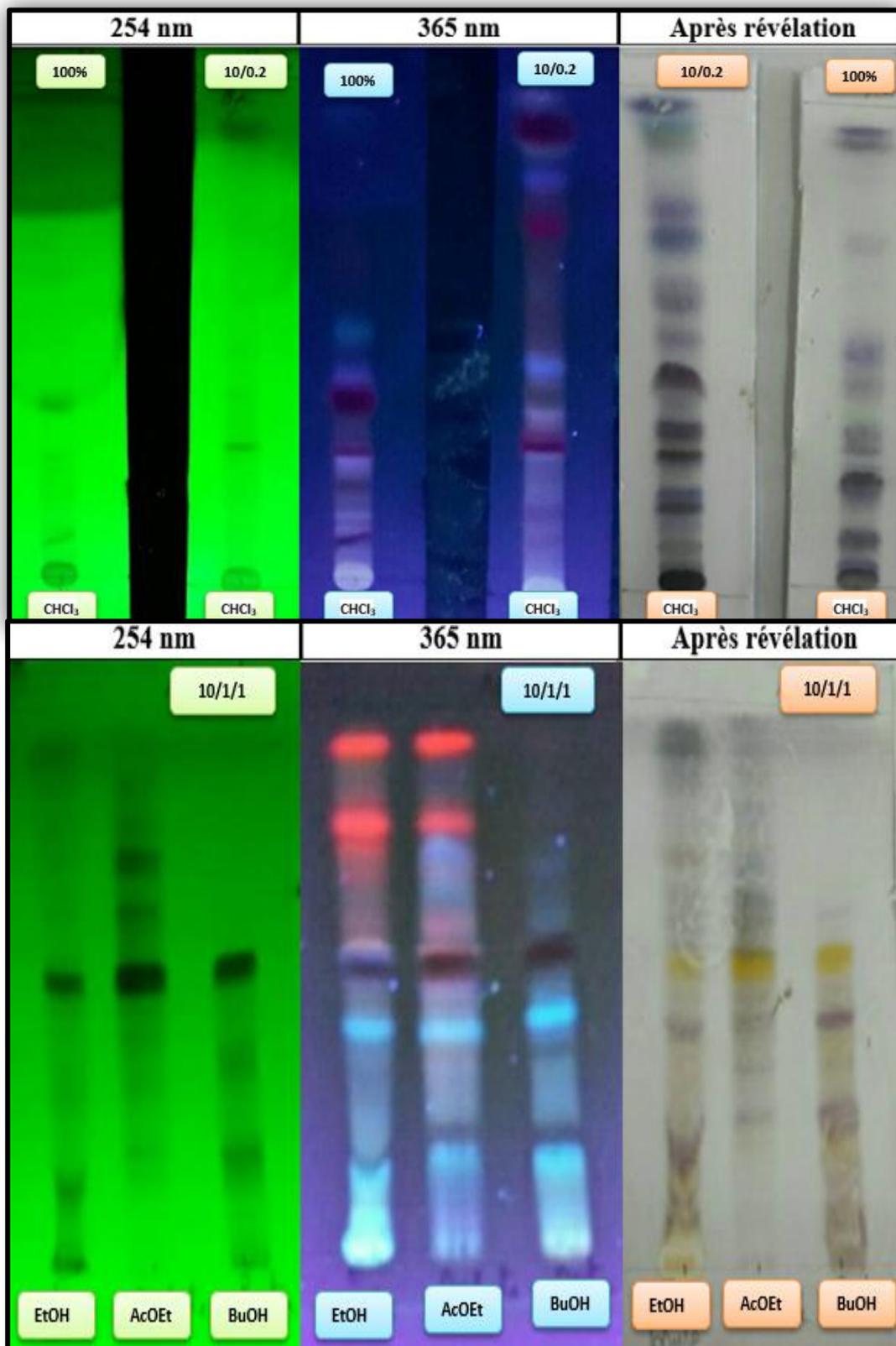


Figure 28 : chromatogramme : 1 des extraits EtOH, Acétate et BuOH) acétate d'éthyle : MeOH : H₂O (10 : 1 : 1) observé sous 254 nm, 365 nm et après la révélation.

L'extrait chloroformique renferme majoritairement des stérols et des terpènes. Par ailleurs, les flavonoïdes ont été décelés en plus grand nombre dans l'extrait acétate d'éthyle et butanolique. En outre la présence manifeste de saponoside observée surtout dans l'extrait butanolique.

V.3. Screening phytochimique par réactions colorées

L'analyse phytochimique réalisée a permis de constater la présence des trois grands groupes chimiques (flavonoïdes, terpenoïdes, saponosides) quoique les alcaloïdes et les tannins ne semblent pas présents dans les trois extraits. Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont été obtenus par CCM.

Selon leur intensité, les réactions qui se produisent sont classées de : négative (-) jusqu'à franchement positive (+++).

Les résultats du criblage sont résumés dans le tableau ci-après.

Tableau 6 : les résultats de criblage obtenus.

Extrait	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Butanolique
Polyphénols	-	++	+++
Flavonoïdes	+	++	++
Stérols et terpènes	+++	+	++
Saponosides	-	-	+++
Alcaloïdes	-	-	-

V.3.1. Teneur en polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux (tableau 7) ont été déterminées par dosage colorimétrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats sont exprimés en mg EAG/mg d'extrait en se référant à la courbe d'étalonnage préalablement établie. L'acide gallique a été utilisé comme standard (figure 29).

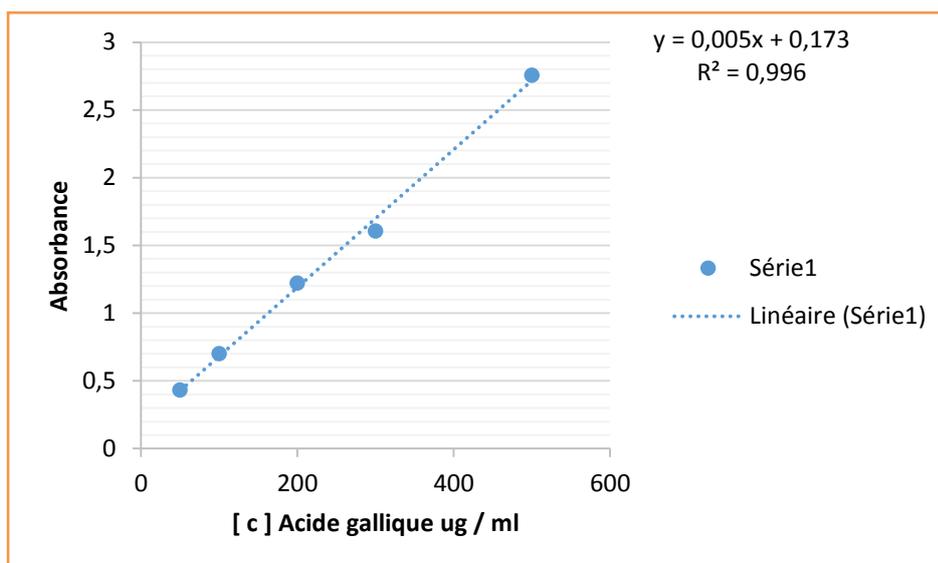


Figure 29 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

Tableau 7 : Résultats du dosage des polyphénols totaux de *Calendula*.

Extraits	Polyphénols ^(a)
Extrait Brut	59,14 \pm 1.02
Extrait Chloroformique	47,38 \pm 2,4

(a) μ g d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

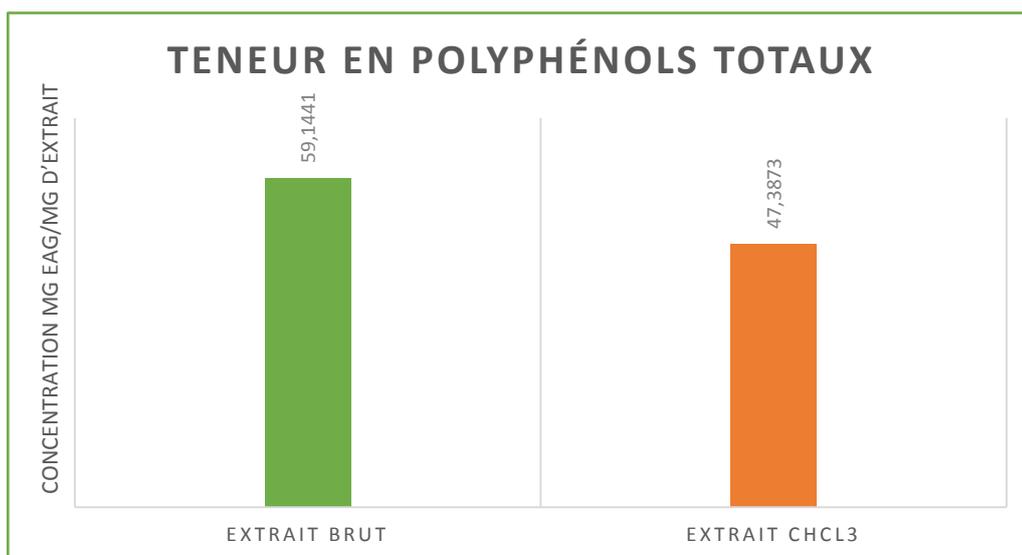


Figure 30 : Teneur en polyphénols totaux (en mg /g d'extrait).

Les résultats du dosage révèlent que l'extrait Brut est le plus riche en polyphénols totaux (59,14 mg EAG/mg d'extrait). Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga et Mosase, 2001 ; Bouzid *et al.*, 2011).

V.4. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de l'extrait Brut et l'extrait Chloroformique de notre plante a été réalisée par Trois techniques chimiques (le piégeage du radical libre DPPH, ABTS et CUPRAC).

V.4.1. Activité antiradicalaire par le Test du 2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl (DPPH)

V.4.1.1. Mise en évidence de l'activité antiradicalaire

L'activité anti radicalaire a été mise en évidence grâce à une révélation des plaques CCM des deux extraits par le DPPH, la figure 31 montre les chromatogrammes obtenus.

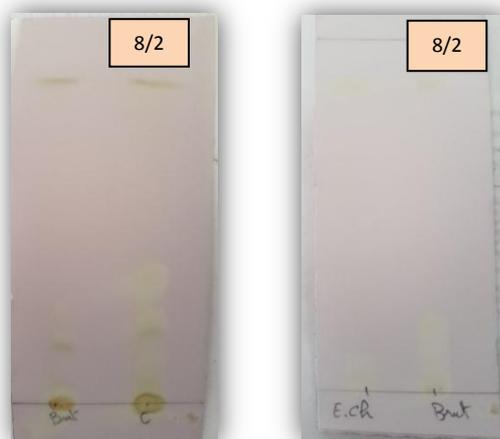


Figure 31 : Mise en évidence de l'activité antiradicalaire.

Les zones claires sur un fond violet montre l'activité antiradicalaire des deux extraits notamment l'extrait chloroformique ceci nous a encouragé à doser l'activité antiradicalaire des deux extraits.

V.4.1.2. Dosage de l'activité antiradicalaire par le test DPPH

L'activité antiradicalaire (DPPH) de l'extrait Brut, et Chloroformique a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique de DPPH, mesurée à 517 nm. Le standard utilisé est le BHA. Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des d'extraits et de standard (Figure 32).

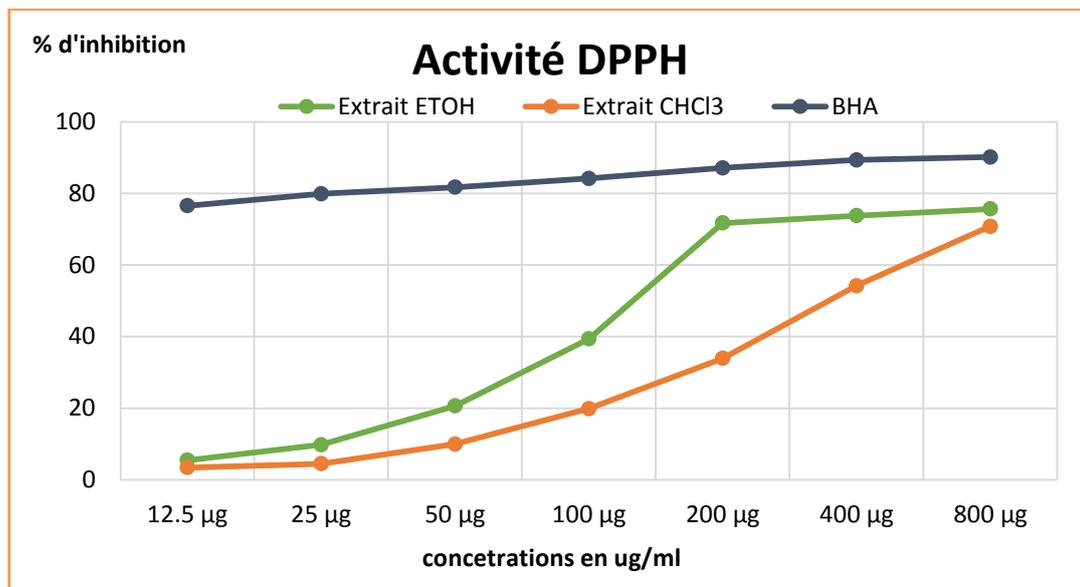


Figure 32 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH par différents extraits de plante.

La figure 32 révèle que l'extrait Brut et l'extrait Chloroformique possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante.

Les résultats obtenus ont permis également de déduire la valeur de l'IC₅₀ (la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres).

- Détermination de l'IC₅₀

La valeur de l'IC₅₀ exprimée en µg/ml a été déterminée graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour chaque échantillon testé (Figure 33).

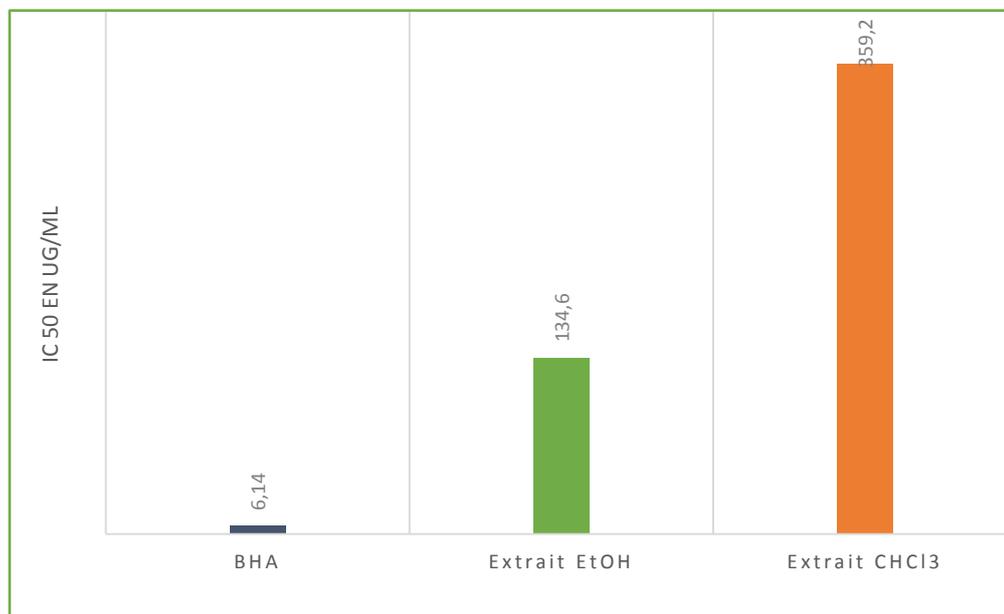


Figure 33 : Valeurs des IC₅₀ exprimés en µg / ml des échantillons étudiés classés en ordre croissant.

Cette figure révèle que tous les extraits testés ont une activité antiradicalaire dose dépendante vis-à-vis du radical DPPH. Elle montre aussi que l'extrait Brut éthanolique présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé, il est de l'ordre 75,67%. Le même extrait aussi a présenté une teneur en phénoliques plus élevée.

D'autre part, l'extrait brut éthanolique s'est avéré activement faible par rapport au standard BHA qui présente une IC₅₀ de l'ordre de 6.14 µg/ml. Notre extrait Brut a également montré une activité antiradicalaire presque similaire à celle de l'extrait Brut (EtOH) obtenue par Lehbili *et al.* pour leur étude portant sur l'espèce *Calendula stellata* avec une IC₅₀ de l'ordre de 138,0 µg/ml (Lehbili *et al.*, 2017).

V.4.2. Activité antiradicalaire pour le radical ABTS^{•+}

L'activité antioxydante des différents extraits est déduite de leur capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}. Ce dernier va réagir avec le persulfate de potassium pour donner le radical

ABTS⁺ ce qui conduit à une surestimation de la capacité antioxydante (**Katalinic et al., 2006**). Après avoir additionné les extraits et les standards, une décoloration de la solution ABTS s'est produite (Figure 34), ce qui indique l'existence d'une activité scavenger des échantillons testés.

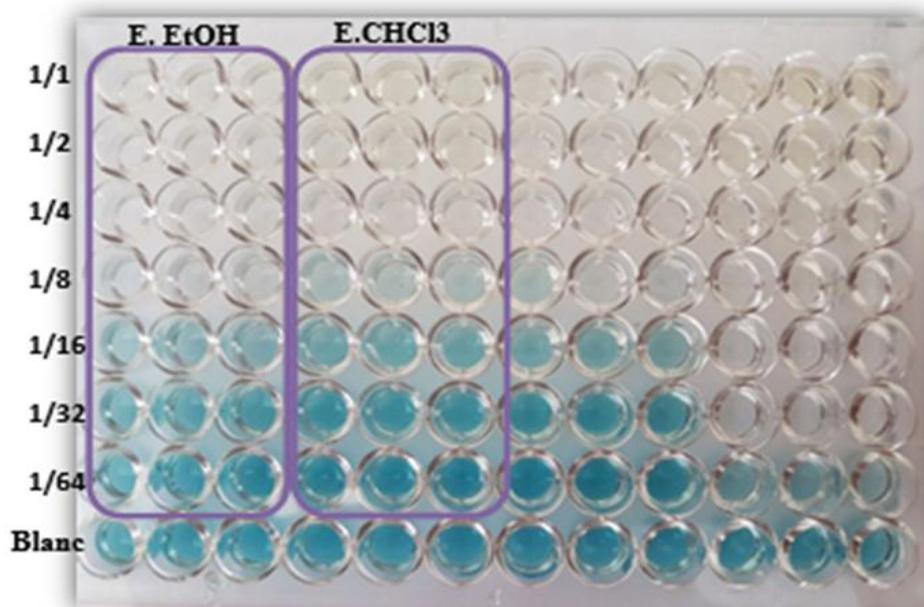


Figure 34 : Photo prises lors du dosage de l'activité antiradicalaire ABTS.

Afin de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition trouvé dans la figure 34 nous avons calculé les concentrations inhibitrices de chaque échantillon à 734 nm suivi par un traitement des résultats de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations.

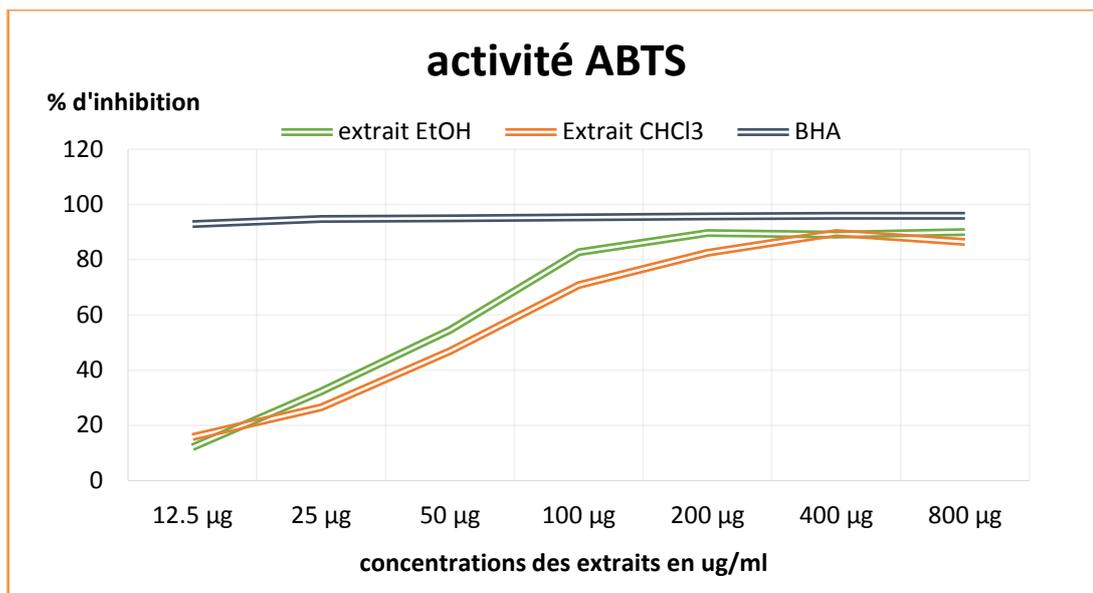


Figure 35 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'ABTS par les deux extraits de *Calendula*.

Les résultats des IC₅₀ ont été traduits aussi sous forme d'histogramme (Figure 36) afin de faciliter la comparaison des deux extraits avec le standard.

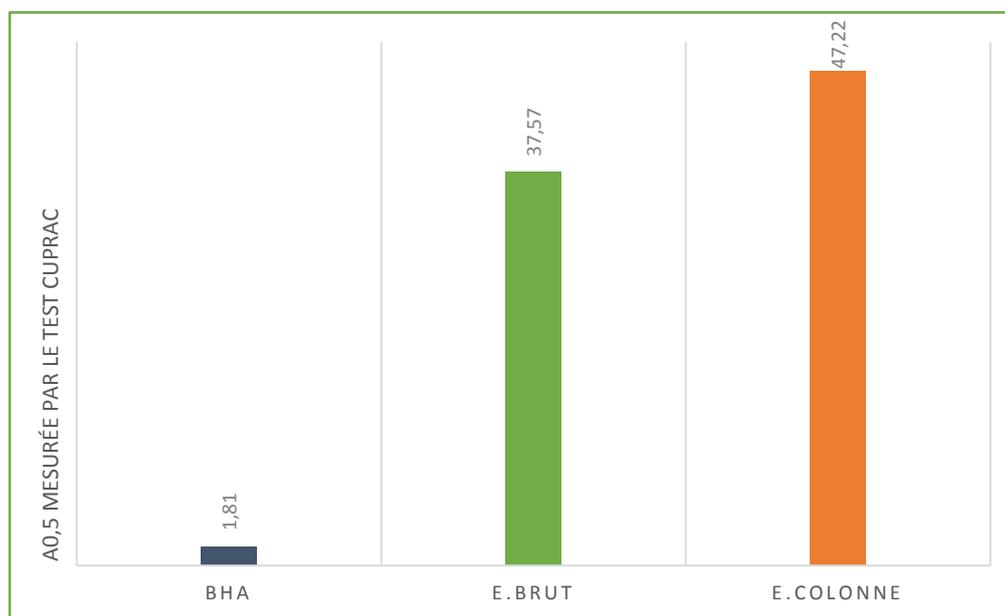


Figure 36 : valeurs des IC₅₀ exprimés en ug / ml des échantillons étudiés classer en ordre croissant.

Les résultats obtenus montrent que les extraits : Brut et Chloroformique ont manifesté une activité inhibitrice du radical ABTS modérée et inférieure à celle du standard. Ce pouvoir est confirmé par des valeurs d'IC₅₀ un peu plus élevées (47,22±4,86 µg/ml pour l'extrait brut et 37,57±14,81 µg/ml pour l'extrait Chloroformique).

V.4.3. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

Dans l'essai CUPRAC, les résultats sont représentés par A_{0,5} correspondant à la concentration par rapport à l'absorbance 0,5, car selon la loi de Beer, la linéarité est très précise entre les valeurs d'absorbance 0,2 et 0,8. L'absorbance augmente avec la concentration croissante des fractions. Les A_{0,5} sont déterminées graphiquement à partir des droites de régression linéaire des absorbances en fonction des concentrations, tracées par le logiciel OriginePro 8 (Figure 37). Ces résultats sont représentés par ordre croissant sous forme d'un histogramme (Figure 38).

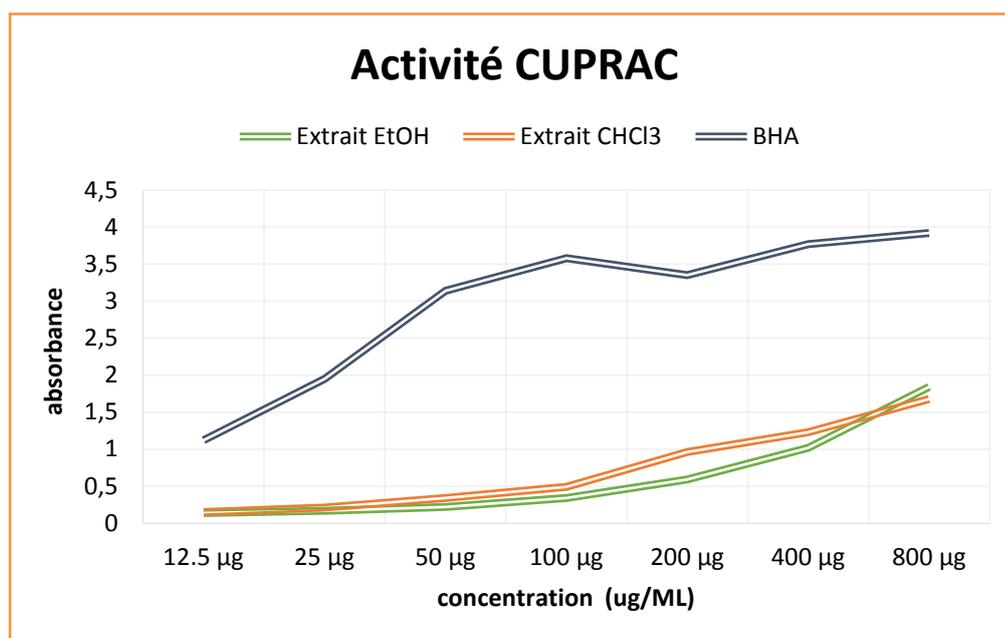


Figure 37 : Courbes des absorbances en fonction des concentrations (CUPRAC).

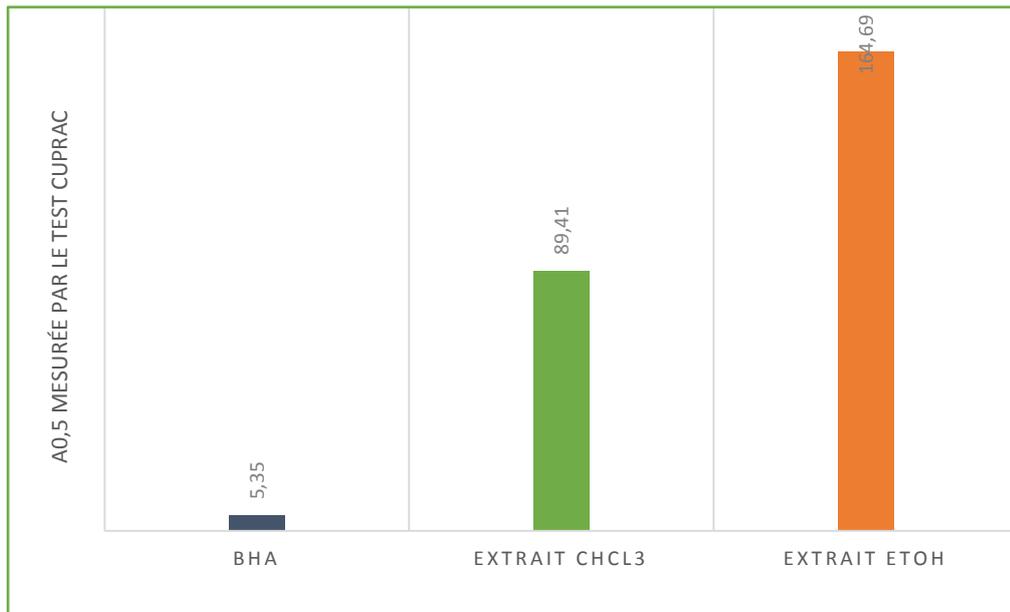


Figure 38 : les A_{0,5} des échantillons testés classés par ordre croissant (CUPRAC).

L'activité CUPRAC indique une relation inverse entre les A_{0,5} et la capacité antioxydante des échantillons testés. La figure ci-dessous illustre le virage de la couleur par rapport au blanc confirmant ainsi les résultats du test.

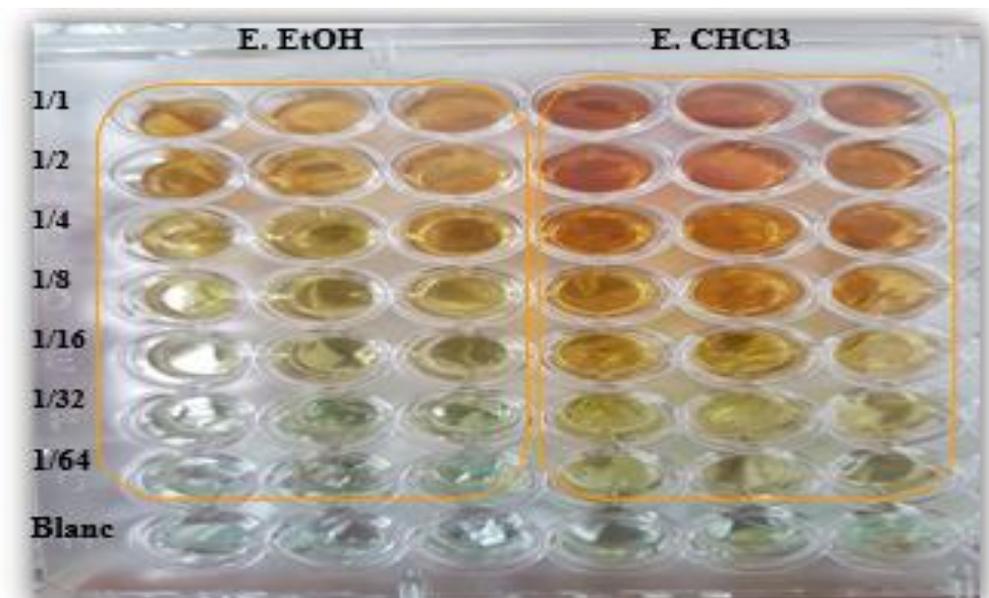


Figure 39 : Photo prises lors du dosage de l'activité CUPRAC

Il ressort de ces résultats, que L'extrait Chloroformique ($A_{0.5} = 89,41 \pm 20,80 \mu\text{g/mL}$) présente une meilleure réduction de l'activité antioxydante comparativement à l'extrait Brut ($A_{0.5} = 164,69 \pm 14,25 \mu\text{g/mL}$). Dans les mêmes conditions le BHA montre une valeur de $A_{0.5} = 5,35 \pm 0,71 \mu\text{g/mL}$

Conclusion générale

L'Algérie dispose d'une très grande variété végétale et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ne sont pas évaluées scientifiquement. Parmi elles, la plante *calendula* qui appartient à la famille des Astéracées, Cette famille est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires, Il s'agit essentiellement des polyphénols, des flavonoïdes, des isoflavonoides, des tanins, et des saponosides. Elles possèdent aussi, des activités biologiques intéressantes, à savoir antioxydante, antimicrobienne, antivirale, anti-infection, anti-inflammatoire, antitumorale...etc. Ainsi avons-nous décidé de choisir cette plante.

L'objectif principal de ce travail est de fournir des informations scientifiques objectives sur le genre *Calendula* permettant d'une part, la connaissance de leur composition chimique et de tester leur activité antioxydante d'autre part.

Les différents tests préliminaires dans les plaques CCM plus le screening phytochimique par réactions colorées effectuer sur les 3 extraits (chloroformique, butanolique et acétate d'éthyle) ont conduit à l'isolement des grandes classes des métabolites secondaires : polyphénols, flavonoïdes, stérols, terpènes et les saponosides.

L'activité antioxydante des extraits brut et chloroformique des parties aériennes de notre espèce a été évalué à différentes échèles par le test DPPH, ABTS et CUPRAC ce qui nous a permis de confirmer leurs pouvoir scavenger de radicaux libres. Cette activité est liée en grande partie à la composition des extraits et leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes.

En vue de la valorisation de cette espèce, il convient d'envisager une étude plus approfondie, telle que l'étude saisonnière et géographique et leurs influences sur sa diversité chimique.

Références Bibliographiques

- Abad, M.-J., L.M.B. Del Olmo, L.A. Ticona, et P.B. Benito. (2012). The Artemisia L. genus: a review of bioactive sesquiterpene sactones. *Studies in natural products chemistry* 37 (Elsevier), 43-65.
- Abe, E., Delyle, S. G., & Alvarez, J. C. (2010). Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. In *Annales de Toxicologie Analytique*, 22(2), 51-59. EDP Sciences.
- Adolphi, B., Scholz-Ahrens, K.E., de Vrese, M., Acil, Y., Laue, C., Schrezenmeir, J. (2009). Short-term effect of bedtime consumption of fermented milk supplemented withcalcium, inulin-type fructans and caseinphosphopeptides on bone metabolism in healthy, postmenopausal women. *European Journal of Nutrition*. 48(1), 45-53.
- Aganga, A. A., & Mosase, K. W. (2001). Tannin content, nutritive value and dry matter digestibility of Lonchocarpus capassa, Zizyphus mucronata, Sclerocarya birrea, Kirkia acuminata and Rhus lancea seeds. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1-2), 107-113.
- Aguirre.M. C, Delporte.C, Backhouse.N, Erazo.S, Letelier.M. E, Cassels.B. K, Silva.X, Alegria.S, Negrete.R (2006). Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of Ugni molinae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 5673-5677.
- Akoroda, M. O. (1981). *Studies on the genetics and floral biology of yams (rotundata D and cayenensis D)* (Doctoral dissertation, PhD thesis, Department of Agronomy, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria).
- Alaniz, F. S., Mazzarini L.A., Demo, M.S., Sabini, L.I., Maldonado A.M. (2010). Derivated products from Achyrocline satureioides and Arnica Montana, with immunomodulating effects. *Molecular Medicinal Chemistry*. 20, 121-124.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta*, 76(1), 55-61.
- Amirghofran, Z., Azadbakht, M., & Karimi, M. H. (2000). Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 167-172.
- Amsol, P. (2002). *L'huile de tournesol : un partenaire de notre alimentation quotidienne*. France.

- Antolin, G., F.V. Tinaut, Y. Briceno, V. Castano, C. Perez, et A.I. Ramirez. (2002). Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource technology* 83 (2), 111-114.
- Apak R, Güçlü K, Özurek M, Karademir S. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arora, D., A. Rani, et A. Sharma. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula* *Pharmacognosy Reviews* 7 (14), 179.
- Asp, M. L., Collene, A. L., Norris, L. E., Cole, R. M., Stout, M. B., Tang, S. Y., ... & Belury, M. A. (2011). Time-dependent effects of safflower oil to improve glycemia, inflammation and blood lipids in obese, post-menopausal women with type 2 diabetes: a randomized, double-masked, crossover study. *Clinical nutrition*, 30(4), 443-449.

-B-

- Baba Aissa, F. (1991). *Les plantes médicinales en Algérie.coédition Bouchene et ad. Diwan*, Alger, 29.
- Baillon, H., & del Castillo, E. D. (1886). Histoire naturelle des plantes. *Imprimerie nationale*.
- Baldwin, B. G., Wessa, B. L., Panero, J. L. (2002). Nuclear DNA evidence for major lineages of Helenioid Heliantheae (Compositae). *Systematic Botany* 27, 161-198.
- Bammou, M., Daoudi, A., Sellam, K., El Rhaffari, L., Ibjibijen, J., & Nassiri, L. (2015). Ethnobotanical Survey of Asteraceae Family used in Meknes-Tafilalet Region (Morocco). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 13(4), 789-815.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bogdanova NS, N. I., Pershin GN, et al. (1970). Study of antiviral properties of *Calendula officinalis*. *Farmakol Toksikol (Moscow)* 33, 349-355.
- Bonanno, J. B., Edo, C., Eswar, N., Pieper, U., Romanowski, M. J., Ilyin, V.....,& Burley, S. K. (2001). Structural genomics of enzymes involved in sterol/isoprenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 12896-12901.
- Bonanno, J. B., Edo, C., Eswar, N., Pieper, U., Romanowski, M. J., Ilyn, V., Gerchman, S. E., Studier, F. W., Sali, A., Burley, S. K. (2001). Structural genomics of

enzymes involved in sterol/ isoprenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 12896–12901.

- Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, G.M. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compound. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379, 381–390.
- Bouzid, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne. *Lebanese Science Journal*, 12(1), 59-69.
- Bremer, K. (1987). Tribal interrelationships of the Asteraceae. *Cladistics* 3, 210-253.
- Bremer, K. (1994). *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland: Timber Press.
- Bremer, K., Jansen, R. K. (1992). A new subfamily of the Asteraceae. *Ann. Missouri Botanic Garden*, 79, 414-415.
- Brighenti, F. (2007). Dietary fructans and serum triacylglycerols: A meta-analysis of randomized controlled trials. *The Journal of nutrition*. 137(11), 112.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie- Phytochimie, Plantes médicinales*. Ed. (3), Paris.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Ed. (4) Lavoisier, Paris, France.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Ed. (2) Université de Paris- sud, France, 389–617.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Ed. (3) Techniques et documentation, Paris.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5636-5645.
- Buddhan S., Sivakumara R., Dhandapania N., Ganeshana B., Anandana R. (2007). Protective effect of dietary squalene supplementation on mitochondrial function in liver of aged rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 76, 349-355.

-C-

- Cakir, A., Mavi, A., Yıldırım, A., Duru, M.E., Harmandar, M., Kazaz, C. (2003). Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology*. 87, 73-83.

- Calabria, L. M., Piacente, S., Kapusta, I., Dharmawardhane, S.F., Segarra, F.M., Pessiki, P.J., Mabry, T.J. (2008). Triterpene saponins from *Silphium radula*. *Phytochemistry*, 69(4), 961-972.
- Calero, J., D. Luna, E.D. Sancho, C. Luna, F.M. Bautista, A.A. Romero, A. Posadillo, et C. Verdugo. (2014). Development of a new biodiesel that integrates glycerol, by using CaO as heterogeneous catalyst, in the partial methanolysis of sunflower oil. *Fuel*, 122, 94-102.
- Campos, A.M., Escobar, J., Lissi, E.A. (1996). The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 7, 43-49.
- Četković, G. S., Đilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., & Tumbas, V. T. (2003). Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L) extracts. *Acta periodica technologica*, (34) 93-102.
- Childs, R.E., Badsky, W.G. (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,20-azino bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid as chromogen. *Biochemistry Journal*, 145, 93-103.
- Crete.P. (1965). *Précis de botanique* (2 ed.). Paris : Masson.
- Cristina Popovici, I. S., Bartek Tytkowski. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.
- Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flower plants*. Bronx, NY.
- Cronquist, A. (2001). *Vascular flora of the southeastern United States: Asteraceae* (1), UNC Press Books.
- Cushnie T.P.T. and Lamb A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.

-D-

- Daoudi, A., Bachiri, L., Bammou, M., Ibibijen, J., & Nassiri, L. (2015). ETUDE ETHNOBOTANIQUE AU MOYEN ATLAS CENTRAL. *European Scientific Journal* 11, 24.
- Dasgupta, N., De, B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a comparative study. *Food Chemistry*, 101, 471-474.
- De Rijke E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112, 31-63.

- Demirbaş, A., et H. Kara. (2006). New options for conversion of vegetable oils to alternative fuels. *Energy Sources, Part A : Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 28(7), 619-626.
- Deng, Y., Chen, S., Teng, N., Chen, F., Li, F., Song, A., & Guan, Z. (2010). Flower morphologic anatomy and embryological characteristics in *Chrysanthemum multicaule* (Asteraceae). *Scientia horticulturae*, 124(4), 500-505.
- Dewick, P. M. (1999). The biosynthesis of C 5–C 25 terpenoid compounds. *Natural product reports*, 16(1), 97-130.
- Dey P. M., Harborne J. B. (1991). *Methods in plant biochemistry*. (7), Terpenoids. San Diego : Academic press.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97, 654-660.
- Dupont, F., Guignard, J.L. (2012). *Botanique, les familles de plantes* (15 ed.). France.

-E-

- Eldahmy, S., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Sarg, T.M. (1985). New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*. 41(2), 309-316.
- Ercetin T, S. F., Orhan IE, Toker G. (2012). Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Industrial crops and products*, 36, 203-208.

-F-

- Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 108-115.
- Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Bagci, Y., Kargioglu, M. (2002). Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* from Turkey. *Phytochemistry*. 61(4), 433-437.
- Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C. Leverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique : Antioxidants in critically ill patients. *Réanimation*, 11(6), 411-420.
- Fulda, S., Friesen, C., Los, M., Scaffidi, C., Mier, W., Benedict, M.,...& Debatin, K. M. (1997). Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)-and p53-independent apoptosis

via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer research*, 57(21), 4956-4964.

- Funk, V. A., R.J. Ba, S.K. Er, R. Chan, L. Watson, B. Gemeinholzer, E. Schilling, J.L.Panero, B.G. Baldwin, N. Garcia-Jacas. (2005). *Everywhere but Antarctica: using asupertree to understand the diversity and distribution of the Compositae* (343). Denmark.

-G-

- Gambini, J., Granier, R. (2013). Effets indésirables des rayons X. EMC-RADIOLOGIE ET IMAGERIE MÉDICALE : Principes et techniques – Radioprotection, 1-20.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53(5), 1370-1373.
- Ghédira, K., & Goetz, P. (2016). *Calendula officinalis* L. (Asteraceae): souci. *Phytothérapie*, 14(1), 62-67.
- Goetz, P. (2009). Phytothérapie de l'eczéma. *Phytothérapie*, 7(4), 211-214.
- González-Gallego, J., S. Sánchez-Campos, and M.J. Tuñón. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion hospitalaria*. *Nutricion hospitalaria*, 22 (3), 287-293.
- Gordana, S. Ćetkovi, S. M. D., Jasna M. et Vesna T. Tumbas. (2004). Antioxidant properties of marigold extracts. *Barajas. Journal of food research international*, 643-650.
- Grayer, R.J. and Harborne J.B. A. (1994). Survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*, 37, 19-42.
- Graziose, R., M.A. Lila, et I. Raskin. (2010). Merging traditional Chinese medicine with modern drug discovery technologies to find novel drugs and functional foods *Current drug discovery technologies* 7 (1), 2-12.
- Group, A. P. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2) 105-121.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391. Gülçin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R.

(2006). Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber. *Phytomedicine*, 13(5), 343-351.

-H-

- Halbwirth, H. 2010. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 595-621.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease - an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Hamad, M. N., Mohammed, H. J., & Merdaw, M. A. (2017). Antibacterial activity of *Calendula officinalis* flowers in vitro. *Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Science*, 24(3), 1-7.
- Harborne, J. B. (1973). Phenolic compounds. In *Phytochemical methods*, 33-88. Springer, Dordrecht.
- Harborne, J.B. (1988). The flavonoids, advances in research since 1980. London : Chapman & Hall.
- Hmamouchi, M. (1999). *Les plantes médicinales et aromatiques marocaines* (FEDALA ed.). Rabat.
- Hostettmann, K., Marston, A. (1995). Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins. Cambridge University Press, 117.
- Hu, J. J., Cui, T., Rodriguez-Gil, J. L., Allen, G. O., Li, J., Takita, C., & Lally, B. E. (2014). Complementary and alternative medicine in reducing radiation-induced skin toxicity. *Radiat Environ Biophys* 53, 621-626.
- Hussain, H., Al- Harrasi, A., Abbas, G., Rehman, N. U., Mabood, F., Ahmed, I., ... & Badshah, A. (2013). The genus *Pluchea*: phytochemistry, traditional uses, and biological activities *Chemistry & Biodiversity* 10 (11) 1944-1971.

-J-

- Jang, S. M., Yee, S. T., Choi, J., Choi, M. S., Do, G. M., Jeon, S. M., ... & Lee, M. K. (2009). Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β -cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. *International immunopharmacology*, 9(1), 113-119.
- Jimenez, M. E., Garcia, L.A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A., 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*, 6, 119.

- Jimenez-Gonzalez L., Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. and Rodriguez-Garcia I. (2008). Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, 7, 125-154.

-K-

- Kale, A., Gawande, S., Kotwal, S. (2008). Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research*, 22, 567–577.
- Kalvatchev Z, W. R., Garzaro D. (1997). Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomedical Pharmacotherapy* 51, 176–180.
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, 550-557.
- Kim, D-O.; Seung, W. J.; Lee, C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321–326.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 0411110005-0411110005.
- Kubola J, Siriamornpun S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*, 110(4): 881-8.
- Kumaran, A., Joel Karunakaran, R. (2007). Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 100, 356-361.

-L-

- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progression in Lipid Research*, 46 (5), 244- 82.
- Laszczyk, M. U. (2009). Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane groups as tools in cancer therapy. *Planta Medica*, 75, 1549-1560.
- Lee, K.Y., Weintraub, S.T., Yu, B.P. (2000). Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(2) 261-265.
- Lehbili, M., Magid, A. A., Kabouche, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Abedini, A., Morjani, H., ... & Kabouche, Z. (2017). Oleanane-type triterpene saponins from *Calendula stellata*. *Phytochemistry*, 144, 33-42.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2010). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125, 288-306.

- Leverage, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
- Lury, M. (2011). Daily dose of safflower oil can help reduce cardiovascular disease. *Medical Research News*.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., and Aruoma, O.I. (2002).Antioxidant Activities of Phenolic, Proanthocyanidin, and Flavonoid Components in Extracts of *Cassia fistula* J. Agric. *Food Chemistry*. 50, 5042-5047.
- Lyß, G., Knorre, A., Schmidt, T. J., Pahl, H. L., & Merfort, I. (1998). The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-κB by directly targeting *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33508-33516.

-M-

- Ma, F., et M.A. Hanna. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource technology*, 70(1), 1–15.
- Macheix, J.J., A. Fleuriet, and C. Jay-Allemand. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et Universitaires romandes. 4-5.
- Mandal, S., Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S., & Mandal, N. (2011). Assessment of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging activity of methanolic extract of *Caesalpinia crista* leaf. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., Manian, S. (2008). The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.)O.Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry*, 107, 1000-1007.
- Manitto P. (1981). Biosynthesis of natural products. New York : John Wiley.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89(3), 411-420.
- Marques-Martin, A., De La Puerta, R., Fernandez-Arche, A., Ruiz-Gutierrez, V., Yaqoob, P. (2006). Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine* 36, 211-217.
- Marukami, T., Kishi, A., & Yoshikawa, M. (2001). Medicinal flowers. IV. Marigold. (2): Structures of new ionone and sesquiterpene glycosides from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 49(8), 974-978.

- Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F., Menghini, A., & Fasulo, M. P. (1987). Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. *Phytotherapy research*, 1(1), 28-31.
- Middleton, E., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, (2000). The effects of plants flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.
- Millanvoye, G. (1986). Mini-encyclopedie des medecines naturelles *France Loisirs*. Paris.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Michael, J.D., Vimala, G., Anthony, M. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Mladinka, P., Zatloukalova, L., Filipisky, T., Hrdina R., (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 963-975.
- Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Mora, C., D.P. Tittensor, S. Adl, A.G.B. Simpson, B. Worm. (2011). How many species are there on earth and in the ocean?. *PLoS Biol*, 9 (8): e1001127.

-O-

- Özyürek Mustafa, Kubilay Güçlü, Tütem Esmâ, Kevser Sözgen Baskan, Erol Erçag, S.Esin çelik, Baki Safa, Yıldız Leyla, Karaman Seyda, Apak Resat. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology, *CRITICAL REVIEW*, 3, 2439.

-P-

- Panero, J. L., Funk, V. A. (2002). Toward a phylogenetic classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115, 909-922.
- Panero, J. L., Funk, V. A. (2007). New infrafamilial taxa in Asteraceae. *Phytologia* 89, 356-360.
- Panero, J. L., Funk, V. A. (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular phylogenetics and evolution*, 47(2), 757-782.
- Patocka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* 1, 7–12.

- Peyroux J, R. P., Delaveau P (1981). Propriétés antioedémateuses et anti-hyperhémiantes du *Calendula officinalis* L. *Plant Medicinale Phytothérapie* 15.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4, 5.
- Pizza, C., & De Tommasi, N. (1988). Sesquiterpene glycosides based on the alloaromadendrane skeleton from *Calendula arvensis*. *Phytochemistry*, 27(7), 2205-2208.
- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- Preethi, K. C., Kuttan, G., Kuttan, R. (2006). Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Biology*. 44(9), 691-697.
- Preethi, K. C., Kuttan, G., 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), 113-120.

-Q-

- Quezel, F., Santa, S. (1962-1963). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. (CNRS ed.) (1-2). Paris, France.

-R-

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans et Miller. (1999). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 56-933.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Roberta, R.E., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.A., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

- Rochette, L. (2008). Stress oxydant et sepsis. *Réanimation*, 17(6), 1-4.
- Rufer, C. E., Kulling, S. E. (2006). Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2926-2931.

-S-

- Safayhi, H., Sailer, E.-R. (1997). Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica*, 63, 487-493.
- San Feliciano, A., Medarde, M., Miguel del Corral, J. M., Aramburu, A., Gordaliza, M., Barrero, A. F. (1989). Aquatolide a new type of humulane-related sesquiterpene lactone. *Tetrahedron Letters*. 30(21), 2851-2854.
- Schmidt, M. L., Kuzmanoff, K. L., Ling-Indeck, L., & Pezzuto, J. M. (1997). Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *European Journal of Cancer*, 33(12), 2007-2010.
- Schulte, A. E., van der Heijden, R., & Verpoorte, R. (1999). Microplate Enzyme-Coupled Assays of Mevalonate and Phosphomevalonate Kinase from *Catharanthus roseus* Suspension Cultured Cells. *Analytical biochemistry*, 269(2), 245-254.
- Sensöz, S., et D. Angin. (2008). Pyrolysis of safflower (*Charthamus Tinctorius* L.) seed presscake in a fixed-bed reactor: part 2. Structural characterization of pyrolysis bio-oils. *Bioresource Technology*, 99 (13), 5498-5504.
- Serier J B. (1979). Le guayule *Parthenium argentatum* : son intérêt économique, sa culture, l'extraction et les propriétés de son caoutchouc. *Revue Générale du Caoutchouc et des Plastiques*, 56 (591), 75-85.
- Shipochliev, T. (1981). Uterotonic action of extracts from a group of medicinal plants. *Veterinarno-meditsinski nauki*, 18(4), 94-98.
- Shivani, S., Sunil, S. (2013). Antidiabetic effect of *Helianthus annuus* L., seeds ethanolic extract in streptozotocin- nicotinamide induced type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 382-387.
- Singh, G. (2004). An Integrated Approach. Science Publishers. *Plant Systematics*.
- Stefan Safer, S., Serhat, S., Cicek, S.S., Valerio Pieri, V., Stefan Schwaiger, S., Peter Schneider, P., Volker Wissemann, V., Hermann Stuppner, H. (2011). Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of 1H NMR and HPLC–ESIMS. *Phytochemistry*. 72, 1379-1389.
- Stevens, P. F. (2008). Angiosperm Phylogeny Website. (Version 9 ed.).

- Susunaga, G. S., Siani, A. C., Pizzolatti, M. G., Yunesb, R. A., Delle Monache, F. (2001). Triterpenes from the Resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia* 72, 709-711.

-T-

- Tabuti, J. R., Lye, K. A., & Dhillion, S. S. (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of ethnopharmacology*, 88(1), 19-44.
- Tanideh, N., Tavakoli, P., Saghiri, M. A., Garcia-Godoy, F., Amanat, D., Tadbir, A. A., ... & Tamadon. (2012). Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology*. 115, 332-338.
- Tarnawski, M., Depta, K., Grejciun, D., & Szelepin, B. (2006). HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract—a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(1), 182-188.
- Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P., Osbourn A. (2014). Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol*, 65, 225-57.

-U-

- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T., & Kimura, Y. (2006). Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal of natural products*, 69(12), 1692-1696.
- Urquiaga, I. and F. Leighton. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33 (2), 55-64.

-V-

- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1(1), 13-25.
- Vincken J. P, Heng L., de Groot A., Gruppen H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68, 275-297.
- Visioli, F., C. A. De La Lastra, C. Andres-Lacueva, M. Aviram, C. Calhau, A. Cassano, M. D'Archivio, A. Faria, G. Fave, V. Fogliano, R. Llorach, P. Vitaglione, M. Zoratti and M. Edeas. (2011). Polyphenols and Human Health: A Prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 524-546.
- Vogel, P. (1998). *Chimie organique : Méthodes et modèles*. De Boeck Supérieur, France.

-W-

- Wang, Y.-Y., Y.-X. Yang, H Zhe, Z.-X. He, et S.-F. Zhou. (2014). Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drug design, development and therapy*. 8, 2075.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126, 485-493.

-X-

- Xu, Y. C., Leung, S. W., Yeung, D. Y., Hu, L. H., Chen, G. H., Che, C. M., Man, R. K. (2007). Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*, 68, 1179-1188.

-Y-

- Yin, X., H. Ma, Q. You, Z. Wang, et J. Chang. (2012). Comparison of four different enhancing methods for preparing biodiesel through transesterification of sunflower oil *Applied Energy* 91 (1)320-325.

-Z-

- Zheng, X., W.Wang, H. Piao, W. Xu, H. Shi, et C. Zhao. (2013). The genus *Gnaphalium* L. (Compositae) : phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18 (7), 8298-8318.
- Zitterl-Eglseer, K., Sosa, S. I. L. V. I. O., Jurenitsch, J., Schubert-Zsilavec, M., Della Loggia, R. O. B. E. R. T. O., Tubaro, A. U. R. E. L. I. A., ... & Franz, C. (1997). Anti-oedematous activities of the main triterpene diol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 139-144.
- Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C., Formelli, F. (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 175, 17-25.
- (1) : figure [3] <https://www.alamyimages.fr/photo-image-chamaemelum-chamomilla-50605553.html> schéma de la fleur *Matricaria chamomilla* L (Asteraceae). Consulté le 05/08/2020.

- (2) : figure [5] http://idao.cirad.fr/content/adventoi/especes/s/sonol/sonol_06_fr.html
Le fruit de *Sonchus oleraceus* L(Asteraceae) consulté le 01/05/2020.
- (3) : figure [6] <https://www.ecoledesherbes.org/2014/09/19/calendula/> Illustrations de *Calendula officinalis* (Souci des jardins) le 05/08/2020.
- (4) : figure [7] <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/query.asp> Carte géographique du genre *Calendula* Le 05/08/2020.
- (5) : <https://www.newpharma.fr/search-> Welada produits issue *calendula*.
- (5) : <https://www.yves-> Produits issue de *calendula*

Résumé

Ce travail fait partie du programme de recherche de notre Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapetiques (LOST) qui porte sur la valorisation des plantes médicinales, utilisées dans la pharmacopée traditionnelle en Afrique du nord (Algérie, Maroc et Tunisie), par la recherche de nouveaux principes actifs à activités biologiques intéressantes. Dans ce contexte, une plante médicinale de la famille Asteraceae : *Calendula* a été sélectionnée pour un screening phytochimiques et biologique.

Au moyen de CCM, et réactions colorées, l'identification et la caractérisation de différentes familles de métabolites secondaires ainsi que le dépistage de l'activité antioxydante ont été réalisés.

Mots clés : Asteraceae, *Calendula*, criblage phytochimiques, CCM, l'activité antioxydante.

Abstract

*This work is a part of the research program of our of laboratory (LOST) which concerns the evaluation of medicinal plants used in traditional medicine in North Africa (Algeria, Morocco and Tunisia) by the discovery of new active compounds with interesting biological activities. In this context, the medicinal plant of the Asteraceae family: *Calendula*. Has been selected for phytochemical and biological screening.*

By means ofTLC together with color reactions tests, identification and characterization of different families of secondary metabolites as well as tracking of antioxidant activity have been achieved.

Key words: Asteraceae, *Calendula*, phytochemical screening, TLC, antioxidant activity.

الملخص

هذا العمل هو جزء من برنامج بحث التحصل على المركبات العلاجية (LOST) الذي يتمحور حول بحث و تثمين بعض النباتات الطبية المستعملة في الطب الشعبي في شمال إفريقيا (الجزائر، المغرب و تونس) وذلك بالبحث عن مركبات طبيعية جديدة ذات نشاط بيولوجي متميز. في هذا السياق قمنا باختبار نبتة طبية من عائلة : *Calendula* و *Asteraceae*

لدراسة فيتوكيميائية وتشخيص بيولوجي

إستطعنا باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة والتفاعلات اللونية تحديد مختلف عائلات نواتج الايض الثانوية وكذلك فحص النشاط المضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Calendula*، *Asteraceae* ، التفاعلات اللونية، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، النشاط المضاد للأكسدة

Investigation phytochimique et potentiel antioxydant d'une plante Algérienne du genre *Calendula* (Asteraceae)

Mémoire de fin de cycle l'obtention du diplôme de master en
Biochimie Appliquée

Résumé

Ce travail fait partie du programme de recherche de notre Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) qui porte sur la valorisation des plantes médicinales, utilisées dans la pharmacopée traditionnelle en Afrique du nord (Algérie, Maroc et Tunisie), par la recherche de nouveaux principes actifs à activités biologiques intéressantes. Dans ce contexte, une plante médicinale de la famille Asteraceae : *Calendula* a été sélectionnée pour un screening phytochimiques et biologique.

Au moyen de CCM, et réactions colorées, l'identification et la caractérisation de différentes familles de métabolites secondaires ainsi que le dépistage de l'activité antioxydante ont été réalisés.

Mots clés : Asteraceae, *Calendula*, criblage phytochimiques, CCM, l'activité antioxydante.

Laboratoire de l'obtention des substances thérapeutiques (LOST), Université des frères Mentouri Constantine 1

Jury d'évaluation :

MOSBAH Asma	MCA. UFM Constantine	Président
BOUTAGHANE Naima	MCA. UFM Constantine	Rapporteur
TENIOU Soumia	MAA. UFM Constantine	Examineur