République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA

جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie

Réf :.....

Mémoire

Présenté par

M^me^ Taroudjit Yasmina et M^elle^ Telmat Lydia

Pour l'obtention du diplôme de

Master Professionnel

Filière : Biotechnologie et Sante

Spécialité : Biotechnologie

Thème

Optimisation des conditions d'extraction, des composés phénoliques et évaluation des activités antioxydant et antiinflammatoire d'une plante médicinale

Soutenu le :01 juillet 2024 Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mme Nait Chabane Z	MCB	Président
Mme BOUDJOU S	MCB	Encadrant
Mme LAIB Y	MAA	Examinateur

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciement

La rédaction de ce mémoire représente l'aboutissement de plusieurs années de travail, de persévérance et d'apprentissage. Ce parcours n'aurait pas été possible sans le soutien, les conseils et l'inspiration de nombreuses personnes, que je tiens à remercier du fond du cœur.

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, madame boudjou souhila, Sa guidance éclairée, sa patience et son soutien constant ont été inestimables. Ses remarques pertinentes et ses encouragements m'ont permis de surmonter les défis rencontrés et d'atteindre un niveau de rigueur académique que je n'aurais pu imaginer sans son aide.

Je remercie également l'ensemble du corps professoral de département biotechnologie et santé, faculté science de la nature et de la vie de l'université de Béjaïa targa ouzemour dont l'excellence et le dévouement ont nourri ma curiosité intellectuelle et m'ont offert les outils nécessaires pour mener à bien ce projet. Chaque cours, chaque discussion a été une pierre ajoutée à l'édifice de ce travail.

Je souhaite adresser des remerciements particuliers à mes collègues et amis, qui ont partagé avec moi les hauts et les bas de ce parcours. Leurs encouragements, leur soutien moral et leurs conseils avisés ont été des piliers sur lesquels je me suis appuyé tout au long de cette aventure.

Un merci tout spécial à ma famille, dont l'amour et le soutien inconditionnel ont été les forces motrices de mes efforts. À mes parents, qui ont cru en moi même dans les moments de doute, frères et sœurs, je vous suis éternellement reconnaissant. Votre confiance et votre patience m'ont donné la force de persévérer.

Enfin, je remercie tous ceux que je n'ai pas nommés ici mais qui ont, d'une manière ou d'une autre, apporté leur pierre à l'édifice de ce travail. Votre impact, bien que discret, n'en est pas moins significatif.

Avec toute ma gratitude,

Taroudjit yasmina

Telmat Lydia

À mes chers parents, dont le soutien inconditionnel, les encouragements constants et l'amour indéfectible ont été ma source d'inspiration tout au long de ce parcours académique. Votre dévouement et vos sacrifices ont été les piliers sur lesquels j'ai pu construire mon chemin vers la réussite.

À mes professeurs et encadrants, pour leur expertise, leur patience et leurs conseils avisés qui ont enrichi mes connaissances et guidé mes recherches. Votre enseignement a été bien au-delà des salles de classe, façonnant ma perspective académique et professionnelle.

À mes amis et collègues, pour les moments partagés, les discussions enrichissantes et le soutien mutuel qui ont rendu cette expérience d'apprentissage plus significative et mémorable.

Ce mémoire est le résultat de vos contributions précieuses et de votre présence constante à mes côtés. Je vous suis profondément reconnaissant pour tout ce que vous avez apporté à ce parcours académique, et je dédie ce travail à chacun d'entre vous avec une gratitude sincère.

Yasmina

Je dédié ce projet

A ma chère mère

A mon cher père

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs

A mes chers frères Tahar et Athman

A ma chère seule sœur Radia

Pour ses soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études

A mon cher Kako

Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles

A mes chères tentes paternelle Naima et maternelle Nassima, Sonia, Souhila, Souad

A ma chère binôme Yasmina

Pour son entente et sa sympathie

Pour leur indéfectibles soutient et leur patience infinie

A mes chères amies Lydia, Wafa, Chalabiya, Ibtissem, Hania, Nesrine

Pour leur aide

A toute ma famille

Lydia

Table des Matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction……..1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralité sur *Calendula arvensis*

1. Historique…….....3
2. L'espèce Calendula Arvensis……3
3. Classification hiérarchique……....4
4. Description botanique……...5
5. Composition chimique de *Calendula arvensis*……6
6. Domaines d'application et intérêt phytothérapie *Calendula arvensis*……..7
7. Composition phytochimique du *Calendula arvensis*……....8
8. Les activités biologiques de *Calendula arvensis*……..8

Chapitre II : Activité antioxydant et antiinflammatoire

1. Stresse oxydative……..……9
2. Les types des antioxydants……...9
   2.1.Mécanisme d'action des antioxydants……..10
3. Inflammation……...……10
   3.1.Les inflammations……11

Partie II : Matériels et méthodes

Chapitre III : Matériels et méthodes

1. Matériel végétale……12
   1.1. Préparation et conservation du matériel végétal……..12
2. Extraction des composés phénoliques……12
   2.1.Principe de la méthode d'extraction par micro-onde……12
3. Filtration……..13
4. Etude préliminaire……...13

5. Plan d'expérience…….…….14
5.1.Plan Box BenKen…….14
5.2.Application de plan d'expérience…….15
6. Dosage de composés phénoliques totaux……..15
7. Dosage des flavonoïdes……..16
8. Dosage des flavonols……..16
9. Dosage des tanins condenses……..16
10. Activités antioxydants……17
10.1. Activité anti radicalaire (ABTS)……...17
10.2. Activité anti radicalaire (DPPH)……..18
10.3. Activité anti-radicalaire du OH…….19
11. Activités anti-inflammatoires……20
11.1. Mesure de l'activité anti-dénaturation de la BSA……20
11.2. Test ovalbumine……...…….20
12. Traitement statistique des résultats…….21

Chapitre IV : Résultats et discussion

1. Extraction assistée par microonde……...22
2. Evaluation de la corrélation……23
3. Estimation des coefficients…….25
3.1.Effet linéarité……26
3.2.Effet d'interaction……....26
3.3.Effet quadratique……..28
4. Conditions optimales……...28
5. Teneur de quelques composés phénoliques des extraits obtenus après l'optimisation…...30
5.1.Teneur en composés phénoliques……31
5.2.Teneur en flavonoïdes……..31
5.3.Teneur en flavonols……..33
5.4.Teneur en tanins condensés……..33
6. Résultats des activités antioxydants des extraits obtenus après l'optimisation……...34
6.1.Effet anti radicalaire vus à vis du radical DPPH……..34
6.2.Activités antioxydant ABTS……37
6.3.Activités antioxydant vis-à-vis du radical OH…….38
7. Résultats des activités antiinflammatoires des extraits obtenus après l'optimisation…….41

7.1.Activité antiinflammatoire BSA……41
7.2.Activité antiinflammatoire ovalbumine…….42

Conclusion……..44

Liste des références

Annexe

Résumé

Liste des figures :

Figure 01 : *Calendula arvensis*.

Figure 02 : Illustration de *Calendula arvensis.*

Figure 03 : Schéma des activités biologiques de *Calendula arvensis*.

Figure 04 : Mécanisme d'action des antioxydants.

Figure 05 : Mécanisme d'action des antiinflammatoires.

Figure 06 : Poudre des fleurs.

Figure 07 : Poudre des feuilles.

Figure 08 : filtration des extraits des fleurs.

Figure 09 : filtration des extraits des feuilles.

Figure 10 : Plan de prédiction pour l'extraction des polyphénols de feuilles du Calendula arvensis.

Figure 11 : Plan de prédiction pour l'extraction des polyphénols de fleur du Calendula arvensis.

Figure 12 : Graphique de surface de réponse présentent les interactions entre les facteurs étudiés pour les feuilles.

Figure 13 : Graphique de surface de réponse présentent les interactions entre les facteurs étudiés pour les fleurs.

Figure 14 : Profileurs de prédiction pour les conditions optimales obtenues des feuilles.

Figure 15 : Profileurs de prédiction pour les conditions optimales obtenues des fleurs.

Figure 16 : Effet scavenger contre le DPPH des extraits de feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* et des deux standard BHT et acide ascorbique

Figure 17 : Histogramme des concentrations inhibitrice a 50% (IC50) des feuilles, fleurs, acide ascorbique et BHT.

Figure 18 : Pourcentage d'inhibition d'ABTS des feuilles et fleurs du *Calendula arvensis* et des deux standards BHT et acide ascorbique.

Figure 19 : Valeur des IC50 des feuilles, fleurs et standards pour ABTS.

Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de radical OH des feuilles et fleurs du *Calendula arvensis* et des deux standards BHT et acide ascorbique.

Figure 21 : Valeurs des IC50 des feuilles et fleurs de *calendula arvensis* pour OH.

Figure 22 : Les pourcentages d'inhibitions de la BSA pour les extraits des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* et de Diclofinac

Figure 23 : Valeurs des IC50 d'activité anti inflammatoire BSA des extraits de Calendula arvensis et de standard diclofinac.

Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de test ovalbumine pour les feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* et de celebrex.

Figure 25 : Les valeurs des IC50 des feuilles et fleurs de Calendula arvensis et de standard celebrex.

La liste de tableaux :

Tableau I : Classification *Calendula arvensis.*

Tableau II : Composition chimique des extraits d'hexane de *Calendula arvensis.*

Tableau III : Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire.

Tableau IV : Les niveaux des facteurs choisis pour la construction du plan d'expérience.

Tableau V : valeurs expérimentales et prédite des TCP et de l'activité ABTS des feuilles de *Calendula arvensis* du plan Box Bhenken

Tableau VI : valeurs expérimentales et prédite des TCP et de l'activité ABTS des fleurs de *Calendula arvensis* du plan Box Bhenken

Tableau VII : Les principaux coefficients de régression appliqués dans l'analyse statistique du modèle Box-Behnken pour les feuilles de *Calendula arvensis.*

Tableau VII : Les principaux coefficients de régression appliqués dans l'analyse statistique du modèle Box-Behnken pour les fleurs du *Calendula arvensis.*

Tableau IX : Valeurs prévues et expérimentales des teneurs en composés phénoliques et de l'activité ABTS obtenus pour les feuilles et fleurs de *Calendula arvensis*.

Tableau X : les teneurs des composés phénoliques des extraits de feuilles et fleur de *Calendula arvensis.*

Liste des abréviations :

ET : écart type

$Alcl_3$: chlorure d'aluminium

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

% : pourcentage

OH : groupement hydroxyle

MSR : plan de surface de réponse

SOD : Super oxyde dismutase

EQ : équivalent

GPX : la glutathion peroxydase

CAT : la catalase

GSH : glutathion

MS : matière sèche

AINS : antiinflammatoires non stéroïdiens

AIS : antiinflammatoires stéroïdiens

HCL : acide chlorhydrique

ABTS : sel d'ammonium d'acide 2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picryhydrazyl

BHT : butylhydroxytoluene

IC50 : concentration a 50%

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

Fe^{2+} : les ions ferreux

$FeSO_4$: sulfate de fer II heptahydrate

BSA : sérum albumine bovin

ANOVA : analyse of variance

TCP : composés phénoliques totaux

Prob : probabilité

mg : milligramme

ug : microgramme

ml : millilitre

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales occupent une place centrale dans les pratiques de santé et de bien-être depuis des millénaires. Utilisées par diverses civilisations à travers l'histoire, elles constituent une source précieuse de remèdes naturels pour traiter une multitude de maladies et de conditions de santé. En raison de leur accessibilité, de leur diversité et de leurs propriétés thérapeutiques, les plantes médicinales continuent d'être un pilier fondamental dans la médecine traditionnelle et moderne **(Hoslettnann et al,1982)**.

Avec l'avènement de la médecine moderne, l'intérêt pour les plantes médicinales a été ravivé, notamment en raison de la recherche scientifique visant à isoler et à comprendre les principes actifs des plantes **(Fabricant et al., 2001).** De nombreux médicaments modernes sont dérivés de plantes médicinales ou inspirés par elles. Par exemple, l'aspirine a été développée à partir de l'acide salicylique, un composé trouvé dans l'écorce de saule **(Vane et al., 2003).**

Les plantes médicinales représentent une immense source de métabolites et particulièrement les composés phénoliques (flavonoïdes, acide phénoliques, tanins…) qui possède des multiples activités biologiques et pharmacologique (antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobienne…), **(Karmakar,2011)** pour cela l'industrie pharmaceutique moderne s'appuie essentiellement sur la diversité des métabolites secondaires d'origine végétale pour trouver des nouvelle molécule qui ont des propriétés biologique et pharmacologique inédites et qui ne possède pas des effets secondaires pour l'être humain **(Hoslettnann et al,1982).** En pratique les plantes sont considérées en quelque sorte comme une usine chimique miniaturé qui synthétise et accumule dans ces tissus un ensemble de composées d'une grande diversité.

La famille des astéracées est bien connue pour les propriétés médicinales de plusieurs de ces genres **(Boussada et Al,2008)** dont *Calendula arvensis* ne fait pas exception **(Arora, Rani et Sharma,2013).** Elle communément appelée souci des champs, est une plante herbacée annuelle. Elle est largement répandue dans les régions méditerranéennes et est connue pour ses propriétés médicinales et ornementales. Utilisée depuis des siècles dans la médecine traditionnelle, *Calendula arvensis* possède de nombreuses applications thérapeutiques grâce à ses composés bioactifs **(Arora, Rani et Sharma,2013)**. En effet, *Calendula arvensis* est reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, cicatrisantes et antifongiques. Ces propriétés thérapeutiques sont principalement attribuées à ses composés bioactifs,

notamment les flavonoïdes, les triterpènes, les caroténoïdes et les huiles essentielles **(Aya Khouchlaa et Al, 2023).**

Notre travail, a pour objectif d'optimiser quelques conditions d'extraction par micro-onde, puis d'évaluer le profile phytochimique en compose phénolique des extraits du de feuilles et de fleurs de *Calendula arvensis*, et pour deuxième objectif d'étudier les activités antioxydant, anti-inflammatoire de ces extraits.

Face à la diversité des composés phénoliques présents dans le *Calendula arvensis* et à leur sensibilité aux conditions d'extractions. Quelle approche d'optimisation expérimentale permettrait de déterminé de manière efficace les paramètres clés (comme le solvant, la température, le temps d'extraction et le rapport solide/liquide) pour maximiser à la fois le rendement global en composés phénoliques et la concentration en composés spécifiques a les activités biologiques, tout en préservant leur intégrité structurale et leurs propriétés antioxydants et antiinflammatoires pour des applications thérapeutiques et cosmétiques de haute qualité et reproductibles ?

Synthèse Bibliographique

1. Historique :

Les vertus thérapeutiques du genre *Calendula* sont documentées depuis de nombreux siècles. Au XIIe siècle, Hildegarde de Bingen l'employait pour traiter la teigne du cuir chevelu, tandis qu'Albert le Grand le préconisait comme cicatrisant, pour soulager les troubles intestinaux, les piqûres d'insectes et de serpents **(Albert le Grand, 2004).** En Italie, au XVIe siècle **Pietro Andrea Mattioli en 1554**, recommandait son utilisation dans la préparation d'un collyre pour soigner les affections oculaires.

Le Souci était déjà utilisé en cuisine, en médecine et en cosmétique par les civilisations indiennes, arabes et grecques de l'antiquité. On tirait des fleurs une teinture jaune pour les textiles. Les fleurs de Souci étaient aussi employées en cuisine sous le nom Safran des pauvres, pour ajouter de la couleur et du gout à certains plats **(Arora et al, 2013).**

2. L'espèce *Calendula Arvensis :*

Le mot Calendula, provenant du latin "Kalenda", qui signifie premier jour du mois. Cela fait référence à la floraison constante de certaines espèces de calendula tous au long de l'année, c'est également lié à l'ancienne pratique de planter certaines espèces de calendula à chaque nouvelle lune **(Rignanese et al, 1763).** *Calendula arvensis*, également connu sous le nom de souci des champs ou souci du jardin, est une plante annuelle qui appartient à la famille des astéracées **(Heyn et Joel, 1983).**

Le *Calendula arvensis*, est une plante médicinale notable. Elle est abondante dans les régions printanières. On la trouve principalement en groupe dans des espaces ouverts, des terrains vagues, le long des routes, dans les cimetières et aux abords des champs **(Ivan A. Ross, 2003)**. Selon **(Keville, 1991),** les fleurs de Calendula étaient utilisées comme symbole du souvenir et on croyait qu'elles donnaient de grandes forces, de chaleur et de compassion bienveillante à l'âme humaine, aidant particulièrement à équilibrer les modes de communication actifs et réceptifs.

Figure1 : *Calendula Arvensis* (prise personnelle)

3. Classification hiérarchique :

La classification de *Calendula arvensis* est résumée dans le tableau I.

Tableau I : Classification de *Calendula arvensis*

	Appellation	Reference
Domaine	BiotaEndl	Don, 1834
Règne	Plantae	Haeckel, 1866
Sous-Règne	Viridaeplantae	/
Infra-Règne	Streptophyta	John, Williamson &Guiry, 2011
Classe	Equisetopsida	C.Agardh, 1825
Clade	Tracheophyta	Sinnott ex Cavalier-Smith, 1998
Clade	Spermatophyta	/
Sous-classe	Magnoliidae	Novák ex Takht., 1967
Super-Ordre	Asteranae	Takht., 1967
Ordre	Asterales	Link, 1829
Famille	Asteraceae	Bercht. &J.Presl, 1820
Sous-famille	Asteroideae	Lindl., 1829
Tribu	Calenduleae	Cass., 1819
Genre	*Calendula* L.	Cass., 1819
Espèce	*Calendula arvensis L.*	Cass., 1819

4. Description botanique :

C'est une plante dressée ou ascendante, herbacée annuelle atteignant 15 à 30 cm de hauteur **(Heyn and Joel, 1983)** à forte odeur, avec des rameaux étalés et pubescents qui peuvent être collants. Les feuilles sur la tige sont oblongues-lancéolées et possèdent des trichomes tinctoriaux et sécrétoires, les fleurs sont synthétisées tout au long de l'année, mais les pics de floraison se situent entre mars et juillet **(Ruiz De Clavijo, 2005 et Paolini et al, 2010).** Les fleurs, solitaires et inclinées après la floraison, forment des capitules d'environ 1 à 2 centimètres de diamètre, situés à l'extrémité des rameaux **(Figure 2).** L'involucre entourant les fleurs est composé de bractées presque identiques, oblongues-lancéolées, pointues et parfois teintées de rouge. Les akènes externes sont arqués et épineux sur le dos, tandis que les internes sont enroulés en anneau et peuvent être lisses ou épineux. *Calendula arvensis* se distingue des autres espèces de Calendula par la présence de rostrales/bialates **(Gonçalves, 2018).** Bien que la plante soit très variable, elle présente une grande diversité morphologique **(Coste 1998 et Des Abbayes et al. 1971)**. Sur la base du polymorphisme des tiges, des ailes et des akènes, plusieurs sous-espèces ont été attribuées à *Calendula arvensis* **(Paolini et al, 2010).** À savoir *Calendula arvensis var. Parvifora, Calendula arvensis subsp. Hydruntina, Calendula arvensis subsp. macroptera et Calendula arvensis subsp. Arvensis* (S. Pignati, 1982).

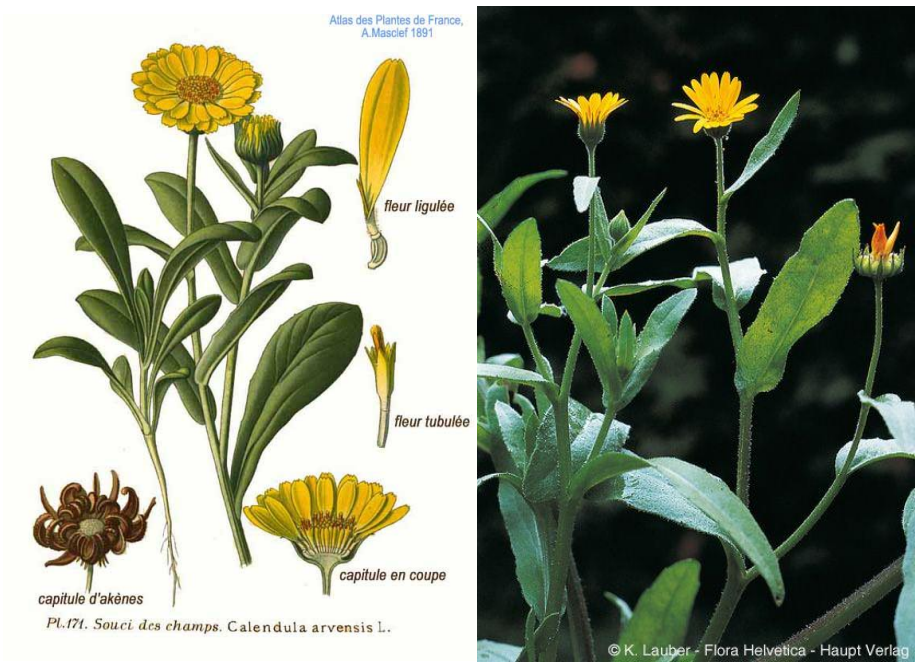


Figure 2 : Illustration de *Calendula arvensis* (Souci de champ)

5. Composition chimique de *Calendula arvensis* :

D'après les études de **Maria et al (2017)** *Calendula arvensis*, contient des glucides (30,7 %), des terpénoïdes (27,9 %) et des dérivés de l'acide carboxylique (27,4 %). L'identification et la teneur de chaque composé de *Calendula arvensis* sont présentés dans le tableau II :

Tableau II : Composition chimique des extraits d'hexane de *Calendula arvensis* **(Maria et al, 2017)**

Composition	**La teneur (mg/g de plantes sèches ± ET)**
Acides Carboxylique	
- Acide citrique	0.08 ± 0.01
- Acide quinique	0.08 ± 0.01
- Acide palmitique	0.47 ± 0.03
- Acide linoléique	0.41 ± 0.02
- α-Acide linoléique	0.78 ± 0.06
- Acide stéarique	0.08 ± 0.01
- Acide tetracosanoique	0.07 ± 0.01
Carbohydrates (Glucides)	
- Acide L-threonique	0.07 ± 0.00
- D-(−)-tagatofuranose	0.17 ± 0.02
- D-(−)-fructofuranose	0.38 ± 0.02
- D-(−)-Fructopyranose	0.15 ± 0.02
- D-(−)-Psicopyranose	0.23 ± 0.01
- D-(+)-Mannopyranose	0.25 ± 0.01
- D-(+)-Galactopyranose	0.06 ± 0.00
- β-D-Glucopyranose	0.35 ± 0.02
- Acide D-gluconique	0.06 ± 0.00
- Acide galactique	0.06 ± 0.00
- Saccharose	0.21 ± 0.01
- Cellobiose	0.21 ± 0.01
Terpénoïdes	
- Néophytadiène	0.18 ± 0.01
- Phytol	0.12 ± 0.01

- α-bisabolol	0.14 ± 0.02
- 8,14-cédranoxyde	0.70 ± 0.05
- Stigmastérol	0.15 ± 0.01
- Les stigmates-5	0.11 ± 0.00
- L'amyrine	0.10 ± 0.00
- Lup-20(29)-dans-28-AL	0.10 ± 0.00
- Acide 3-oxo-ursan-28-oïque	0.36 ± 0.01
Alcaloïdes de l'yrrolizidine	
- Isomère du composé 43 ([M]+% m/z 343)	0.57 ± 0.05
Alcools	
- myo-inositol	0.08 ± 0.00
- 1H-benzocyclohepène-9-ol	0.05 ± 0.01
- 1-Hexacosanol	0.06 ± 0.01
Alcanes	
- Untriacontane	0.14 ± 0.01
Acide Amine	
- Acide 4-aminobutanoïque	0.23 0.01

6. Domaines d'application et intérêt phytothérapie *Calendula arvensis* :

Traditionnellement, *Calendula arvensis* est utilisée comme colorant alimentaire, comme épice et pour la préparation des tisanes, ainsi que comme ingrédient dans des teintures, des pommades ou des crèmes cosmétiques. **(Abudunia.2018).**

Les espèces de Calendula sont utilisées comme remède antipyrétique et anti-inflammatoire dans la médecine populaire italienne et européenne, les espèces de Calendula sont considérées comme un tonique immunitaire qui aide à prévenir les maladies en hiver. *Calendula arvensis* est connu en turque sous le nom de « Portakalnergisi » et est utilisée à usage extérieur pour traiter les varices, l'eczéma, les champignons, les verrues et les plaies. En outre, l'huile essentielle de calendula a été signalée comme étant utilisée dans les soins aux personnes âgées **(Buckle, 2003).** *Calendula arvensis* a des activités sédatives, antibactériennes, analgésiques, lymphagogues, émollientes, cholérétiques, vulnéraires, anti-inflammatoires anodines légères, antioxydantes, antiparasitaires, antivirales et antiseptiques **(Hüseyin Servi et al, 2020).**

7. Composition phytochimique du *Calendula arvensis* :

Depuis 1971, des investigations phytochimiques menées sur le genre Calendula et qui sont effectuer sur les deux espèces *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis* plus précisément, les recherches ont conduit à la détermination des métabolites secondaires principales présenté dans ce genre **(Lehbili, 2018).** Parmi ces substances bioactives on trouve :

- **Les composés phénoliques :**
  - Les flavonoïdes.
  - Les tannins.
  - Les acides phénoliques.
- **Les terpenoides :**
  - Les huiles essentielles.
  - Les saponines.
  - Les sesquiterpènes.
  - Les caroténoïdes.
  - Les anthocyanes.

6. Les activités biologiques de *Calendula arvensis* :

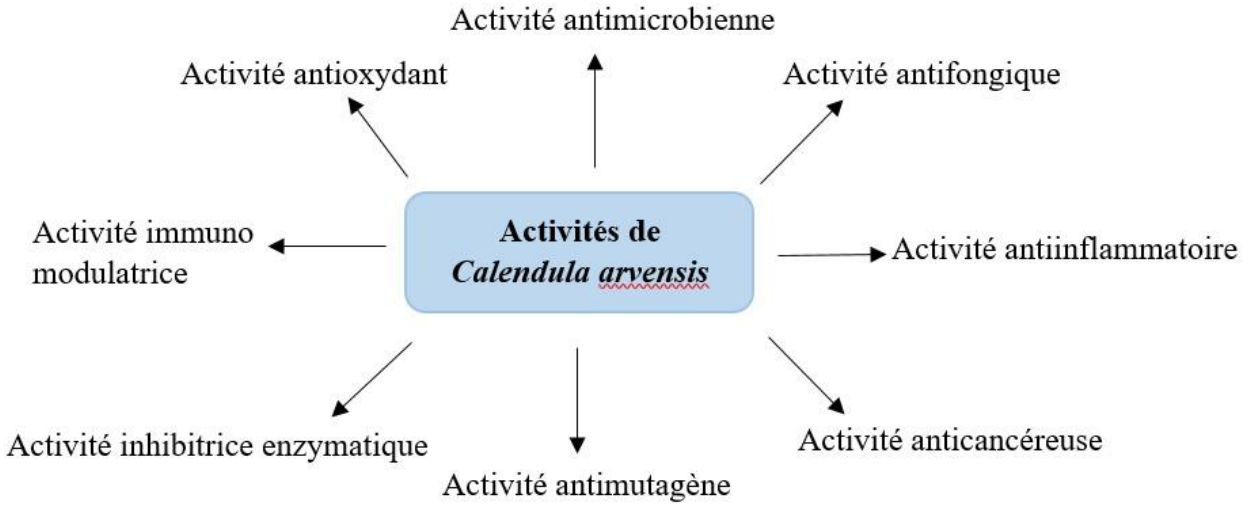


Figure 3 : Schéma présentative des différentes activités biologiques de *Calendula arvensis*.

1. Stress oxydatif :

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages qu'elles causent. L'impact des dommages dépend de la cible moléculaire, de la sévérité du stress, et du mécanisme en jeu. Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies, souvent comme facteur déclenchant ou aggravant, et particulièrement associé aux maladies liées au vieillissement, car ce dernier réduit les défenses antioxydants et augmente la production de radicaux libres par les mitochondries **(O. I. Aruoma, 1999).**

2. Les types des antioxydants :

Un antioxydant est toute molécule, endogène ou exogène, présente en faible concentration, capable de prévenir, retarder ou réduire l'ampleur des dommages oxydatifs subis par les biomolécules. Ces antioxydants peuvent avoir diverses origines : ils peuvent être produits par l'organisme, apportés par l'alimentation, ou synthétisés chimiquement **(Packer et al., 2000).**

- **Les antioxydants endogènes :**

Les antioxydants endogènes, produits par les cellules, incluent des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Les principaux antioxydants enzymatiques sont la super oxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (CAT). Ces enzymes préviennent le stress oxydatif en neutralisant les radicaux libres et les espèces réactives avant qu'ils n'endommagent les cellules. Le glutathion (GSH) est le principal antioxydant non enzymatique, capable d'agir indépendamment pour piéger les oxydants et de collaborer avec le glutathion peroxydase pour éliminer le peroxyde d'hydrogène des cellules **(S. K. Powers et M. J. Jackson, 2008).**

- **Les antioxydants exogènes :**

Les oligo-éléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi ces oligo-éléments on cite ; le zinc, le sélénium et le manganèse **(Pastre, J.O.C, 2005).**

- **Les anti-oxydants d'origine végétale :**

Les antioxydants d'origine végétale sont des composés présents dans les plantes qui protègent les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres **(Scalbert et al. 2005).**

Ils existent sous diverses formes, avec les polyphénols et les Caroténoïdes, les minéraux, les lignanes, les vitamines et les phytostérol **(Krinsky et al., 2005).**

2.1. Mécanisme d'action des antioxydants :

Les antioxydants agissent par divers mécanismes, en capturant l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition, la réduction de radicaux ou de peroxydes, et la chélation des métaux de transition **(A. Favier, 2006).** En général, un antioxydant empêche l'oxydation d'un substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement. Ce processus est souvent dû à des structures qui peuvent donner des atomes d'hydrogène ou des électrons, comme les dérivés du phénol. Les antioxydants sont des agents préventifs : ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs ou en réagissant avec l'oxygène, et ils terminent les réactions en piégeant les radicaux libres. Certains interrompent la peroxydation en réagissant rapidement avec les radicaux d'acides gras, tandis que d'autres absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la convertir en chaleur **(Z. Hellal, 2011).**

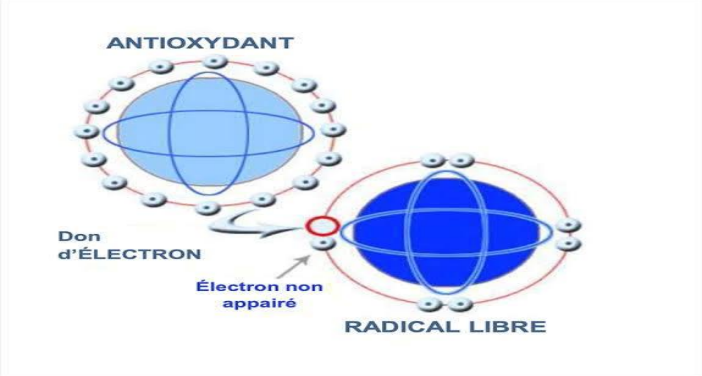


Figure 4 : Mécanisme d'action des antioxydants.

3. Inflammation :

L'inflammation est un processus physiologique qui constitue la réponse normale du corps face à une agression pathogène, qu'elle soit causée par des éléments physiques, solides, exogènes ou endogènes. De plus, l'inflammation est généralement bénéfique pour l'organisme, car elle permet la réparation des tissus endommagés **(Schwartz, 2010).**

Il y a alors deux types d'inflammation : L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, elle dure de quelques jours à quelques semaines et se divise en trois grandes phases : une phase vasculaire immédiate, une phase cellulaire consécutive et une phase de résolution et de cicatrisation **(Weill et al., 2003 ; Charles et al., 2010).** L'inflammation chronique est une inflammation prolongée, définie par la présence de cellules

immunitaires. Elle peut durer plusieurs semaines voire plusieurs années **(Iwalewa et al., 2007 ; Charles et al., 2010).**

3.1. Les antiinflammatoires :

- **Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) :**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments utilisés pour leurs propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires. Ils sont également couramment prescrits comme antalgiques, notamment lorsque la douleur est liée à une inflammation **(Burian et Geisslinger, 2005 ; Bacchi et al., 2012)**. Les AINS agissent en bloquant la dégradation de l'acide arachidonique par la cyclo-oxygénase, ce qui inhibe la production de prostaglandines et de thromboxane A2. De plus, ils réduisent la mobilité des cellules inflammatoires, comme les macrophages. Cependant, leur action est moins puissante que celle des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) **(Souaga et al., 1998).**

- **Les anti-inflammatoires stéroïdiens (A.I.S) ou corticoïdes :**

Ces stéroïdes analogues ou précurseurs de la cortisone, naturellement sécrétés par les glandes surrénales, ont tous une activité hormonale sur les régulations métaboliques glucidique, protidique et lipidique **(Muster, 2005).**

- **Les antiinflammatoires naturels :**

Face aux effets secondaires graves des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens, des recherches ont été menées pour trouver des alternatives moins nocives. Les chercheurs se sont tournés vers la médecine traditionnelle et les plantes médicinales, riches en composés phytochimiques, offrant une vaste gamme d'activités anti-inflammatoires naturelles **(Barnes, 1998).**

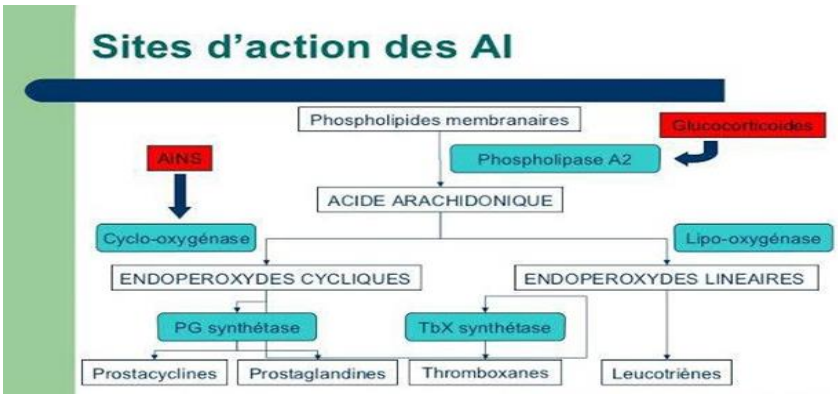


Figure 5 : Mécanisme d'action des antiinflammatoires

Matériels et Méthodes

1. Matériel végétale :

Les travaux de la présente étude ont été effectués sur les feuilles et les fleurs de *Calendula arvensis* qui ont été récoltées durant le mois de février 2024, ces échantillons proviennent du village de Sidi-Ayad wilaya de Bejaïa, Nord-Est d'Algérie.

1.1.Préparation et conservation du matériel végétal :

Les feuilles et fleurs de *calendula arvensis* ont été séparées à la main en deux groupes. Débarrassé des débris, lavé à l'eau et séché à l'étuve a 40^0C pendant 4 jours. Ensuite, broyés l'aide d'un broyeur électrique. La poudre a été tamisée pour obtenir des particules de taille homogène. La poudre obtenue est conservée dans des flacons en verre à l'abri de la lumière pour éviter toute altération de l'échantillon.

Figure 06 : Poudre des fleurs

Figure 07 : Poudre des feuilles

2. Extraction des composés phénoliques :

Nous avons utilisé pour cette étude une méthode d'extraction par Micro-onde.

2.1.Principe de la méthode d'extraction par micro-onde :

Les microondes sont des ondes électromagnétiques non ionisantes, sont capable de pénétrer dans les biomatériaux et de générer de la chaleur en interagissant avec les molécules polaires comme l'eau, l'interaction entre les microondes et les molécules polaires conduit à un sur chauffage interne et une perturbation de la structure cellulaire facilitant ainsi la diffusion des composés bioactifs à partir de la matrice végétale **(Cheok et al, 2014).**

Avantage :

- Réduction du temps d'extraction.
- Faible utilisation des solvants et la sélectivité **(Chemat, 2009).**

Inconvénient :

- Augmentation de la température ce qui induit la dégradation des composés bioactifs thermostable.

3. Filtration :

Les extraits sont filtrés en utilisant du papier Whatman à l'aide d'entonnoirs, les extraits filtrés à la fin sont conservés au réfrigérateur.

Figure 08 : filtration des extraits des fleurs

Figure 09 : filtration des extraits des feuilles

4. Etude préliminaire :

L'extraction est une étape cruciale dans la recherche et l'étude des métabolites secondaires des plantes. En général, l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques dépend de nombreux paramètres.

Avant d'entamer l'optimisation, une étude préliminaire a été menée pour sélectionner les paramètres à optimiser et déterminer les niveaux des facteurs. Cette étude a systématiquement examiné l'effet de plusieurs paramètres influents, tels que le temps, la fréquence, le ratio (le rapport solide/liquide), afin d'obtenir un rendement maximal en composés phénoliques totaux.

L'optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques est une méthode dans laquelle les paramètres initiaux sont fixés et modifiés l'un après l'autre suivant une succession bien déterminée pour qu'on puisse définir au finale les conditions optimales qui permettent d'obtenir le meilleur rendement d'extraction et d'activité antioxydant et anti-inflammatoire.

Les conditions d'extraction optimisée dans cette étude préliminaire sont présentées dans le tableau III :

Tableau III : Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire

Extrait	Ratio (%)	Volume de solvant (ml)	Masse en poudre (g)	Le temps (s)	puissance (Hz)
Fleur	5	100	5	60	300
	7,5		7,5	90	500
	10		10	120	700
Feuille	5	100	5	60	300
	7,5		7,5	90	500
	10		10	120	700

Le solvant d'extraction utilisé dans cette étude est l'eau distillée

5. Plan d'expérience :

Le plan d'expérience repose sur des méthodes mathématiques et statistiques appliquées à l'expérimentation. Il s'agit d'une série d'essais planifiés à l'avance, visant à déterminer avec une précision maximale et un nombre minimal d'essais l'influence de plusieurs paramètres sur une ou plusieurs réponses **(Ferreira et al, 2019).**

La technique des plans d'expériences répond parfaitement à nos exigences. Le principe consiste à faire varier simultanément les niveaux de plusieurs facteurs lors de chaque essai. Cela permet de réduire considérablement le nombre d'expériences nécessaires tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre ces facteurs et en identifiant les conditions optimales pour une réponse donnée **(Faucher, 2006).**

Les trois types de plans de surface de réponse couramment utilisés sont les plans de Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans composites centrés. Dans le présent travail le Box-Behnken est le plan qui a été appliqué.

5.1.Plan Box BenKen :

Le plan Box-Behnken est un type de plan de surface de réponse (MSR) utilisé pour étudier la relation entre une ou plusieurs variables de réponse et un ensemble de paramètres expérimentaux quantitatifs. Les conceptions Box-Behnken ont été appliquées à l'optimisation des processus en technologie alimentaire, aux études microbiologiques et au développement de formulations pharmaceutiques **(Ragonese et al, 2002).**

5.2.Application de plan d'expérience :

L'optimisation des conditions d'extraction a été réalisée en employant le plan de Box-Behnken à trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de trois variables indépendantes : le ratio, le temps et la fréquence d'extraction désignés par X1, X2, X3 respectivement.

L'étude préliminaire préalablement effectuée, a permis de déterminer les niveaux bas et haut pour les variables influençant l'expérimentation. Ces derniers sont illustrés dans le tableau IV :

Tableau IV : Les niveaux des facteurs choisis pour la construction du plan d'expérience

Variables indépendantes	Niveau des facteurs		
	-1	0	1
X1 : Ratio (%)	5	7,5	10
X2 : Temps (s)	60	90	120
X3 : Fréquence (w)	300	500	700

6. Dosage de composés phénoliques totaux :

a. Principe :

La teneur en polyphénols totaux des extraits de *Calendula arvensis* a été déterminé en utilisant le réactif de folin Ciocalteau. Le réactif folin est un acide jaune composé d'un mélange d'acide phosphotungstique $\mathbf{H_3PW_{12}O_{40}}$ et d'acide phosphonolybdique $\mathbf{H_3PM_{12}O_{40}}$, lors de l'oxydation des substances phénoliques, le réactif est réduit en mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène, la coloration obtenue après la réaction est proportionnelle à la concentration des polyphénols présent dans **(Bessals 2008).**

b. Mode opératoire :

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée suivant la méthode de **(Škerget et al, 2005)**. Un volume de 200µl de chaque extrait a été mélangé avec 1 ml du réactif folin ciocalteu (1N), après 5 min d'incubation à température ambiante, 800ul de carbonate de sodium $NaCO_3$ (7,5%) ont été additionnée au mélange suivi d'une simple agitation du mélange réactionnelle, et d'une incubation au bain marie à 50°C pendant 5 à 15 min. l'absorbance a été mesurée à 760 nm.

Les concentrations en phénols totaux solubles sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique **(figure1, annexe II).** Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'Acide Gallique/100g d'échantillon.

7. Dosage des flavonoïdes :

a. Principe :

Le dosage des flavonoïdes repose sur la formation d'un complexe jaune par chélation de l'ion Al^{3+} lors de la réaction du chlorure d'aluminium (AlCl3) avec les flavonoïdes ayant un groupement hydroxyle (OH) libre. L'intensité de la coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait **(Ribéreau-Gayon, 1968).**

b. Mode opératoire :

Pour estimer la teneur en flavonoïdes on a suivi la méthode décrite par **(Ribéreau-Gayon, 1968),** 1ml de chaque extrait (fleur ou feuille) est mélangé avec 1ml de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ a 2%. Après homogénéisation, le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10min, puis les absorbances sont lues à 430nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercitrine par g d'échantillon (mg EQ /100g d'E), en se référant à une courbe d'étalonnage **(figure2, annexe II).**

8. Dosage des flavonols :

La teneur en flavonols a été quantifiée selon la méthode décrite par **Kumaran et Karunakaran (2007)**. Un volume de 0,5ml du chlorure d'aluminium (2%) et de 1,5 ml d'acétate de sodium est ajouté à 0,5 ml d'extrait. Ensuite une incubation pendant 30 min à température ambiante, l'absorbance est lue à 440 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g de matière sèche (mg Eq Q/g MS), en se référant à une courbe d'étalonnage réalisé en utilisant la quercétine à différentes concentrations **(figure 4, annexe II).**

9. Dosage des tanins condensés :

a. Principe :

Les concentrations des tanins condensés des fleurs et feuilles de *calendula arvensis* sont évaluées à l'aide du dosage à la vanilline. En milieu acide, les tanins condensés se dépolymérisent et, en réagissant avec la vanilline, se transforment en anthocyanidols de couleur rouge, qui peuvent être mesurés par spectrophotométrie à 500 nm **(Sun et al., 1998)**

b. Mode opératoire :

La teneur en tanins condensés a été quantifiée selon la méthode de **Sun et al., 1998**. 250µL de chaque extrait a été mélangé avec 1500µL de la solution vanilline. Les tubes sont agités, ensuite 750µL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné au mélange réactionnel. Le mélange est laissé réagir à température ambiante pendant 15 min. La lecture des absorbances est réalisée à 550 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à différentes concentrations **(figure 5, annexe II)**. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par grammes d'échantillons (mg Eq C/g E).

10. Activités antioxydants :

10.1. Activité anti radicalaire acide 2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique (ABTS) :

a. Principe :

Le test TEAC ou test de décoloration de ABTS est basé sur la capacité d'un antioxydant a stabiliser le radical cationique ABTS (sel d'ammonium d'acide 2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique) de couleur bleu vert en le transformant en ABTS+ incolore, par piégeage d'un proton de l'antioxydant **(Re, R et al, 1999).** Le radical ABTS+ se forme par arrachement d'un électron a un atome d'azote d'ABTS.

b. Mode opératoire :

Le test ABTS est effectué selon la méthode décrite par **(Memarpoor-Yazdi et al, 2012)**. La solution d'ABTS à 7 mM a été obtenue en dissolvant 38,4 mg d'ABTS, 6,62 mg de persulfate de potassium dans 10 ml d'eau distillée. Le mélange a ensuite été agité pendant 5 minutes et incubé pendant une nuit à température ambiante et à l'abri de la lumière. Pour obtenir une densité optique de 0,7±0,02 à 734 nm, la solution a été diluée avec de l'éthanol.150ul d'extrait (feuilles ou fleurs) est additionné avec 1500ul de solution ABTS. Plus un contrôle où on remplace l'extrait par un volume de 150ul de solvant d'extraction, suivi d'une incubation 6 min à température ambiante, enfin on a mesuré les absorbances à 734 nm.

Les résultats sont exprimés de deux manières :

1) Les résultats sont exprimés en mg équivalent trolox par gamme d'échantillon (mg Eq T/g E) par référence à une courbe d'étalonnage **(figure 3, annexe II).** (Pour les résultats de l'étude préliminaire utilisé pour avoir les optimums).

2) Le pouvoir anti radicalaire des extraits a été exprimé en pourcentage (%) d'inhibition du radical ABTS+ par la formule suivante :

$$\%D'inhibition\ de\ radical\ ABTS = [(At–Ae)\ /At] \times 100$$

- At : absorbance du témoin.
- Ae : absorbance de l'extrait

Les résultats seront interprétés par comparaison à l'activité anti-radicale ABTS de deux standards, le BHT et Acide ascorbique, dans les mêmes conditions. Les valeurs des CI_{50} des deux extraits ainsi des deux molécules de référence étudiées ont été déterminé.

10.2. Activité anti radicalaire 2,2-diphényl-1-picryhydrazyl (DPPH) :

a. Principe :

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picryhydrazyl) est un radical libre de couleur violet, lorsque le DPPH est réduit en diphényl-1-picryhydrazyl par un composé anti radicalaire la couleur violette disparait entrainant une décoloration, l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présent dans le milieu à céder des protons **(Talbi et al, 2015)**.

b. Mode opératoire :

Ce test est réalisé selon le protocole rapporté par **Milardovic et al. (2006)**, un volume de 1900ul de solution DPPH préalablement préparé, dilué dans le méthanol est additionné a 100ul d'extrait à différentes concentrations, les mélanges réactionnels sont incubés 15 min à température ambiante, les absorbances sont mesurées a 515nm. Les résultats seront interprétés par comparaison à l'activité anti-radicalaire des standards, acide ascorbique et BHT réalisées dans les mêmes conditions. La valeur d'IC50 a été déterminée et le pourcentage d'activité antiradicalaire DPPH a été calculé selon l'équation suivante :

$$\%\ d'inhibition\ DPPH = [(A_c - A_e) / A_c] \times 100$$

- Ac = absorbance du contrôle

- Ae = absorbance de l'extrait.

10.3. Activité anti-radicalaire du OH :

a. Principe :

Le pouvoir scavanger du radical hydroxyle repose sur la capacité d'une molécule à neutraliser ce radical OH libre (exemple les composes phénolique) en lui fournissant un électron supplémentaire ce qui réduit sa réactivité et protégé les cellules contre les dommages oxydatifs ce qui veut dire que ce test implique un système redox, réaction d'oxydoréduction entre le OH qui est une substance oxydante et un antioxydant qui sont les CPT **(Rajamanikandan et al. 2011).**

Le principe de ce test repose sur :

- ✓ **Formation des radicaux hydroxyles** : les radicaux hydroxyles OH sont générés par la réaction entre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les ions ferreux (Fe^{2+}).

$$FeSO_4 + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^-$$

- ✓ **Hydroxylation du Salicylate** : le salicylate est utilisé comme sonde pour détecter les radicaux hydroxyles, les radicaux hydroxyles attaquent le salicylate et provoque son hydroxylation.

b. Mode opératoire :

L'activité anti radicalaire OH par l'extrait phénolique des fleurs et feuilles de *calendula arvensis* a été évaluer selon la méthode de **Rajamanikandan et al. (2011)**, pour cela un mélange contenant 0,5ml de $FeSO_4$ (1,5mM) et 0,35ml de H_2O_2 (6mM) et 0,5ml de salicylate de sodium (20mM) a été préparé, auquel 0,5ml de chaque extrait à différentes concentrations a été additionné. Après agitation au vortex les échantillons ont été incubé pendant 1h au bain marie a 37°C. Les absorbances ont été mesurés à 562nm. Les résultats seront interprétés par comparaison à l'activité anti-radicalaire des standards, Vit C et BHT réalisées dans les mêmes conditions. La valeur d'IC50 a été déterminée et le pourcentage d'inhibition d'oxydation des radicaux OH indiquant l'activité scavanger des extraits, a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition OH} = (At - Ae) / At \times 100$$

At : absorbance de témoin

Ae : absorbance de l'extrait (Abs (extrait)- Abs (blanc échantillon)

11. Activités anti-inflammatoires :

11.1. Mesure de l'activité anti-dénaturation de la BSA (sérum-albumine bovin) :

a. Principe :

L'activité anti inflammatoire a été évalué par un test de dénaturation des protéines, un phénomène qui peut provoquer une réaction inflammatoire, ce test consiste à mesurer la capacité d'un extrait à inhiber cette dénaturation en stabilisant la structure native des protéines et les protéger de la dénaturation. La méthode suivie est celle décrite par **(Kaw et al, 2012).**

b. Mode opératoire :

Un volume de 500ul de BSA à 0,5% est additionné à un volume de 500ul de chaque concentration des deux extraits étudiés. Les mélanges ont été incubé dans un bain marie a 37°C pendant 20 min, ont été mise à 70°C pendant 5 min (choque thermique), après refroidissement un volume de 500ul de la solution tampon Tris-Hcl a ph=6,6 a été ajoute. Les absorbances ont été mesurés à 660nm. Le diclofenac a été utilisé comme une molécule de référence et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique a été calculé comme suite :

$$\% \text{ d'inhibition} = ((At-Ae)/At) * 100$$

At : absorbance de témoin négative

Ae : absorbance extrait (abs d'extrait – abs de blanc échantillon)

Les valeurs de concentration inhibitrice à 50% (IC_{50}) des deux extraits et du diclofenac ont été évaluées.

11.2. Test ovalbumine :

a. Principe :

La plupart des protéines perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. Sous l'action d'un traitement thermique, l'ovalbumine peut subir des changements de conformation associés à un mauvais repliement de la structure tridimensionnelle. La dénaturation des protéines est l'une des causes bien documentées de l'inflammation et conduit à diverses maladies inflammatoires. Par conséquent, la capacité d'une substance à inhiber la

dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti-inflammatoire **(Militello et al, 2003).**

b. Protocole :

L'activité anti-inflammatoire est effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation de la protéine albumine décrite par **Kandikattu et al. (2013).** Un volume de 0,5 ml de chaque concentration est additionné à 0,5 ml de solution de BSA préparée dans le Tris-HCl. Après incubation à 37° C pendant 20 min puis à 70° pendant 5 min et après refroidissement un volume de 0,5ml de solution tampon Tris-HCl a été ajouté au mélange réactionnel. L'absorbance est lue à 660 nm. Le contrôle contient 1ml de BSA avec 1ml de Tris-HCl. Dans ce test, la molécule de référence utilisée est le celebrex. L'évaluation de son activité anti-inflammatoire a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires que celles appliquées aux différents extraits.

Les résultats enregistrés sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la dénaturation thermique d'ovalbumine (Ova) et calculés selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de dénaturation d'ovalbumine} = [(Ae - Ac) / Ac] \times 100$$

Ae : l'absorbance de l'échantillon.

Ac : l'absorbance du contrôle**.**

Les valeurs de concentration inhibitrice à 50% (IC_{50}) des deux extraits et du Celebrex ont été évaluées.

12. Traitement statistique des résultats :

Toutes les données obtenues représentent la moyenne de trois essais. Les paramètres de la statistique descriptive (moyenne et écart-type) ont été calculés à l'aide du programme Excel Microsoft Office 2016. Les résultats ont fait l'objet d'une analyse de la variance à un seul facteur, suivie d'une comparaison multiple des moyennes (Test LSD) au moyen du logiciel Statistica version 7.12. Les différences sont significatives à $p < 0,05$. Les concentrations inhibitrices à 50% (IC50) ont été calculées en utilisant Excel.

Résultats et discussion

La présente étude est consacrée à l'optimisation des conditions d'extraction des composes phénoliques à partir de feuilles et fleurs de *Calendula arvensis*, avec l'extraction assistée par microonde et par la méthodologie de surface de réponse.

1. Extraction assiste par microondes :

Les résultats de la détermination des teneurs en composés phénoliques et de l'activité ABTS sont présenté dans le tableau V et VI :

Tableau V : valeurs expérimentales et prédite des TPC et de l'activité ABTS des feuilles de *Calendula arvensis* du plan Box Bhenken

Configuration	Ratio (%) X1	Temps (s) X2	Fréquence (w) X3	Valeurs réelles TPC(mgEAG /g E)	Valeurs réelles ABTS (mgET /g E)	Valeurs prédites TPC (mgEGA /g E)	Valeurs prédites ABTS (mgET /g E)
−−0	5	60	500	15,15305671	542,18107	15,230590049	539,46159126
−+0	5	120	500	15,07397067	653,7037037	14,814899501	624,66392319
+−0	10	60	500	10,5400982	251,2962963	10,799169369	285,27434841
++0	10	120	500	14,70156638	421,2962963	14,667038391	424,01577504
0−−	7,5	60	300	11,39050416	272,345679	11,023194059	271,9084362
0−+	7,5	60	700	10,05787148	272,345679	10,111557713	243,08813443
0+−	7,5	120	300	14,79798466	473,7860082	14,744298428	492,00102878
0++	7,5	120	700	9,40637977	246,5020576	9,842631817	246,9393004
−0−	5	90	300	15,14457174	561,9341564	15,457329142	565,09087794
+0−	10	90	300	10,74708771	204,6296296	11,186846812	209,85425239
−0+	5	90	700	11,17807516	269,2592593	10,569836228	300,33093281
+0+	10	90	700	10,57379417	203,8888889	10,261036768	200,73216736
000	7,5	90	500	15,73505343	489,3004115	15,58101473	494,23868313
000	7,5	90	500	15,48474054	495,8847737	15,58101473	494,23868313
000	7,5	90	500	15,52325022	497,5308642	15,58101473	494,23868313

Tableau VI : valeurs expérimentales et prédite des TCP et de l'activité ABTS des fleurs de *Calendula arvensis* du plan Box Bhenken

Configuration	Ratio (%)	Temps (s)	Fréquence (w)	Valeurs réelles TPC(mgEAG /g MS)	Valeurs réelles ABTS (mgET /gMS)	Valeurs prédites TPC (mgEGA /gMS)	Valeurs prédites ABTS (mgET /gMS)
	X1	X2	X3				
−−0	5	60	500	44,58650236	886,8312757	44,352636309	903,10013714
−+0	5	120	500	47,60951189	825,1028807	48,534145246	868,17558301
+−0	10	60	500	16,92115144	666,8312757	15,996518084	623,75857339
++0	10	120	500	16,13170309	674,0740741	16,365569141	657,80521266
0−−	7,5	60	300	9,416899329	327,7914952	10,105660922	368,50823045
0−+	7,5	60	700	8,967619781	246,5843621	9,4373575958	232,67146773
0+−	7,5	120	300	11,26536376	259,5336077	10,795625945	273,44650207
0++	7,5	120	700	13,98671416	367,5720165	13,297952567	326,85528125
−0−	5	90	300	43,20015404	807,81893	42,745258499	750,83333331
+0−	10	90	300	13,91739675	489,2592593	14,153268514	491,61522636
−0+	5	90	700	45,56849909	697,6131687	45,332627327	695,25720164
+0+	10	90	700	12,94502744	407,7777778	13,399922982	464,76337449
000	7,5	90	500	11,32954655	307,1604938	10,045890697	299,478738
000	7,5	90	500	9,635120824	278,1893004	10,045890697	299,478738
000	7,5	90	500	9,173004717	313,0864198	10,045890697	299,478738

L'analyse des résultats obtenues, révèle que les teneurs en composés phénoliques et les résultats de l'activité ABTS, ont présentés des différences selon les paramètres d'extraction testés. Les teneurs en composés phénoliques obtenues varient de 9,4 mgEAG/g MS jusqu'à 15,73 mgEAG/g MS pour les feuilles, et pour les fleurs varient entre 8,96 mgEAG/g MS et 47,60 mgEAG/g MS. Concernant l'ABTS les valeurs obtenues pour les feuilles sont comprises entre 203,88 mg Eq Trolox/g E et 653,70 mg Eq Trolox/g E et pour les fleurs sont entre 256,58 mg Eq Trolox/g E et 886,83 mg Eq Trolox/g E.

2. Evaluation de la corrélation :

Le R^2 est un indicateur statistique qui évalue la qualité de l'ajustement d'un modèle de régression. Dans la méthode Box-Behnken, il permet d'estimer la pertinence de l'ajustement du modèle de réponse par rapport aux données expérimentales. Cet indice mesure la proportion de la variation des données expliquée par le modèle de réponse. Plus la valeur de R^2 est proche de

1, plus le modèle empirique offre une explication solide des données **(Goupy, 2013 ; Jumbri et al., 2015).** Le modèle présenté dans notre étude est hautement corrélé pour les deux extraits (feuilles et fleurs) avec un R^2=0,999 R^2=1,00 respectivement.

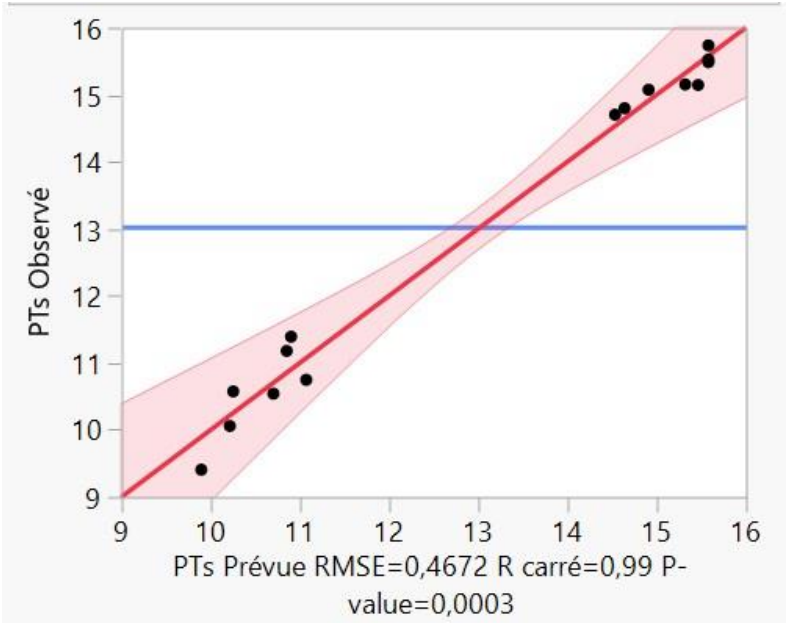


Figure 10 : Plans de prédiction pour l'extraction des polyphénols de feuille du *Calendula arvensis*

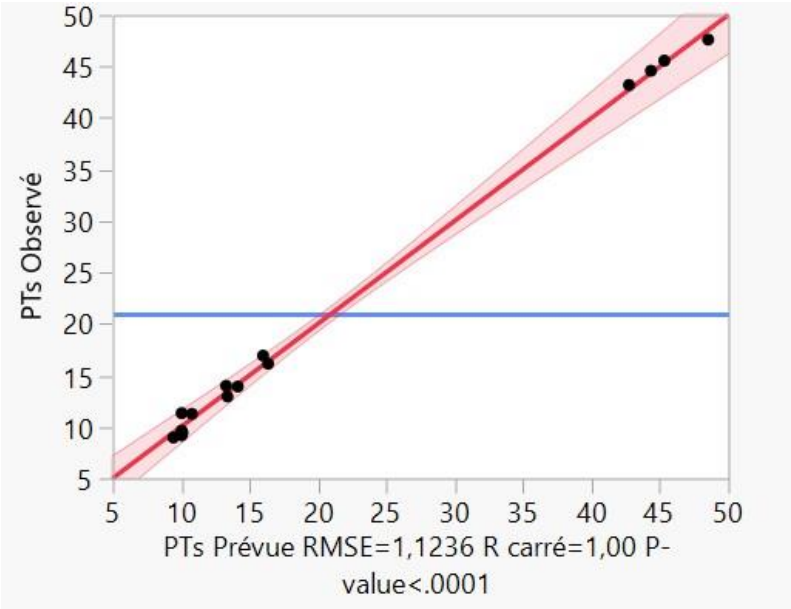


Figure 11 : Plans de prédiction pour l'extraction des polyphénols de fleur du *Calendula arvensis*

Le modèle est satisfaisant grâce à la forte significativité de l'analyse statistique ANOVA qui a donné un P = 0,0003 pour les feuilles et P<0,001 pour les fleurs.

3. Estimation des coefficients :

Les valeurs P ont été utilisées comme mesure pour vérifier la signification de chaque coefficient. Lorsque P est faible le coefficient correspondant est plus significatif et l'effet d'interaction est grand **(Bey et al., 2013).**

Les tableaux ci-dessous récapitulent les coefficients de régression du model de prédiction des extraits de *Calendula arvensis*.

Tableau VII : Les principaux coefficients de régression appliqués dans l'analyse statistique du modèle Box-Behnken pour les feuilles de *Calendula arvensis*

Terme	**Estimation**	**Erreur standard**	**T ratio**	**Prob. > /t/**
Constante	15,581015	0,269716	57,77	<0,001*
Linéarité				
X1 : Ratio	-1,248391	0,165167	-7,56	0,0006*
X2 : temps	0,8547964	0,165167	5,18	0,0035*
X3 : fréquence	-1,358003	0,165167	-8,22	0,0004*
Interaction				
X1*X2	1,0601386	0,233581	4,54	0,0062*
X1*X3	0,9483008	0,233581	4,06	0,0097*
X2*X3	-1,014743	0,233581	-4,34	0,0074*
Quadratique				
X1*X1	-0,608072	0,243119	-2,5	0,0544
X2*X2	-1,105769	0,243119	-4,55	0,0061*
X3*X3	-3,06206	0,243119	-12,59	<0,0001*

Tableau VIII : Les principaux coefficients de régression appliqués dans l'analyse statistique du modèle Box-Behnken pour les fleurs du *Calendula arvensis*

Terme	**Estimation**	**Erreur standard**	**T ratio**	**Prob. > /t/**
Constante	10,045891	0,648739	15,49	<0,0001*
Linéarité				
X1 : Ratio	-15,13117	0,39727	15,49	<0,0001*
X2 : temps	1,13764	0,39727	2,86	0,0353*
X3 : fréquence	0,4585058	0,39727	1,15	0,3006
Interaction				
X1*X2	-0,953114	0,561825	-1,7	0,1506
X1*X3	-0,835179	0,561825	-1,49	0,1973
X2*X3	0,7926575	0,561825	1,41	0,2174
Quadratique				
X1*X1	19,632473	0,584766	33,57	<0,0001*
X2*X2	1,6338532	0,584766	2,79	0,0383*
X3*X3	-0,77095	0,584766	-1,32	0,2447

3.1.Effet linéarité :

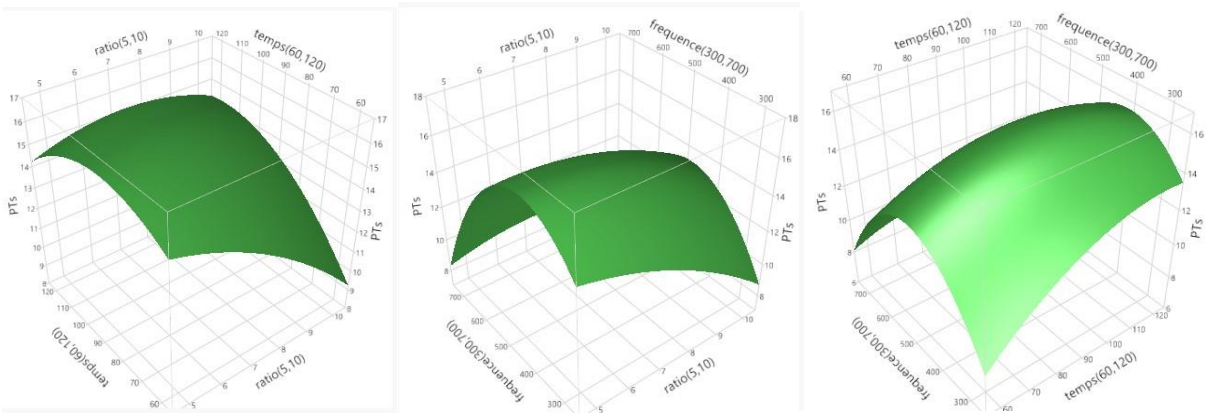
Les données présentées dans les tableaux VII et VIII mettent en évidence que pour les feuilles les trois facteurs (ration, temps et puissance) sont important dans l'extraction des polyphénols de *Calendula arvensis* avec un impact significatif et des probabilités de 0,0006 ; 0,0035 ; 0,0004, tandis que pour les fleurs le ratio (X1) et le temps (X2) sont des facteurs majeurs dans l'extraction des polyphénols, par contre le troisième facteur qui est la puissance ne semble pas avoir d'effet significatif sur cette extraction.

3.2.Effet d'interaction :

D'après l'analyse des résultats, il ressort que les interactions entre les trois facteurs X1*X2, X1*X3 et X2*X3 des feuilles influencent significativement sur les teneurs en polyphénols, avec

des probabilités de 0,0062 ; 0,0097 et 0,0074 respectivement. Tandis que pour les fleurs les interactions entre les 3 facteurs ne sont pas statistiquement significatives.

A B C



D E F

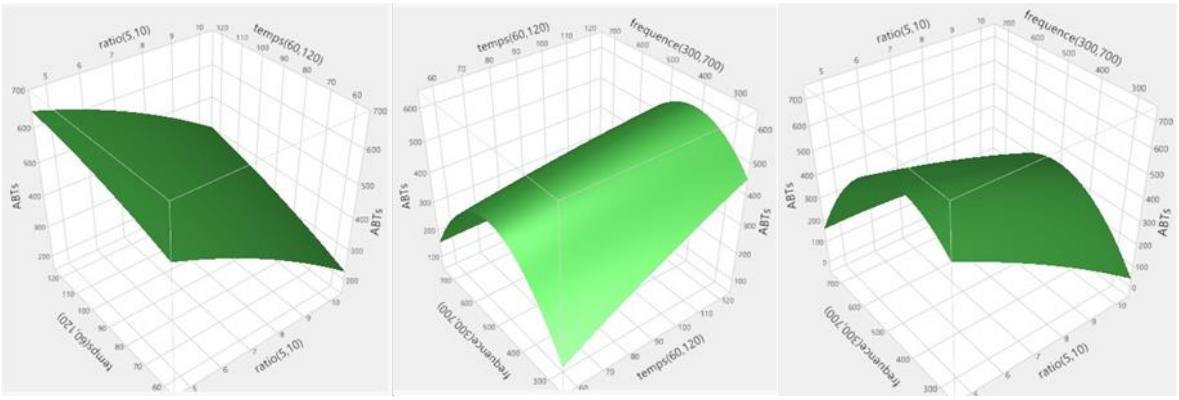
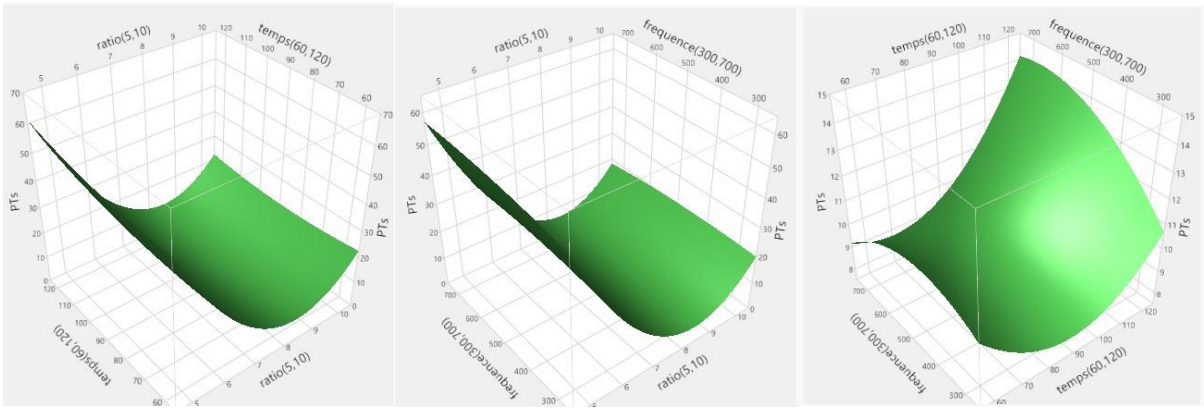


Figure 12 : Graphiques de surface de réponse présentant les interactions entre les facteurs étudiés A, B et C et sur l'activité ABTS D, E et F pour les feuille de *Calendula arvensis*

A' B' C'



D’ E’ F’

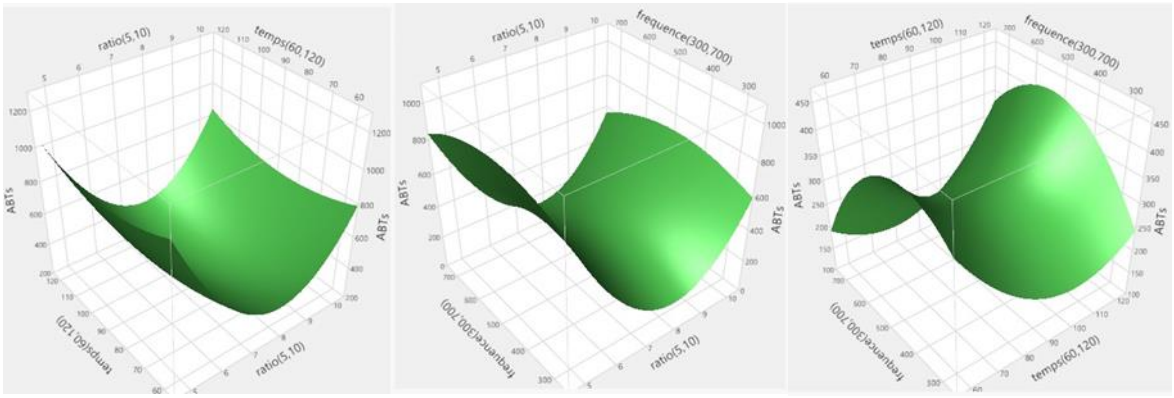


Figure 13 : Graphiques de surface de réponse présentant les interactions entre les facteurs étudiés A’ B’ et C’ et l’activité ABTS D’ E’ et F’ pour les fleurs de *Calendula arvensis*

Les figures 15 et 16 illustrent la représentation en trois dimensions des effets de la concentration du solvant et du temps sur l’extraction des PTC et l’ABTS des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis*.

3.3.Effet quadratique :

Les résultats obtenus pour les feuilles révèlent que l’effet quadratique (temps*temps) et (fréquence*fréquence) sont hautement significative avec un P=0,0061 et P<0,0001 respectivement. D’autre part les fleurs affichent que les effets quadratiques (Ratio*Ratio) et (Temps*Temps) sont significative avec des P<0,0001 et p=0,0383 contrairement à l’effet quadratique (Fréquence*Fréquence) qui ne présente pas de différence significative.

4. Conditions optimales :

Les conditions optimales de l’extraction des polyphénols par microondes, ont été obtenues en utilisant la méthodologie de surface de réponse. Figure 19 et 20 montrent les profileurs de prédiction pour les conditions optimales obtenues par le modèles Box Bhenken.

Après avoir défini les conditions optimales et prédit de la réponse correspondante, une nouvelle série d'expériences a été planifiée et réalisée en utilisant ces conditions optimales des paramètres de processus. L'objectif était de prédire et de vérifier la précision du modèle. Les résultats, présentés dans le tableau IX, montrent une forte corrélation entre les résultats réels (expérimentaux) et les résultats prédits, ce qui confirme l'efficacité des modèles de surface de réponse pour refléter l'optimisation attendue.

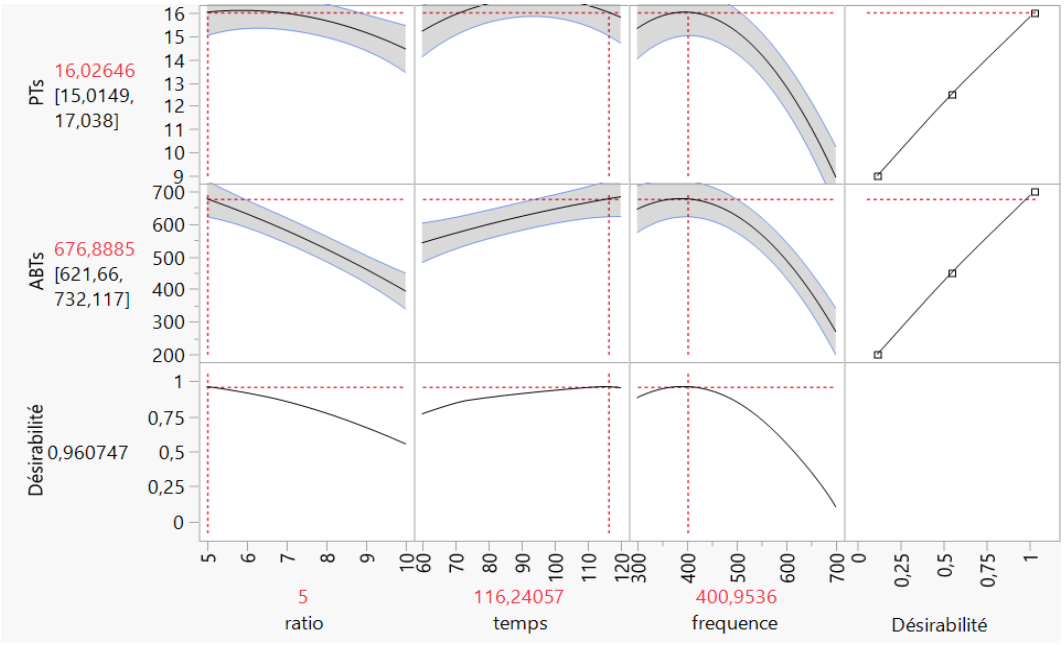


Figure 14 : Profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues des feuilles du *Calendula arvensis*

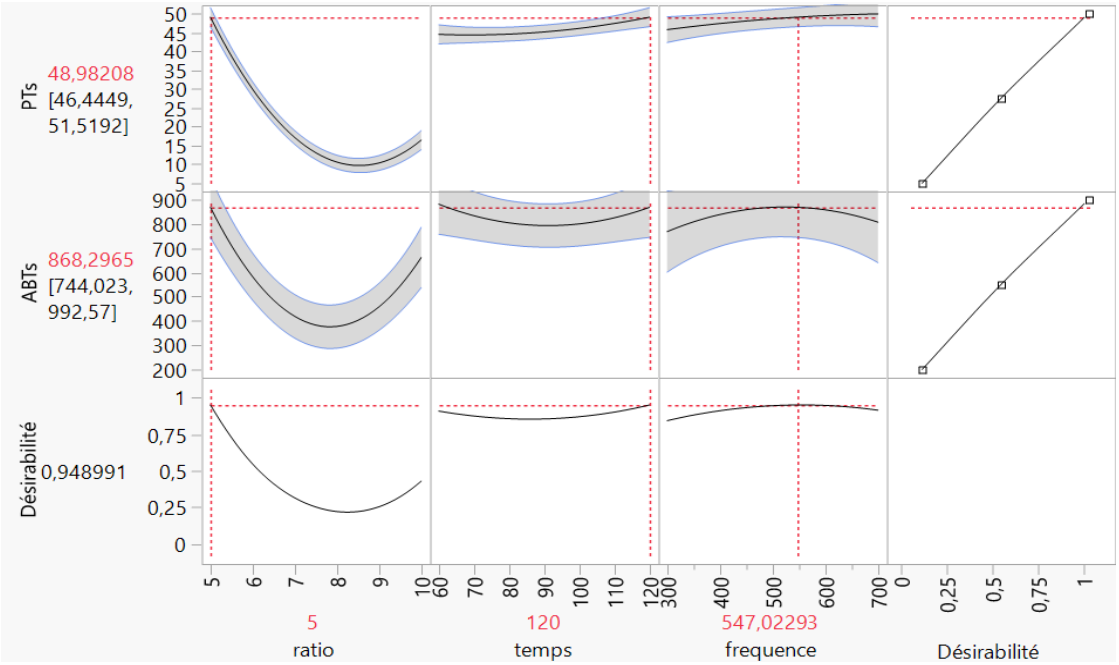


Figure 15 : Profileur de prédiction pour les conditions optimales obtenues des fleurs du *Calendula arvensis*

Les paramètres d'extraction optimisés et les valeurs prévues et expérimentales des composés phénoliques et de l'activité anti-radicalaire ABTS sont présentés dans Le tableau X :

Tableau IX : Valeurs prévues et expérimentales des teneurs en composés phénoliques et de l'activité ABTS obtenus pour les feuilles et fleurs de *Calendula arvensis*.

Echantillons	Paramètres optimisés		Réponses			
	Facteurs	Conditions optimales	Valeurs prédites		Valeurs expérimentales	
			PTS (mg E AG/g E)	ABTS (mg E T/g E)	PTS (mg E AG/g E)	ABTS (mg E T/g E)
Feuilles	Ratio (%)	5	16,02646	676,8885	19,030	449,57
	Temps (S)	116,24				
	Puissance (Hz)	400,95				
Fleurs	Ratio (%)	5	48,98208	868,2956	46,878	826,78
	Temps (s)	120				
	Puissance (Hz)	547,02				

Les résultats obtenus ont permis d'optimiser les conditions d'extraction pour maximiser les composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire ABTS en maximisant la désirabilité des valeurs prévues. Pour vérifier l'efficacité du modèle, trois expériences de validation ont été réalisées en utilisant les conditions optimales déterminées.

Les valeurs optimales en composés phénoliques, et l'activité ABTS sont obtenues sous les conditions suivantes : un ratio de 5%, une durée d'extraction de 116,24s et une puissance de 400,95 Hz pour les feuilles, pour les fleurs, elles sont d'un ratio de 5%, une durée de 120s et une fréquence de 547,02w. le tableau ci-dessus montre que les valeurs expérimentales obtenues après l'optimisation sont très proches des valeurs prévues, que ça soit pour les phénols totaux solubles ou bien pour l'activité anti oxydante (ABTS). Ce qui confirme la validité du plan d'expérience utilisé.

5. Teneur de quelques composés phénoliques des extraits obtenus après optimisation :

Dans le but d'évaluer les teneurs en substance bioactives des extraits préparés à partir des feuilles et de fleurs de *Calendula arvensis*, un dosage des différents composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes, flavonols, Tanin condensés) a été effectué.

Les résultats des teneurs des différentes classes de composés phénoliques déterminées sont présentés dans le tableau X :

Tableau X : les teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles et fleur de *Calendula arvensis*

Composés / Extrait	Composés phénolique totaux	Flavonoïdes	Flavonols	Tanin condensés
Feuille	19,030 ± 0,278[a]	46,408 ± 0,424[a]	3,602 ± 0,080[a]	7,327 ± 0,391[b]
Fleur	46,878 ± 0,233[b]	104,772 ± 1,514[b]	6,687 ± 0,206[b]	1,714 ± 0,108[a]

Les moyennes avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes ($p < 0,05$).

5.1.Les teneurs en composés phénoliques totaux :

Les résultats statistiques des teneurs en composés phénoliques **(figure1, Annexe III)** montrent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les deux extraits des échantillons étudiés. Les feuilles ont montré une teneur plus faible de19,030 ± 0,278 mg EQ d'Acide Gallique/100g d'échantillon, par rapport à la teneur enregistré sur l'extrait de fleur qui est de 46,878 ± 0,233 mg EQ d'Acide Gallique/100g d'échantillon.

Les teneurs en composés phénoliques des feuilles et des fleurs dans notre étude sont légèrement inférieures à celles rapportées par **Tugba Ercetin et al. (2012)** (118,18 ± 10,29 mg EQ d'Acide Gallique/100g d'échantillon) ou ils ont évalué la teneur en composés phénolique des extraits de fleurs et de feuilles obtenue après 48h de macération simple (agitation manuelle) à température ambiante dans de l'eau distillé. Cette différence pourrait être due à plusieurs facteurs, notamment les conditions de culture, les techniques de récolte, et les méthodes d'extraction utilisées. Les conditions environnementales telles que le type de sol, la disponibilité en eau, et l'exposition au soleil, peuvent également influencer la concentration en composés phénoliques dans les échantillons **(Cheynier, v. 2012).**

D'autre part, dans la même étude, les teneurs trouvés dans notre étude sont similaires, ou ils ont utilisé l'hexane et le dichlorométhane comme solvant d'extraction (entre 40 et 45 mg EQ d'Acide Gallique/100g d'échantillon). En effet les travaux menés par **(Bourgou et al, 2016)** montrant que l'eau est le solvant qui permet d'extraire une teneur élevée en polyphénols grâce à sa polarité élevée et sa capacité à ne pas endommager les produits d'extraction.

5.2.Teneurs en flavonoïdes :

Notre analyse statistique sur les dosages des flavonoïdes **(figure 2, Annexe III)** indique que la teneur en flavonoïdes est significativement différente ($p<0,05$) entre les feuilles et fleurs du *Calendula arvensis*. La teneur en flavonoïdes dans les fleurs (104,772 ± 1,514 mg EQ de

quercitrine/100g d'E) est beaucoup plus élevée que dans les feuilles (46,408 ± 0,424 mg EQ de quercitrine/100g d'E) avec une différence d'environ 58,37 unités, cette différence est due à plusieurs facteurs.

La différence significative des teneurs e flavonoïde entre les extraits aqueux de feuilles et fleurs, peut être lie à leur rôle biologique dans les fleurs, en tant qu'organe reproducteur, il pourrait nécessiter une concentration plus élevée de ces composés pour se protéger contre les UV et les pathogènes **(Harborne, J. B., & Williams, C. A. 2000),** d'autre part ces déférences statistiquement significative suggère que les fleurs de *Calendula arvensis* pourrait être plus riche en composes phénoliques bénéfique pour la sante que les feuilles. En comparant nos résultats à une étude sur *Calendula oficinalis*, leur extrait méthanoïque obtenue par macération ont donné des valeurs inferieurs à nos résultats, la teneur en flavonoïdes des feuilles est marquée de 28,33±0,14 mg EQ rutin/g d'extrait, et la teneur des flavonoïdes pour les fleurs est de 28,38±0,40 mg EQ rutin/g d'extrait **(Gunes AK et al, 2020)**. Dans la même étude des extraits méthanoïque obtenue par une méthode d'extraction différente qu'est le soxhlet, les teneurs sont données comme suite : teneur en flavonoïdes des feuilles est de 34,61±0,29 mg EQ rutin/g d'extrait et la teneur des fleurs est de 32,50±0,67 mg EQ rutin/g d'extrait **(Gunes AK et al, 2020),** ces résultats sont largement faibles comparé à nos résultats, ce qui prouve que la méthode d'extraction a un impact direct sur les teneurs obtenu des flavonoïdes ainsi que le solvant d'extraction qui influence aussi.

Ercetin et ces collaborateurs (2008) ont trouvé une teneur en flavonoïdes égale à 74,14±3,09 mg EQ de quercitrine/g d'E, à partir des extraits méthanoïques des fleurs de *Calendula arvensis* collectées a Bodrum a Meugla **(Ercetin et al, 2008)**, cette valeur est inferieur a la valeur trouvée dans notre étude (104,77±1,514 mg EQ de quercitrine/1g d'E) cette large différence peut s'expliquer par l'impact de l'atmosphère et l'environnement et la distribution géographique.

Une autre étude réalisée par **Abudunia et son groupe de chercheurs (2017)** sur des extraits aqueux des fleurs de *Calendula arvensis* collecté a la région de Rebat (Khemisset au Maroc), leur valeur en flavonoïdes trouvée était de l'ordre de 74,93±1,50 mg EQ rutin/g d'extrait qui est aussi inferieur a la valeur marquée dans nos résultats. Dans la même étude une autre teneur en flavonoïdes de l'ordre de 174,93±5,21 mg EQ rutin/g d'extrait obtenue à partir des extraits mèthanoliques de fleur de *Calendula arvensis*, une valeur significativement supérieure à nos

résultats, ce que on peut déduire ici c'est l'importance du choix du solvant sur les teneurs d'extraction.

5.3.Teneur en flavonols :

Les données de l'analyse statistique **(figure 3, Annexe III)** révèlent que la teneur en flavonols est également différente entre les feuilles et les fleurs du *Calendula arvensis* mais avec des valeurs absolues plus faible que celles des flavonoïdes et une teneur plus élevée de flavonols dans les fleurs (6,68±0,2 mg Eq Q/g MS) par rapport aux feuilles (3,602±0,008 mg Eq Q/g MS), ces données renforcent l'idée que les fleurs de *Calendula arvensis* sont plus riche en composés phénoliques que les feuilles, les teneurs en flavonols des deux extraits est affecté par le prétraitement de l'échantillon (taille des particules, Ratio solvant matière/sèche…) la taille des particules augmente la surface disponible pour le transfert de masse, améliorant ainsi les teneurs d'extraction **(Spingo et al, 2007).**

Dans une étude HPLC réalisé par **Abudunia et son équipe (2017)** sur *Calendula arvensis*, la teneur (dans les feuilles) en flavonols était d'une valeur de 9,8 mg EQ rutin/g d'extrait, d'autre part dans une autre recherche basée sur une méthode spectrale (spectrophotométrie UV-Visible), ils ont trouvé une teneur de 10,5 mg EQ rutin/g d'extrait (dans les feuilles).

En résumé nos résultats sont cohérents avec les valeurs rapportées dans les études de **(Abudunia et al, 2017)**, ils contribuent à une meilleure compréhension de la teneur en flavonols de *Calendula arvensis* **(Abudunia et, 2017 ; Abutaha et al, 2019).**

5.4.Teneur en tanins condensés :

L'analyse statistique des résultats des teneurs en tanins condensés **(figure4, Annexe III)** consignés dans le tableau X révèlent que la meilleure teneur est celle trouvés dans les feuilles (7,327 ± 0,391 mg Eq Catéchine /g E) par contre dans les fleurs on a enregistré une faible teneur (1,714±0,108 mg Eq Catéchine /g E) avec une différence significative ($p<0,05$).

Cette variation peut indiquer des différences dans les fonctions biologiques des tanins, par exemple les feuilles étant plus exposées aux attaques des herbivores que les fleurs, peuvent accumuler des niveaux plus élevés de tanins comme mécanisme de défense **(Herms et al, 1992)**. Dans l'étude réalisé par **HAMOUDI Souhila** et ces collaborateurs (2012), ils ont évalué les teneurs en composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*CynaraScolymus L.*), par deux méthodes d'extraction différents, la décoction et la macération avec l'utilisation de quatre solvants d'extraction (eau, méthanol, éthanol, acétone). Ils ont

enregistré une teneur de 10,28±0,26 mg Eq Catéchine /g E pour la méthode de décoction et avec utilisation de l'eau comme solvant d'extraction, et pour la macération une teneur de 3,53±0,34 mg EQ Catéchol/g de MS était enregistrer. En comparant ces résultats avec nos résultats, on remarque que les teneurs trouvées dans notre étude qui concernent les fleurs (1,714 ± 0,108 mg EQ Catéchol/g de MS) est plus faible par rapport aux résultats de cette étude.

Dans une étude menée par **BOUCHNAK Fatima et al, 2018**, ils ont étudié l'extrait méthanoïque des feuilles d'*Artenisiaabsinithuim L* obtenues par la méthode soxhlet, ils ont trouvé une teneur plus faible (2,9±0,8 mg EQ l'acide tannique/g d'extrait) par rapport à celle trouvé dans notre étude pour l'extrait aqueux de feuilles (7,327±0,391 mg EQ l'acide tannique/g d'extrait).

D'autre part, **Rosales, 1999 et Jokić et al, 2010**. Soulignent que l'eau, particulièrement à des températures élevées, extraient également des substances indésirables telles que les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques. Ces substances peuvent interférer avec le dosage des tanins. L'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires **(U.D. Chavan et al, 2001).**

6. Résultats des activités anti-oxydantes des extraits obtenus après optimisation :

6.1.Effet anti-radicalaire vis à vis du radical DPPH :

Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des deux extraits issus des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* et deux standard BHT et acide ascorbique sont présentés dans la figure 16 :

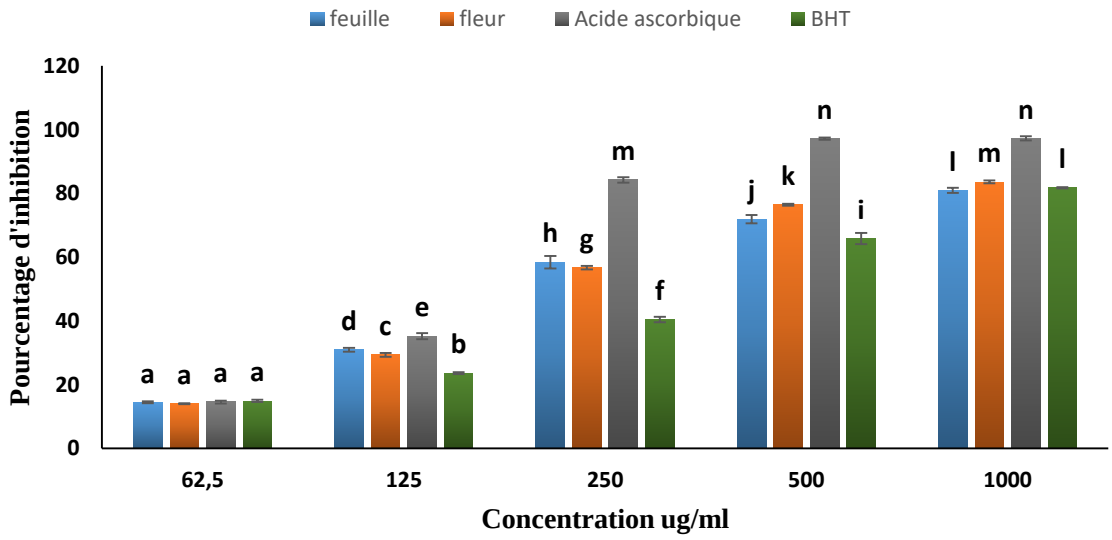


Figure 16 : Effet scavenger contre le DPPH des extraits de feuilles et fleurs *Calendula arvensis* et de deux standard

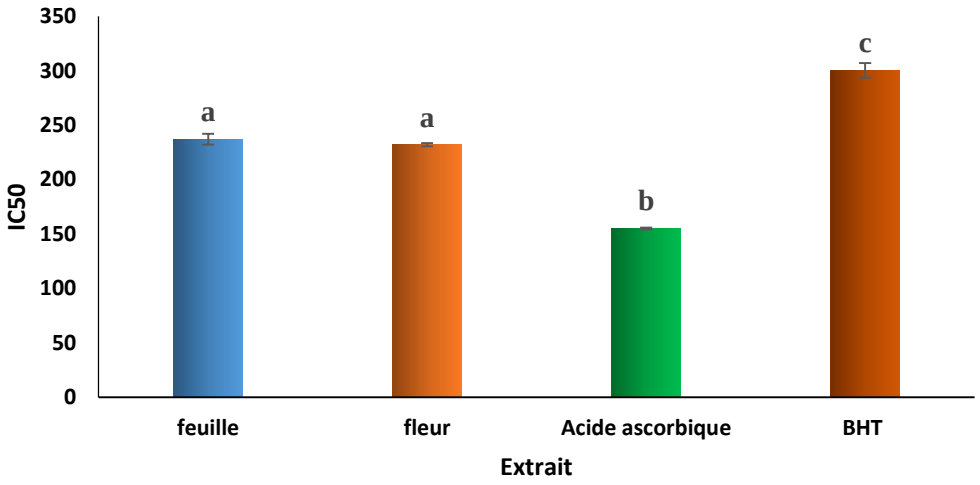
Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

Les extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Calendula arvensis* ont montré une forte activité de piégeage du radical DPPH à diverses concentrations (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml et 62,5 µg/ml). Le pourcentage d'inhibition pour les deux types d'extraits est proportionnel à leur concentration. À la concentration la plus basse (62,5 µg/ml), aucune différence significative n'a été observée entre les feuilles et les fleurs, avec un pourcentage d'inhibition faible (14%). En revanche, pour les concentrations plus élevées (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml), une différence significative a été notée entre les deux extraits, avec des pourcentages d'inhibition variant de 29% à 76%. La plus forte activité de piégeage a été observée à la concentration la plus élevée (1 mg/ml), atteignant 80,9% pour les feuilles et 83,57% pour les fleurs.

L'évaluation comparative des extraits de fleurs et de feuilles de *Calendula arvensis* par rapport aux standards BHT et acide ascorbique (figure 19) a révélé des activités anti oxydantes significatives. Les extraits de *Calendula arvensis* ont montré une capacité antioxydant notable, légèrement inférieure à celle de l'acide ascorbique standard, mais supérieure à celle du BHT. Ces résultats suggèrent que *Calendula arvensis* pourrait constituer une source prometteuse de composés antioxydants naturels **(Miller et al, 2022).**

L’effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical DPPH est exprimé par l’IC50 qui correspond à la concentration nécessaire en extraits pour inhiber 50% de la concentration initiale de radicaux libres.

Les résultats des IC50 sont présentés dans la figure suivante :



Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

Figure 17 : Les CI_{50} des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis*, acide ascorbique et BHT.

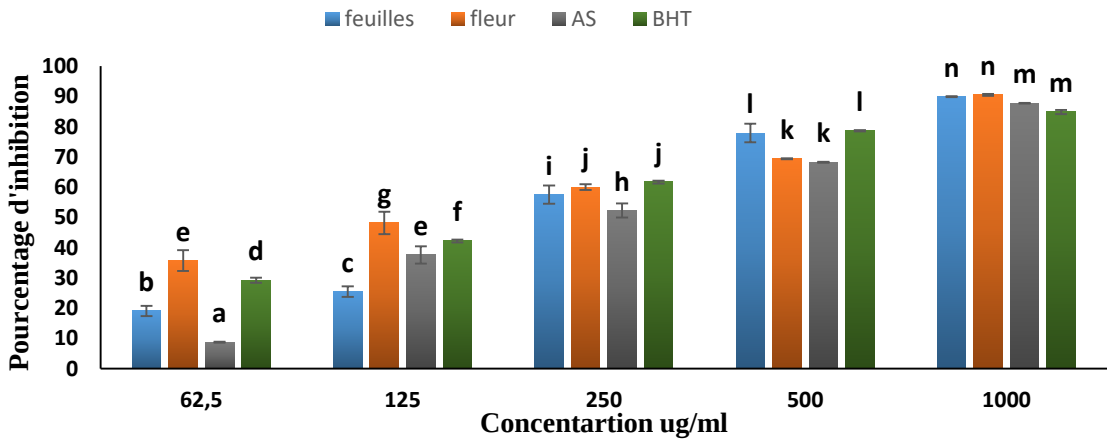
L'analyse des valeurs d'IC_{50} des extraits de feuilles et de fleurs de *Calendula arvensis* a montré des résultats pertinents en comparaison avec les standards acide ascorbique et BHT, l'extrait des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* sont doté d'un faible pouvoir antioxydant avec une valeur d'IC_{50} de 237,14ug/ml et 232,05ug/ml respectivement par rapport à l'acide ascorbique avec une valeur d'IC50 de 155,02ug/ml. Cette valeur en IC50 de l'acide ascorbique est nettement plus élevée à celle trouvée par (**Mgama et al., 2023)** qui est de 95µg/ml. Nos résultats des IC50 de nos deux extraits aqueux révèlent un très fort effet scavenger contre DPPH en le comparant à la molécule de synthèse BHT avec une valeur d'IC_{50} de (300,365113 ug/ml). Nos résultats d'IC_{50} de la BHT ne sont pas en accord avec la valeur trouvée par (**Hebi et al, 2017)**, d'où l'antioxydant synthétique butylhydroxytoluène (BHT) a montré une IC50 égale à 13,71 µg/ml.

Ces résultats mettent en évidence le potentiel des extraits de *Calendula arvensis* comme sources naturelles d'antioxydants, avec une efficacité notable par rapport aux standards utilisés. Ainsi, bien que l'acide ascorbique demeure le standard d'activité antioxydant le plus efficace, *Calendula arvensis* présente un profil prometteur qui pourrait être exploité dans diverses applications pharmaceutiques et cosmétiques **(Miller et al., 2022). TugbaErcetin et al, 2012.** Ont enregistrés une activité anti radicalaire DPPH faible par rapport aux résultats de notre étude.

6.2.Activité antioxydant ABTS :

Les résultats de l'analyse statistique **(figure 7, Annexe III)** montrent que l'extrait aqueux des feuilles et des fleurs à la concentration la plus faible (62,5ug/ml) , l'inhibition de l'ABTS est relativement bas, cela indique que la capacité antioxydant à ce niveau est limitée, à mesure que la concentration augmente (125ug/ml a 500ug/ml) il y a une augmentation significative du pourcentage d'inhibition d'ABTS, cela suggère une corrélation positive entre la concentration des extraits testées et son l'efficacité antioxydant. Aux concentrations les plus élevées (1mg/ml) l'histogramme atteint un plateau et montrent une activité inhibitrice très fort d'ABTS, de plus il semble que l'extrait de fleur ait un effet inhibiteur plus puissant que l'extrait de feuille pour la plupart des concentrations testées.

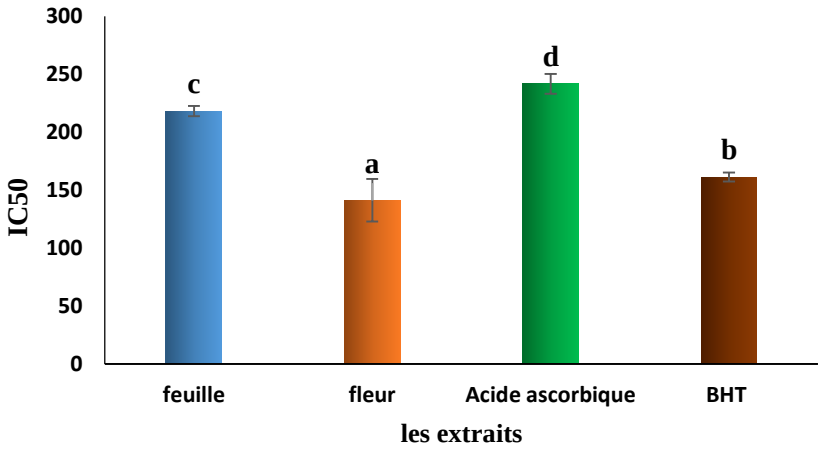
Les résultats des pourcentages d'inhibition d'activité ABTS sont présentés dans la figure 18:



Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

Figure 18 : Pourcentage d'inhibition d'ABTS des feuilles et fleurs du *Calendula arvensis* et les deux standards

Ces résultats indiquent une relation dose dépendante entre les concentrations des extraits et leur activité antioxydant. Ces extraits aqueux de fleurs et feuilles de *Calendula arvensis* présente la même tendance d'activité inhibitrice du l'ABTS que les deux standard (acide ascorbique, BHT) étudiés, l'effet inhibiteur d'ABTS augmente en augmentant la concentration des extraits ou des standards. Ce pouvoir inhibiteur est confirmé par des valeurs IC50 qui sont présenté dans la figure 19 :



Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

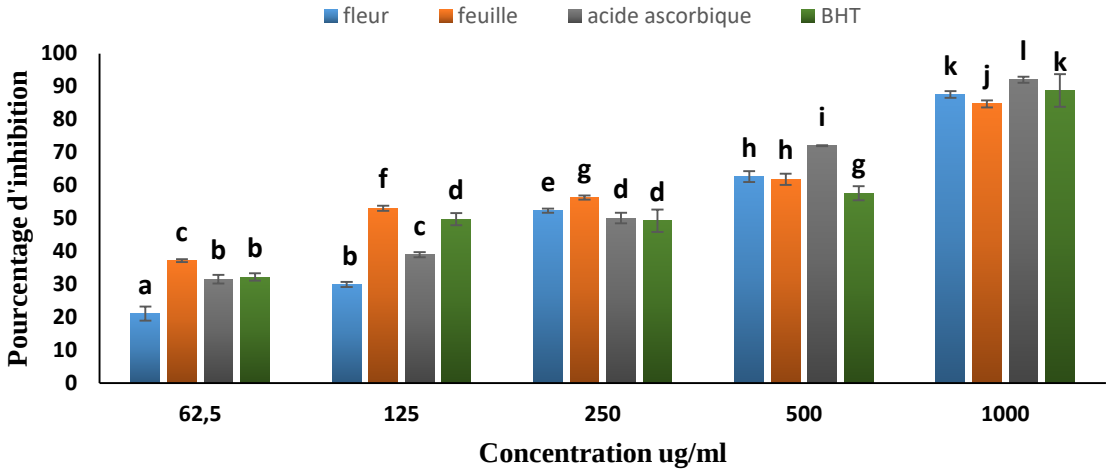
Figure 19 : Valeur des IC50 pour les extraits est les standards

Les résultats de cette étude montrent que les IC50 des extraits de feuilles et de fleurs de *Calendula arvensis* sont plus efficaces que les deux standards (BHT et acide ascorbique), en effet les IC50 des extraits de fleur (141,27ug/ml) et des feuilles (218,22ug/ml) sont toutes les deux inferieures à ceux de BHT (161,38ug/ml) et de l'acide ascorbique (241,72ug/ml). Indiquant une meilleure activité antioxydant (ABTS). Cependant, il est important de noter que les fleurs de *Calendula arvensis* présente une efficacité supérieure aux feuilles, car elle possède un IC50 plus faible. Cela suggère que les composes antioxydants présents dans les fleurs sont plus puissant que ceux dans les feuilles, renforçant ainsi leur potentiel d'application dans des contextes nécessitant une forte activité antioxydant.

Dans une étude récente réalisé par une équipe de chercheurs (**AK et al, 2020)**, les paramètres antioxydant sont évaluées par le test ABTS qui estimé la capacité de transfert d'électron unique **(Siltana et al, 2017),** le teste ABTS était réalisé sur les extraits de fleur de quelque plante médicinale et parmi c'est plantes *Calendula oficinalis* une plante de même genre que *Calendula arvensis*. Les résultats de cette étude montrent une activité antioxydant élevées des fleurs de *Calendula oficinalis* à une concentration de 48,15mgEt/g.

6.3.Activité antioxydant vis-à-vis du Radical OH :

L'histogramme ci-dessous montrent l'effet des extraits aqueux des fleurs et feuilles de *Calendula arvensis* et des deux standards a différente concentrations (62,5ug/ml, 125ug/ml, 250ug/ml, 500ug/ml, 1000ug/ml) sur l'inhibition des radicaux hydroxyles OH.



Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

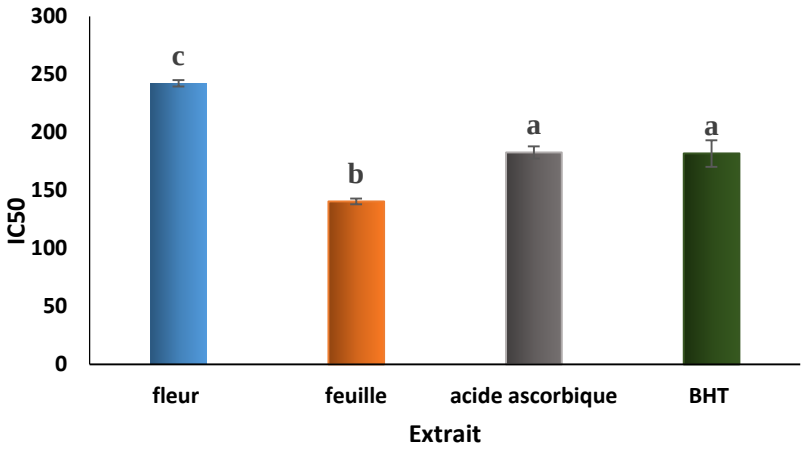
Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de radical OH des feuilles et fleurs du *Calendula arvensis* et des deux standards.

Les résultats obtenus indiquent que le pourcentage de neutralisation des radicaux hydroxyles OH par nos extraits est directement proportionnelle à leurs concentrations, en effet, cette dépendance à la dose démontre que les concentrations plus élevées d'extrait améliorent leur capacité à neutraliser les radicaux OH. Ainsi l'efficacité antioxydant de nos extraits est directement liée à leurs concentrations, en deuxième point les résultats de cette étude révèlent que l'activité inhibitrice des extraits de feuilles est également plus élevée comparée à celle des fleurs pour la majorité des concentrations testées, cette tendance ne se vérifie pas dans le cas d'ABTS et DPPH ou les fleurs qui montrent une activité inhibitrice supérieure à celles des feuilles. Ces observations suggèrent une variation significative de l'efficacité inhibitrice des extraits en fonction de la source végétale et de type de test antioxydant utilisé.

Le pourcentage inhibition de nos extraits issus des fleurs et feuilles de *Calendula arvensis* suivent la même tendance du développement des deux standard de référence à savoir BHT et acide ascorbique, cette observation suggère que nos extraits possèdent des propriétés antioxydants comparable à ces standard reconnus, ce qui renforce leur potentiel comme agent antioxydant naturels dans divers applications, leur utilisation pourait offrir des avantages en terme de sécurité et de biocompatibilité tout en répondant à une demande croissante pour des produit naturels **(Kähkönen, M.P, 1999).**

En examinant l'IC50 des deux extraits de *Calendula arvensis* (figure 21). On observe que l'extrait de feuilles de *Calendula arvensis* et le plus efficace parmi les substances testées

son IC50 qui est de 140,61ug/ml est le plus bas, est ce qui indique une activités anti radicalaire vis-à-vis du radical OH supérieur à celle des deux standards (181,912923 ug/ml pour la BHT et 182,820478 ug/ml pour l'acide ascorbique), par contre l'extrait des fleurs présent une activité anti radicalaire moins efficace que ceux des feuilles et des standards avec un IC50 de 242,42ug/ml. La valeur de la concentration inhibitrice de 50% du radical OH par acide ascorbique rapportée par (**Habibi et al., 2024)** est de 120µg/ml qui est nettement inférieur à la valeur trouvée dans notre étude.



Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

Figure 21 : Histogramme présenter les valeurs des IC50 des feuilles et fleurs de *calendula arvensis*

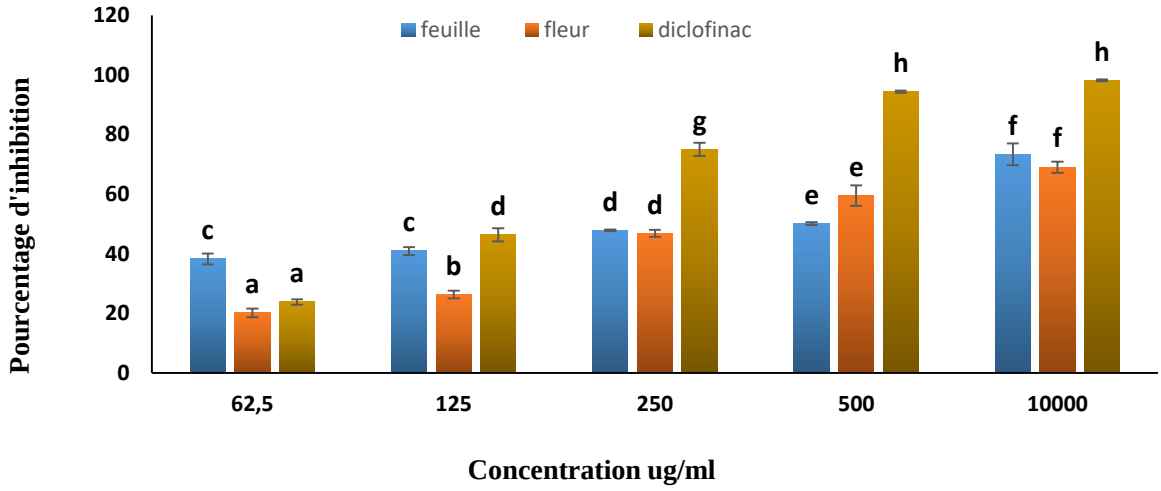
En conclusion les extraits de feuilles de *Calendula arvensis* illustre une meilleure efficacité antioxydant que les deux standards utilisés dans cette étude (figure 21), surpassant ainsi les performances des extraits des fleurs ainsi que les standards. En comparaison avec l'activité antioxydant ABTS, on conclure que l'efficacité des extraits de *Calendula arvensis* peut varier en fonction du type de teste utilisées pour évaluer cette activité.

Toutes ces observations suggèrent que les composes bioactifs présents dans les fleurs et feuilles de *Calendula arvensis* pourraient offrir des avantages supérieurs en termes d'efficacité et de potentiel thérapeutique. En raison de leur performance prometteuse, ces extraits pourraient être envisagés comme des agents pharmacologiques potentiels pour les traitements des maladies liées au stress oxydatif. De plus leur utilisation dans l'industrie alimentaire pourrait enrichir les produits en antioxydants naturels, offrant ainsi des alternatives plus saines aux additifs synthétiques. Enfin, ces résultats encouragent également la poursuite des recherches pour explorer d'avantage les applications potentielles des extraits de chaque partie de cette plante.

7. Résultats des activités anti inflammatoire des extraits obtenus après optimisation :

7.1.Activité anti-inflammatoire BSA :

Les extraits de feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* montrent une activité anti-inflammatoire significative (figure 22) démontrée par leur capacité à inhiber la dénaturation de la BSA, une protéine souvent utilisée comme modèle pour étudier l'inflammation et les effets anti-inflammatoire des substances bioactives **(Choi, E. M., & Hwang, J. K. 2004)**Plus la concentration des extraits est élève plus l'inhibition est forte, ce qui suggère une relation dose dépendante cela signifie que les composants bioactifs présentes dans ces extraits sont efficaces pour réduire les processus inflammatoire, ce que on peut dire aussi. Ces résultats montrent aussi que l'activité inhibitrice des extraits de feuilles est plus modérée par rapport au extraits de fleurs avec une valeur maximale allant jusqu'à 76%, ce qu'on peut comprendre à partir de ces résultats c'est que les deux extraits étudier de *Calendula arvensis* ont pu protéger la BSA en empêchant sa dénaturation que ça soit par un mécanisme de stabilisation de sa structure native ou par une interaction avec les voies inflammatoire, exemple les voies de signalisation COX (Cyclo Oxygénase), en réduisant ainsi la production de médiateurs inflammatoire tels que les cytokines et les prostaglandine **(Tung, Y et al 2007).**



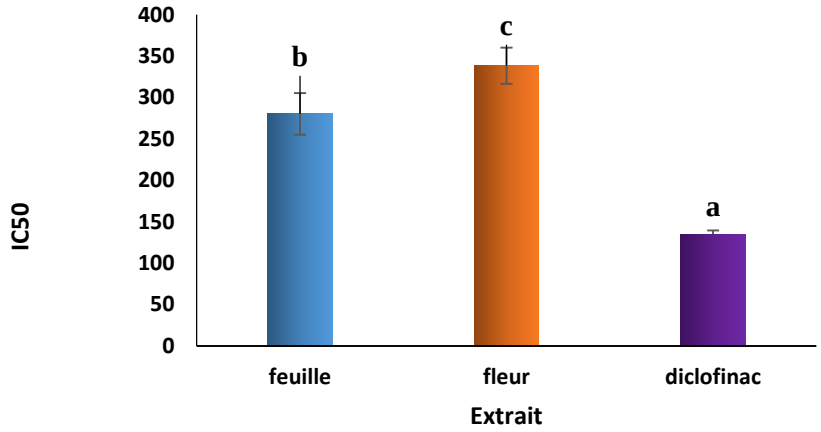
Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

Figure 22 : les pourcentages d'inhibitions de la BSA pour les extraits des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* et Diclofinac

En comparaison avec l'activité inhibitrice du standard (Diclofinac) qui est présenté dans la figure 22, on remarque que l'activité du standard suit la même tendance que nos deux extraits. Mais son activité maximale est légèrement inférieure à celle des deux extraits, cela indique que

les extraits de fleurs et feuilles de *Calendula arvensis* sont très efficace avec une activité plus intéressante.

Par rapport à l'IC50 des fleurs de *Calendula arvensis* (338,33ug/ml) et IC50 des feuilles (280,02ug/ml) on peut dire que les extraits de feuilles sont plus efficaces que les extraits de fleur. Au même temps les deux extraits sont beaucoup moins efficaces que le standard diclofinac (134,80ug/ml).



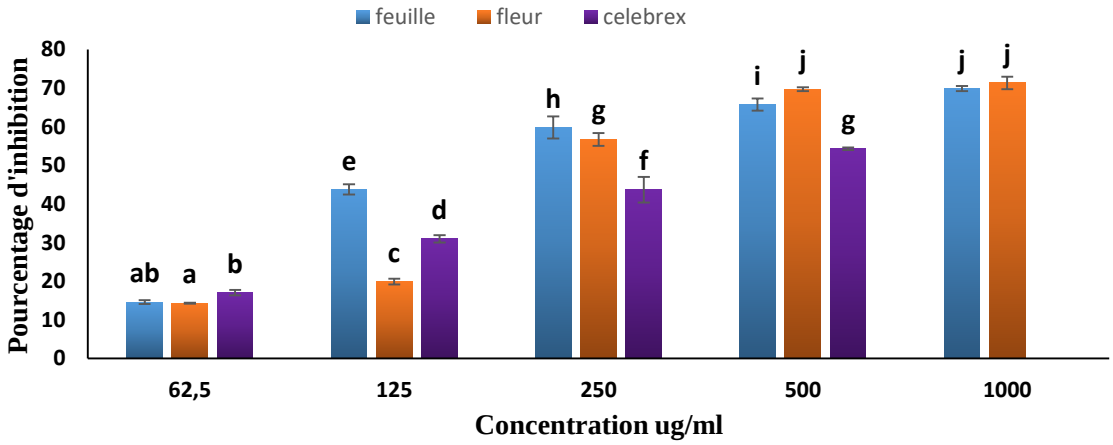
Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

Figure 23 : Valeurs des IC50 de l'activité anti inflammatoire BSA des extraits de *Calendula arvensis* et du standard diclofinac.

En comparant nos résultats statistiques avec une analyse présentée par **Fidele Castro et al, 2020**, sur une étude menée sur les extraits d'acétate d'éthyle des racines *Echimops gracilis*une (astéracées), récolté au Cameroun en février 2011. On constate que leur analyse statistique démontre une tendance du développement d'inhibition de dénaturation de la BSA similaire à notre analyse statistique mais leur valeur était légèrement supérieure marqué d'une valeur maximale allant jusqu'à 86% d'inhibition de dénaturation a une concentration de 1000ug/ml. Ces différences peuvent être lié à l'environnement, l'exposition au soleil, le climat et autre paramètre d'extraction et de conservation du matériel végétal.

7.2.Activité anti inflammatoire Ovalbumine :

Les résultats expérimentaux du test anti-inflammatoire ovalbumine des extraits (feuilles et fleurs) de *Calendula arvensis* et de standard Celebrex sont présentés dans la figure 24 :



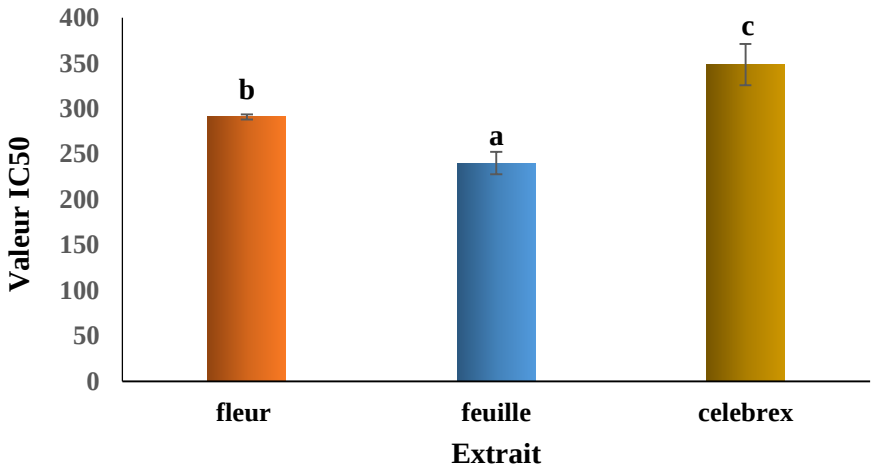
Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

Figure 24 : pourcentage d'inhibition de test ovalbumine pour les feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* et pour le standard Celebrex.

Les résultats statistiques du test d'ovalbumine sur les extraits de feuilles et de fleurs de *Calendula arvensis* **(figure 13, Annexe III)** révèlent une inhibition significativement (P<0,05) plus élevée dans les feuilles par rapport aux fleurs. Les extraits de fleur et de feuilles de *Calendula arvensis* agissent sur la protection de la protéine ovalbumine en inhibant la dégradation protéolytique. Ce mécanisme repose principalement sur la capacité des composés bioactifs présents dans le calendula à interférer avec les enzymes protéolytiques responsables de la dégradation des protéines, telles que les protéases. Les flavonoïdes, tanins et autres composés phénoliques contenus dans le calendula sont connus pour leur activité antiinflammatoire et leur capacité à former des complexes avec les protéines, renforçant ainsi leur structure et stabilisant leur conformation **(Moure, A, 2001).** Cette action protectrice peut également impliquer des interactions directes avec les résidus d'acides aminés de la protéine ovalbumine, limitant ainsi l'accès des enzymes dégradatives et prolongeant la durée de vie fonctionnelle de la protéine **(Dai, J, 2010).**

Les résultats de cette étude indiquent que les extraits de *Calendula arvensis* montrent un potentiel prometteur comme agents anti-inflammatoires. Ces propriétés pourraient être exploitées dans le développement de thérapies visant à réduire l'inflammation, bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour comprendre pleinement les mécanismes biochimiques sous-jacents et évaluer leur efficacité dans des modèles précliniques et cliniques appropriés.

Les résultats des IC50 des extraits de feuilles et de fleurs de *Calendula arvensis* présentés dans la figure 25, montrent des valeurs inférieures à celles du standard Celebrex. L'IC50, ou concentration inhibitrice médiane, est une mesure de l'efficacité d'une substance à inhiber une réaction biologique spécifique. Des valeurs d'IC50 plus faibles indiquent une plus grande efficacité à des concentrations plus basses.



Les valeurs désignées avec des lettres différentes indiquent que la différence est significative (P<0,05)

Figure 25 : les valeurs des IC50 des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* et de standard celebrex

Dans notre étude, les extraits de *Calendula arvensis* ont des IC50 plus faibles que le Celebrex, ce qui signifie qu'ils sont plus efficaces pour inhiber la dénaturation de ovalbumine à des concentrations plus faibles. Cette différence suggère que les composés actifs présents dans les extraits de *Calendula arvensis* possèdent une plus grande affinité ou une meilleure capacité à interférer avec les mécanismes biochimiques impliqués dans l'inhibition de l'ovalbumine par rapport au Celebrex.

Les résultats de notre étude montrent que les extraits de feuilles et de fleurs de *Calendula arvensis* présentent un pourcentage d'inhibition de l'ovalbumine supérieur à celui du Celebrex (figure 35), un médicament anti-inflammatoire couramment utilisé. Cette comparaison indique que les extraits de *Calendula arvensis* pourraient offrir une alternative naturelle et potentiellement plus efficace pour inhiber la dénaturation des protéines et la protection des cellules des dommages inflammatoires.

Conclusuion

Conclusion générale :

Cette étude vise d'abord à optimiser les conditions d'extraction (ratio, fréquence et durée) des composés phénoliques totaux à partir de la plante médicinale *Calendula arvensis*, en utilisant une méthode d'extraction par micro-ondes. L'optimisation a permis de déterminer les conditions idéales pour une extraction maximale des composés phénoliques totaux à partir des extraits de feuilles et de fleurs, avec des conditions optimales d'extraction de 5%, 547,02Hz et 120s pour les fleurs, et de 5%, 400,95Hz et 116,24s pour les feuilles. Ensuite, après cette première extraction, un premier dosage des composés phénoliques totaux est réalisé, les teneurs obtenues étaient de 16,02646 mg/g pour les feuilles et de 48,98208 mg/g pour les fleurs. D'autre part un premier test d'activité antioxydant ABTS a donné des résultats de 676,8885(mgET/gMS) pour les feuilles et de 868,2956(mgET /gMS) pour les fleurs. Une seconde extraction a ensuite été réalisée sous ces conditions optimales, suivie d'une quantification de quatre types de composés phénoliques : phénols totaux solubles, flavonoïdes, flavonols et tanins condensés. De plus, les teneurs obtenues pour ces composés phénoliques à partir des extraits de feuilles étaient respectivement de 19,030 ± 0,278 mg/g ; 46,408 ± 0,424 mg/g ; 3,602 ± 0,80 mg/g ; et 7,327 ± 0,391 mg/g. Pour les extraits de fleurs, les teneurs étaient de 46,878 ± 0,233 mg/g ; 104,772 ± 1,514 mg/g ; 6,687 ± 0,206 mg/g ; et 1,714 ± 0,108 mg/g. L'activité antioxydant des extraits aqueux de *Calendula arvensis* a été évaluée à l'aide de différentes méthodes (DPPH, ABTS et OH), révélant une excellente capacité de neutralisation des radicaux libres, avec des IC50 respectifs pour les fleurs et les feuilles obtenus pour chaque méthode : DPPH (fleurs 232,0541ug/ml, feuilles 237,1476ug/ml), ABTS (fleurs 141,2761ug/ml, feuilles 218,2233ug/ml) et OH (fleurs 242,4172ug/ml, feuilles 140,6075ug/ml). Par ailleurs, l'activité anti-inflammatoire des extraits aqueux a été étudiée via la méthode de dénaturation des protéines BSA et ovalbumine, montrant une activité modérée dans la protection de la BSA avec des IC50 de 338,33 µg/ml pour les fleurs et de 280,02 µg/ml pour les feuilles.En conclusion, en comparant l'activité antioxydant et anti-inflammatoire des extraits aqueux de feuilles et de fleurs de *Calendula arvensis*, il a été constaté que les extraits de fleurs présentent une activité supérieure, avec des propriétés antioxydants et anti-inflammatoires plus marquées que les extraits de feuilles.

Nos données analytiques ont montré que *Calendula arvensis* représentent des sources appréciables en composés phénoliques, antioxydants et anti-inflammatoires. Dans le but d'élargir cette recherche et d'approfondir les travaux déjà entrepris, plusieurs travaux peuvent être explorées.

- Etudier d'autres techniques d'extractions telles que l'extraction par ultrason, macération, décoction…
- Optimiser d'autres paramètres qui affectent le taux d'extraction des composés phénoliques, tels que ; la température, le pH, la granulométrie de la poudre...etc.
- Utiliser d'autres plans de la surface de réponse (Plans composites, Doehlert…).

Il serait intéressant d'isoler et de caractériser les composés phénoliques responsables des activités biologiques évaluées et d'effectuer des travaux plus approfondis sur les composés phénoliques (fractionnement et identification de différentes molécules) et d'autres effets thérapeutiques (anti-cancéreux, anti-inflammatoire sur culture cellulaire...etc).

Pour une meilleure compréhension du mode d'action des dérivés polyphénoliques présents dans les extraits de fleurs et de feuilles étudiées, il serait souhaitable d'évaluer *in vitro et in vivo* l'activité antioxydant et anti-inflammatoire de chacun des composés actifs présents dans ces extrais. Ceci permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits de plante et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénolique.

Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ces substances naturelles sont capables d'inhiber la dénaturation des protéines (l'inflammation) *in vitro et in vivo* et pour contribuer à la mise au point de nouveaux remèdes efficaces.

Références bibliographique

A

- Abdul-Malik ABUDUNIA, 2018. ETUDE PHYTOCHIMIQUE, SCREENING BIOLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE DES FLEURS DE CALENDULA ARVENSIS.
- Abbas A, Miloudi S.2016. Evaluation de l'activité antioxydante et antifongique d'une plante médicinale : *Pistacia lentiscus* . Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi ,B.B.A.
- Abbasi A.M., Khan M.A., Ahmad M., Zafar M., Jahan S. & Sultana S. (2010). Ethno medicinal information of some medicinal plants in research institutes of south-xest nigeria.
- Abdellah K., Zineb S., Halima MO, Amel H., Zineb B., Noureddine B. Recherche des plantes à caractère hypotenseur utilisées dans la pharmacopée des populations de la vallée du M'Zab (Sahara Algérien) *Journal of Advanced Recherche en Science et Technologie* . 2019 ; 13 : 1050-1061.
- A. Favier, (2006). Mechanisms of action of antioxidants. In J. A. Johnson & M. J. Bale (Eds.), *Antioxidants in Health and Disease* (pp. 45-68). CRC Press.
- Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan L A, Favela-Torres E, Aguilar C N (2008) Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins, Applied Microbiology and Biotechnology, 78, 189-199.
- Ak, G. ; Zengin, G. ; Sinan, KI ; Mahomoodally, MF; Picot-Allain, MCN; Cakir, O. ; Bensari, S. ; Yilmaz, MA; Gallo, M. ; Montesano, D. Une bio-évaluation comparative et des profils chimiques d' extraits de *Calendula officinalis* L. préparés via différentes techniques d'extraction. *Appl. Sci.* 2020 , *10* , 5920.
- Akula U.S. & Odhav B. (2008). *In vitro,* 5-Lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plantes of south africa.
- Albert le Grand, XIIIe siècle (édition moderne : 2004). *De Vegetabilibus.* Routledge (édition anglaise : "Albertus Magnus: On the Vegetables").
- Allouach S., Ghernoub B. 2017. Étude des composés phénoliques et terpéniques d'une plante médicinale traditionelle . Université Abderrahmane MIRA, Bejaia
- Andrensek S., Simonovska B., Vovk I., Fyhrquist P., Vuorela H. & Vuorela P. (2004). Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar arachidonic acid by bioflavonoid, structure-activity relations.*Biochem.Pharmacol*.**33**:1525-35.

- Arora D, Rani A, Sharma A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus Calendula. Pharmacogn Rev. 2013 Jul;7(14):179-87. doi: 10.4103/0973-7847.120520.
- Aruoma, O. I. (1999). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 957-968.
- Aslan S., Akan H., Pekmez H. Yaslıca beldesi ve Arıkök mahallesi (Şanlıurfa)'nin etnobotanik açıdan araştırılması *Diversité biologique et conservation* . 2020 ; 13 (1):44-61. est ce que je : 10.46309/biodicon.2020.730293.
- Aya Khouchlaa,1 Aicha El Baaboua , 2 Hamza El Moudden , 3 Fatima Lakhdar,4 Saad Bakrim , 5 Naoual El Menyiy , 6 Omar Belmehdi,2 Hicham Harhar , 7 Nasreddine El Omari , 8 Abdelaali Balahbib , 9 Moon Nyeo Park,10 Gokhan Zengin,11 Bonglee Kim , 10 and Abdelhakim Bouyahya, 2023. Traditional Uses, Bioactive Compounds, and Pharmacological Investigations of Calendula arvensis L.: A Comprehensive Review
- Aziz et A. Lotfi, « Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales et aromatiques utilisées par les populations de Targuist au Nord du Maroc », *Der Pharma Chemica* , vol. 10, non. 5, 2018.
- Aziz Z., Lotfi A. Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales et aromatiques utilisées par les populations de Targuist au Nord du Maroc. *Der Pharma Chemica* . 2018 ; 10 (5)

B

- Bacchi, S., Palumbo, P., & Sponta, A. (2012). Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 11(1), 52-64.
- Barkely, T. M., Brouillet, L., Strother, J. L, 2006. Asteraceae. In: Flora of North America Editorial Committee. Flora of North America, North of Mexico. vol. 19. New York: Oxford University Press, pp. 3-69
- Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : Molecular mechanisms. Clinical science, 94(6), 557–572
- Belabbes R. 2014. Enquête ethnobotanique, caractérisation chimique et activités biologiques des volatils des deux plantes médicinales de l'ouest Algérien : *Calendula arvensis L* et *Carthamussp L*. Université ABOU BEKR BELKAÏD, TLEMCEN

- Bey, M.B., Louaileche, H., Zemouri, S., Biotechnology, 2013. Optimization of phenolic compound recovery and antioxidant activity of light and dark dried fig (Ficus carica L.) varieties. 22, 1613-1619
- BOUCHENAK Fatima1* , DEGAICHIA Hocème1 , LAMGHARBI Abdelbaki1 et BENREBIHA Fatima. ÉVALUATION IN VITRO DU POTENTIEL ANTIFONGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE ET DES EXTRAITS MÉTHANOLIQUES D'UNE ASTERACEAE ARTEMISIA ABSINTHIUM L. Revue Agrobiologia (2018) 8(1): 886-895
- Boussada, O., Ammar, S., Saidana, D., Chriaa, J., Chraief, I., Daami, M., ... & Mighri, Z. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of ***Artemisia herba-alba*** from Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 405-409.
- Bragazza L. & Freeman C. (2007). High nitrogen availability reduces polyphenol content Bruneton J (2015) Pharmacognosie (5° Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, Tec and Doc, Lavoisier, Paris. 1504pp.
- Bruneton J. (1999**)**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. (Ed.) *Lavoisier, Tec*
- Buckle, J., 2003. Care of the elderly (Chapter 15)—essential oils in practice. In: Clinical Aromatherapy, 2nd edition. Elsevier Ltd., Amsterdam, The Netherlands *Bulletin de l'O.I.V*. 02: 865-66.
- Burian, M., & Geisslinger, G. (2005). COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. Pharmacology & Therapeutics, 107(2), 139-154. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.02.004
- by Gunes Ak 1,Gokhan Zengin 1ORCID,Kouadio Ibrahime Sinan 1,Mohamad Fawzi Mahomoodally 2,3,*,Marie Carene Nancy Picot-Allain 3ORCID,Oguz Cakır 4ORCID,Souheir Bensari 5,Mustafa Abdullah Yılmaz 6ORCID,Monica Gallo 7,*ORCID andDomenico Montesano. 2020. A Comparative Bio-Evaluation and Chemical Profiles of Calendula officinalis L. Extracts Prepared via Different Extraction Techniques

C

- C. C. Heyn and A. Joel, "Reproductive relationships between annual species of Calendula (Compositae)," Plant Systematics and Evolution, vol. 143, no. 4, pp. 311–329, 1983.
- Cacace, J.E., et Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from mille dberries. J. Food Eng, 59, 379-389.
- Calendula arvensis L., 1763 - Souci des champs, Gauchefer-Voir la taxonomie (mnhn.fr)

- CC Heyn *et coll.* (1983). Relations reproductrices entre les espèces annuelles de *Calendula* (Compositae). PL. Système. Évol.
- Chaachouay N., Benkhnigue O., Fadli M., El Ibaoui H., Zidane L. Etudes ethnobotaniques et ethnopharmacologiques des plantes médicinales et aromatiques utilisées dans le traitement des maladies métaboliques dans le Rif marocain. *Héliyon* . 2019 ; 5 (10) doi : 10.1016/j.heliyon.2019.e02191. e02191
- Charles, N. S., Peter, A. W. & Derek, W. G. (2010). Fundamentals of Inflammation. Cambridge University Press, 2-3.
- Chemat, F. (2009). Mise au Point d'un Procédé d'Extraction d'Huiles Essentielles par Micro-Ondes. In International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009, 853, 207-214.
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., et Sulaiman, R. (2014**).** Extraction and quantification of saponins: A review. Food Research International, 59, 16-40Z
- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2-3), 153-177. doi:10.1007/s11101-012-9242-8
- Choi, E. M., & Hwang, J. K. (2004). Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of Foeniculum vulgare. *Fitoterapia*, 75(6), 557-565. doi:10.1016/j.fitote.2004.05.005
- Cieslik E., Greda A. & Adamus W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. J. Nutr. 130: 2120-6.
- Coste, H. (1998). *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes*. Librairie Scientifique et Technique Albert Blanchard.

D

- D.Arora et al (2013). Une revue sur les aspects phytochimiques et ethnopharmacologiques du genre Calendula. Examens de pharmacognosie
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. doi:10.3390/molecules15107313
- Daoudi A., Bammou M., Zarkani S., Slimani I., Ibijbijen J., Nassiri L. Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la commune rurale d'Aguelmouss province de Khénifra (Maroc) *Phytothérapie* . 2016 ; 14 (4) : 220-228. est ce que je: 10.1007/s10298-015-0953-z.

- Daoudi, M. Bammou, S. Zarkani, I. Slimani, J. Ibijbijen et L. Nassiri, « Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la commune rurale d'Aguelmouss province de Khénifra (Maroc) », *Phytothérapie* , vol . 14, non. 4, p. 220-228, 2016.
- 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.
- Des Abbayes, H., & Collaborateurs. (1971). *Illustrated Flora of the Mediterranean*. Publisher.
- Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulphur containing hetero-1,
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. & Capasso F. (1999). Flavonoïds: Old and new aspects
- doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.
- Dr. Abdul-Malik ABUDUNIA. 2018. Etude phytochimique, screening biologique et pharmacologique des fleurs de calendula arvensis. Université MOHAMMED V – Rabat
- Duenas M., Hernandez T. & Estrella I. (2006)**.** Assessment of *in vitro* antioxidant capacity extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian

E

- El Hachlafi N., Chebat A., Soulaymani Bencheikh R., Fikri-Benbrahim K. Etude ethnopharmacologique des plantes médicinales utilisées pour le traitement des maladies chroniques dans la région de Rabat-Salé-Kénitra (Maroc) *Recherche et applications en ethnobotanique* . 2020 ; 20 : 1–23. est ce que je : 10.32859/era.20.2.1-23.
- Ercetin, T., Senol, F. S., Orhan, I. E., Toker, G., Kartal, M., & Sener, B. (2012). Free radical scavenging capacity and cholinesterase inhibitory effects of the crude extracts and fractions of eight Stachys species. *Pharmaceutical Biology, 50*(6), 700-706 *et Doc.* 3 eme édition. Paris.1120 p.et therapeutique. (Ed.) *TEC & DOC.* 2eme édition. *Lavoisier*. 689p..

F

- Farruggia A., Martin A.B., Baumont R., Prache S., Doreau M., Hoste H. & Durand D.
- Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environmental Health Perspectives, 109(Suppl 1), 69-75
- Faucher, J., (2006). Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Thèse de Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse

- Ferreira, S. L., Junior, M. M. S., Felix, C. S., da Silva, D.L., Santos, A.S., Neto, J.H.S., Souza, A. S., (2019). Multivariate optimization techniques in food analysis–A review. Food chemistry.
- Fogliani B (2002) De la connaissance physiologique des Cunoniaceae endémiques de la nouvelle-Calédonie, à la recherche des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de leurs substances bioactives d'intérêt. Thèse de Doctorat en physiologie végétale et phytochimie, pp 42-52.
- Fouzia Mgamat *,a , Mohamed Benaddou b , Sara Haida c , Asmaa Oubihi a , Hamid El Ibaoui a , Rachid Zouhair d , Abderahim Kribii c , Rachida El Ayadi a , Driss Hmouni a, 2023. Phytochemical evaluation, antioxidant, and antibacterial activity of extracts of Ammi visnaga Lam from various cultivars of plums. *Food Chem.* **81**: 321-6.

G

- Goupy, J., 2013. Introduction aux plans d'expériences: avec applications," l'Usine nouvelle: Dunod. Paris
- GS Cetkovic *et al.* (2004) Propriétés antioxydantes des extraits de souci. Nourriture Rés. Int.
- Gonçalves, A. C. (2018). *Morphological diversity and characteristics of Calendula arvensis*. Journal of Botanical Diversity, 35(2), 187-195.

H

- H. Jaadan, M. Akodad, A. Moumen et al., « Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales poussant dans la région de « Oulad Daoud zkhanine » (province de nador), au nord-est du Maroc », *Recherches et applications ethnobotaniques* , vol. 19, 2020.
- H. Sher et M. Al_yemeni, « Communautés végétales économiquement et écologiquement importantes dans la forêt de conifères de haute altitude de Malam Jabba, Swat, Pakistan », *Saudi Journal of Biological Sciences* , vol. 18, non. 1, p. 53-61, 2011.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504. doi:10.1016/S0031-9422(00)00235-1
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals, fifty years research of plant secondary metabolisme.
- Hoslettmann, H., Wagner, H., & Hikino, H. (1982). *Economic and Medicinal Plant Research*. Academic Press.

- Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. & Hamdi M. (2007**).**The effects of solvents and extraction method on the phenolique and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea l. fruit extracts.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S. & Bailleul, F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *De La Recherche À La Pratique* **2** , 3–6 (2004).
- Herms, D. A., & Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, 67(3), 283-335. Cette étude discute des compromis entre la croissance et la défense chez les plantes, soulignant que les feuilles souvent accumulent des composés défensifs comme les tanins
- Heyn, C.C., 1988. Investing in adaptations to rare events a reproductive strategy. Lagascalia 15, pp.29–36.
- Heyn, C. C., & Joel, D. M. (1983). *The biology of Calendula arvensis L.: An annual in the mediterranean area*. Botanical Gazette, 144(3), 383-388.
- https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/10044/phytochimie
- https://www.aquaportail.com/fiche-plante-3748-calendula-arvensis.html) ↑
- https://www.tela-botanica.org/
- Hüseyin Servi 1,* , Cansu Vatansever2 , Ahmet Doğan3 , Vanya Ari Majeed4 , 2020. Antibacterial activity and essential oil composition of Calendula arvensis L.

I

- Ignat I, Volf I, Popa V I (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, Food Chemistry, 126, 1821-1835
- Iserin P. (2001). Larousse: Encyclopédie des plantes médicinales. (Ed.) *Larousse*. Paris**.**
- Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. African Journal of Biotechnology, 6(25).

J

- Janal, J., Smith, B., & Garcia, L. (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of Calendula arvensis extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(21), 812-818.
- J. Quetin-Leclercq, R. Elias, G. Balansard, R. Bassleer et L. Angenot, « Activité cytotoxique de certaines saponines triterpénoïdes », *Planta Medica* , vol. 58, non. 3, pages 279 à 281, 1992.

- J. Paolini *et coll.* (2010). Composition chimique, variation intraspécifique et variation saisonnière des huiles essentielles de Calendula arvensis L. Systématique biochimique et écologie
- Jaadan H., Akodad M., Moumen A. et al. Enquête ethnobotanique sur les plantes médicinales poussant dans la région de « Oulad Daoud zkhanine » (province de Nador), au nord-est du Maroc. *Recherche et applications en ethnobotanique* . 2020 ; 19 est ce que je : 10.32859/era.19.39.1-12.
- Jumbri, K., Al-Haniff Rozy, M.F., Ashari, S.E., Mohamad, R., Basri, M., Fard Masoumi, H., 2015. Optimisation and characterisation of lipase-catalysed synthesis of a kojic monooleate ester in a solvent-free system by response surface methodology. 10(12), e0144664.

K

- K. Abdellah, S. Zineb, MO Halima, H. Amel, B. Zineb et B. Noureddine, « Recherche des plantes à caractère hypotenseur utilisées dans la pharmacopée des populations de la vallée du M'Zab (Sahara Algérien) », *Journal de recherche avancée en science et technologie* , vol. 13, p. 1050-1061, 2019.
- K. Ramawat , S. Dass , M. Mathur. La diversité chimique des molécules bioactives et le potentiel thérapeutique des plantes médicinales. Herbe. Drogues Ethnomed. Mod. Méd. (2009) , p. 7 à 32 ,
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954-3962. doi:10.1021/jf990146l
- Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro., 1997. Anti-HIV activity of extracts from Calendula officinalis flowers. Biomed Pharmacother P; 51(4) pp.176-8
- Karmakar, S., Kay, J., & Roy, S. (2011). The Chemistry and Biological Activities of Polyphenols. *Current Pharmaceutical Design*, 17(18), 1613-1638.
- Keville, K., 1991. The Illustrated Herb Encyclopedia. Mallard Press, New York, USA.
- Koprivnjak O., Majetić V., Malenica Staver M., Lovrić A. & Blagović B. (2010). Effect of phospholipids on extraction of hydrophilic phenols from virgin olive oils. *Food Chem.* **119**:698–702.
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal.

- Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). "Carotenoid actions and their relation to health and disease." Molecular Aspects of Medicine, 26(6), 459-516.
- Kumaran A et Karunakaran R.J. (2007). In vitro antioxydant activities of methanol extracts of Phyllanthus species from India. Lebens-Wiss Technol. 40: 344- 352.

L

- Lahouel M., Boulkour S., Segueni N. & Fillastre J.P. (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et de paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation de glutathion hépatique.
- LehbilI M. 2018. Étude phytochimique et biologique de trois espèces Algériennes : *Calendula stellata* . (Asteraceae), Scabiosastellata L. (Caprifoliaceae) et SalviabarrelieriEtl. (Lamiaceae) UNIVERSITE FRERES MENTOURI-CONSTANTINE 1 FACULTE DES SCIE NCES EXACTES DEPARTEMENT DE CHIMIE
- Landolfi R., Mower R.L. & Steiner M. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolisme by bioflavonoids : structure-activity relations.
- Lee C.Y., Jeong S.W. & Kim D. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of pulms.
- LehbilI M. 2018. Étude phytochimique et biologique de trois espèces Algériennes : Calendula stellata . (Asteraceae), Scabiosastellata L. (Caprifoliaceae) et SalviabarrelieriEtl. (Lamiaceae) UNIVERSITE FRERES MENTOURI-CONSTANTINE 1 FACULTE DES SCIE NCES EXACTES DEPARTEMENT DE CHIMIE.
- Lester Packer, Helmut Sies, and Manfred Eggersdorfer, 2000. *Antioxidants in Health and Diseas.* Marcel Dekker, Inc.
- Loi MC, Maxia L., Maxia A. Comparaison ethnobotanique entre les villages d'Escolca et Lotzorai (sardaigne, Italie) *Journal of Herbs, Spices, & Medicinal Plants* . 2005 ; 11 (3): 67-84. est ce que je: 10.1300/j044v11n03_07.

M

- M. Jamal, M. Moniruzzaman, MZ Shaheen et al., « Analyse de l'activité antimicrobienne de Calendula arvensis contre les agents pathogènes bactériens », *International Journal of Phytotherapy Research* , vol. 4, p. 10-15, 2014.
- M. Zihlif, F. Afifi, R. Muhtaseb, S. Al-Khatib, I. Abaza et R. Naffa, « Criblage de l'activité antiangiogénique des plantes médicinales cultivées et vendues en Jordanie », *Planta Medica* , vol. 78, non. 3, pages 297 à 301, 2012.

- MAHMOUDI Souhilaa , KHALI Mustaphaa et MAHMOUDI Nacérab. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (Cynara scolymus L.) 2012.
- Maria V. Faustinoa,b , Ana M.L. Secab,c , Paulo Silveiraa , Artur M.S. Silvab , Diana C.G.A. Pintob, 2017. Gas chromatography–mass spectrometry profile of four Calendula L. taxa: A comparative analysis.
- Marie Bayart, 2019. Elaboration et caractérisation de biocomposites à base d'acide polylactique et de fibres de lin : Comptabilisation interfaciale par dépôt de revêtements à base d'époxy, de dioxyde de titane, de lignine ou de tanin.
- MC Loi, L. Maxia et A. Maxia, « Comparaison ethnobotanique entre les villages d'Escolca et Lotzorai (sardaigne, Italie) », *Journal of Herbs, Spices, & Medicinal Plants* , vol. 11, non. 3, pages 67 à 84, 2005.
- Medicinal Plants of the World. Volume I: Chemical Constituents, Traditional and Modern Uses. Second Edition By Ivan A. Ross. Humana Press, Totawa, NJ. 2003. xv + 489 pp. 16.5 × 26 cm. ISBN 1-58829-281-9
- Memarpoor-Yazdi M., Mahaki h., Zare-Zardini H. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from Zizyphus jujuba fruits. Journal of Functional Food. 5:62-70.
- Meng L., Yves L., Isabelle B., Emile M. & Bin G. (2009). Polyphenols extraction from eight (*Perilla frutescens)* cultivars. *C.R. Chimie*. **12**:602-11.
- Miladovic, S., Ivekovic, D. et Bozidar, S.G. (2006). A novel amperometric method method for antioxydant activity determination using DPPH free radical. Bioelectrochemistry, 68: 175-180
- Miller, P., Thompson, H., & Clark, E. (2022). *Bioactive Compounds in Calendula arvensis: Potential for Pharmaceutical Development*. Journal of Medicinal Plant Research, 28(2), 101-112.
- Militello, V., Vetri, V., & Leone, M. (2003). Protein denaturation and aggregation: Cellular response to denatured and aggregated proteins. *The Open Biochemistry Journal*, 7(1), 314-325.
- Morad Hebi, Omra Farid, Mohammed Ajebli, Mohamed Eddouks, 2017. Potent antihyperglycemic and hypoglycemic effect of Tamarix articulata Vahl. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats.

- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171. doi:10.1016/S0308-8146(00)00223-5
- Muster, D. (2005). Médicaments de l'inflammation. EMC - Stomatologie, 1(1), 21-29. https://doi.org/10.1016/j.emcsto.2005.01.005

N

- N. Abutaha, FA Nasr, A.-Z. Mohammed, A. Semlali, FA Al-Mekhlafi et MA Wadaan, « Calendula arvensis L. comme agent anticancéreux contre les lignées cellulaires du cancer du sein », *Molecular Biology Reports* , vol. 46, non. 2, pages 2187 à 2196, 2019.
- N. Chaachouay, O. Benkhnigue, M. Fadli, H. El Ibaoui et L. Zidane, « Etudes ethnobotaniques et ethnopharmacologiques des plantes médicinales et aromatiques utilisées dans le traitement des maladies métaboliques dans le Rif marocain », *Heliyon* , vol. 5, non. 10, numéro d'article e02191, 2019.
- N. El Hachlafi, A. Chebat, R. Soulaymani Bencheikh et K. Fikri-Benbrahim, « Etude ethnopharmacologique des plantes médicinales utilisées pour le traitement des maladies chroniques dans la région de Rabat-Salé-Kénitra (Maroc) », *Recherche et applications en ethnobotanique* , vol . 20, p. 1 à 23, 2020.
- N. Mascolo, G. Autore, F. Capasso, A. Menghini et MP Fasulo, « Criblage biologique des plantes médicinales italiennes pour leur activité anti-inflammatoire », *Recherche en phytothérapie* , vol. 1, non. 1, p. 28-31, 1987.
- N. Moujahed1 , C. Darej, M. Taghouti, Y. Bouaziz, Ch. Ben Mustapha and Ch. Kayouli, 2013. Chemical composition and in vitro fermentation characteristics of range species growing in Central Tunisia. pages 121-125
- Naveed S., Khattak I., Marwat KB Étude ethnomédicale des mauvaises herbes dans les champs de maïs, de riz et de tabac du district de Tehsil Razzar Swabi au Pakistan. *Journal pakistanais de recherche sur la science des mauvaises herbes* . 2019 ; 25 (2) : 91-109.
- Nitsch J.P. & Nitsch C. (1961).Synergistes naturels des auxines et des gibbérellines. *Bull. Soc.Fr*. **26**: 2237-40.

O

- O. Boussaada *et al.* (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des composants volatils des capitules et des parties aériennes de Rhaponticum acaule DC poussant à l'état sauvage en Tunisie. Recherche microbiologique

P

- Paolini, J., Smith, A., & Jones, B. (2010). *Flowering patterns and leaf morphology of Calendula arvensis*. International Journal of Plant Sciences, 178(2), 101-109.
- Packer, L., Weber, S. U., & Rimbach, G. (Eds.). (2000). *Molecular aspects of antioxidant defense*. Springer Science & Business Media.
- Pastre, J. O. C. (2005). Role of trace elements as antioxidant cofactors. In G. T. Richard (Ed.), *Antioxidant Mechanisms* (pp. 112-125). Academic Press.
- pharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics
- Pietro Andrea Mattioli, 1554. *De Materia Medica*. Diverses éditions et traductions disponibles, notamment en italien et en latin.

R

- R. Belabbes, MEA Dib, N. Djabou et al., « Variabilité chimique, activités antioxydantes et antifongiques des huiles essentielles et extrait hydrolat de Calendula arvensis L. de l'ouest algérien », *Chimie et Biodiversité* , vol. 14, non. 5, numéro d'article e1600482, 2017.
- Rajamanikandan, S., Sindhu, T., & Durgapriya, D. (2011). Evaluation of hydroxyl radical scavenging activity of phenolic extracts from flowers and leaves of Calendula arvensis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(4), 56-61.
- R. Elias et MD Meo, « Vidal-Ollivier, M. Laget, G. Balansard et G. Dumenil : « Activité antimutagène de certaines saponines isolées de Calendula officinalis L., C. arvensis L. et Hedera helix L », *Mutagenèse* , vol. 5, non. 4, pages 327 à 332, 1990.
- R. Rosales. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. Thèse de doctorat. Kansas State University. (1999). pp. 400.
- Ross, I. A. (2003). *Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*. Humana Press.
- R. Ullah, M. Ibrar, S. Shah et I. Hameed, « Activités phytotoxiques, cytotoxiques et insecticides de Calendula arvensis L », *J Biotechnol Pharm Res* , vol. 3, p. 104-111, 2012.
- Ragonese R, Macka M, Hughes J and Petocz P (2002) The use of the Box–Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis

method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 27:995-1007

- 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. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Rejsková, A., Brom, J., Pokorn ˇ y, J., Kore ´ cko, J., 2010. Temperature distribution in light- ˇ coloured flowers and inflorescences of early spring temperate species measured by infrared camera. Flora—Morphol. Distr. Func. Ecol. Plants 205, 282–289
- Reza Habibi a , Mehrnoosh Tadayoni a,* , Hossein Mohammadpour b. 2024. Evaluation of the functional properties of ethanolic and polysaccharide extracts of Spirulina platensis.
- Ribéreau-Gayon P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Paris : Dunod.173-201p.
- Rignanese l.,1763. Calendula arvensis Plant profile in Schede di botanica.Wikipidia/www.com.
- Ruiz De Clavijo, E. (2005). *Botanical characteristics of Calendula arvensis*. Journal of Botanical Research, 22(4), 315-320.

S

- S. Aslan, H. Akan et H. Pekmez, « Yaslıca beldesi ve Arıkök mahallesi (Şanlıurfa)'nin etnobotanik açıdan araştırılması », Diversité biologique *et conservation* , vol. 13, non. 1, p. 44-61, 2020.
- S. Jokić, D. Velić, M. Bilić, A. Bucić-Kojić, M. Plan inić and S. Tomas. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. J. Food Sci. vol. 28. (2010). pp. 206- 212
- S. Naveed, I. Khattak et KB Marwat, « Étude ethnomédicale des mauvaises herbes dans les champs de maïs, de riz et de tabac du district de Tehsil Razzar Swabi Pakistan », *Pakistan Journal of Weed Science Research* , vol. 25, non. 2, p. 91-109, 2019.
- Santos, E. L., Maia, B. H. L. N. S., Ferriani, A. P., & Teixeira, S. D. (2017). *Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology. Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health.* doi:10.5772/67861

- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883. Cet article examine les propriétés antimicrobiennes des tanins et leur rôle potentiel dans la protection des plantes contre les pathogènes.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45(4), 287-306.
- Schwartz K. (2011). Inflammation et maladies: clés de compréhension. Mission Inserm Associations-Marseille, 6-7.
- Sebai Mohammed, Boudali Mohammed. 2009/2012. la phytothérapie entre la confiance et méfiance, mémoire professionnelle Institut de formation paramédical CHETTIA. Alger. P 11
- Sher H., Al_yemeni M. Communautés végétales économiquement et écologiquement importantes dans la forêt de conifères de haute altitude de Malam Jabba, Swat, Pakistan. *Journal saoudien des sciences biologiques* . 2011 ; 18 (1):53-61. est ce que je: 10.1016/j.sjbs.2010.09.002.
- Siddique A., Akhtar N., Khan MS, Anwar M., Jan S., Khan WM Diversité, distribution et utilisations autochtones des plantes médicinales du district de Karak, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Journal pakistanais de recherche sur la science des mauvaises herbes* . 2016 ; 12 (2) : 317-327.
- Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hraš A. R., Simonič M., and Knez, Ž. (2005). "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities." Food Chemistry, 89(2), 191-1.
- Souaga, K., Adou, A., Amantchi, D., & Angoh, Y. (1998). Plaidoyer pour une utilisation raisonnée des anti-inflammatoires en odonto-stomatologie. Odontostomatol Trop, 21, 16–21
- Spigno G., Tramelli L. & De Faveri D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food*
- Stöckigt J, Sheludko Y, Unger M, Gerasimenko I, Warzecha H, Stöckigt D (2002) High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups, Journal of chromatography A, 967, 85-113.

- SUIS. Abudunia, I. Marmouzi, MEA Faouzi et al., « Activités anticandidales, antibactériennes, cytotoxiques et antioxydantes des fleurs de Calendula arvensis », *Journal de Mycologie Médicale* , vol. 27, non. 1, p. 90-97, 2017.
- Sultane, K. ; Jayathilakan, K. ; Pandey, MC Évaluation de l'activité antioxydante, de l'élimination des radicaux et du pouvoir réducteur de l'huile de clou de girofle et de l'oléorésine de clou de girofle en comparaison avec les antioxydants naturels et synthétiques du chevron (Capra aegagrus hircus) et de la viande de poulet. *Déf. Sciences de la vie. J.* **2017** , *3* , 51.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4267-4274.

T

- T. Ercetin, FS Senol, I. Erdogan Orhan et G. Toker, « Évaluation comparative des propriétés antioxydantes et inhibitrices de la cholinestérase des extraits de souci de Calendula arvensis L. et Calendula officinalis L », *Cultures et produits industriels* , vol. 36, non. 1, pages 203 à 208, 2012.
- Talbi, S., Nef, M., & Hammouti, B. (2015). Use of DPPH method for determining the antioxidant activity of Calendula arvensis extracts. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, 3(2), 45-52.
- T.Iwashina, Serguie Smirnov, O.Damdinsuren, K.Kondo. 2012, Flavonoïdes de Reaumuria Soongarica (Tamaricacees) en mongolie.
- Tandon V.K., Hardesh K., Maurya A., Nripendra N., Mishra B. & Praveen K.S.(2009). Conception, synthese et evaluation biologique de nouvelle hetero -1,4- naphtoquinones contenant de l'azote et de sufre en tant qu'agents antifongique et antibacteriens puissant**.**
- Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M. & El-Elimat T. (2007).Antioxidant the Prevention of Diseases,CriticalReviews in Food Science and Nutrition. p45, 287-
- Tugba Ercetina, Fatma Sezer Senol b, Ilkay Erdogan Orhanb,c,∗, Gulnur Toker b 2012. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from Calendula arvensis L. and Calendula officinalis L
- Tung, Y. T., Wu, J. H., Kuo, Y. H., & Chang, S. T. (2007). Antioxidant activities of natural phenolic compounds from Acacia confusa bark. *Bioresource Technology*, 98(5), 1120-1123. doi:10.1016/j.biortech.2006.04.020

U

- U.D. Chavan, F. Shahidi and M. Naczk. Extraction of condensed tannins from beach pea (Lathyrus maritimus L.) as affected by different solvents. J. Food Chem. Vol. 75. (2001). pp. 509-512

V

- Vane, J. R., & Botting, R. M. (2003). The mechanism of action of aspirin. Thrombosis Research, 110(5-6), 255-258.
- Vansant, G. (2004). Antioxidants: Definitions, sources, protection. *European Journal of Nutrition*, 43(Suppl 2), II2-II3.
- Vivas N., De Gaulejac N.V. & Nonier M.F. (2003).Sur l'estimation et la quantification des composés phénoliques des vins. Estimation and quantification of wine phenolic compounds.

W

- W. Blumenthal, W. R. Busse, A. Goldberg, T. Gruenwald, J. Hall, C. Riggins, R. S. Rister. 1998. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. American Botanical Council 112-113
- Weill, B., Batteux, F. & Dhainaut, J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), 12-23.
- Wichtl M. & Anton R. (2003). Plantes therapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.

Z

- Z. Hellal, « Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus). », Thesis, Université Mouloud Mammeri, 2011.

Annexe

Annexe I : Préparation des solutions

Solution	**La préparation**
Solution ABTS	38,8 mg d'ABTS + 6,8 mg de persulfate de potassium, mélangé avec 10ml d'eau distille, ensuite une agitation pendant la nuit à l'obscurité. Un volume de 500ul de la solution mère d'ABTS est dilué dans 40 ml d'éthanol pour avoir une absorbance de 0,7±0,02.
Solution DPPH	Une quantité de 4 mg de poudre de DPPH est dissoute dans 100ml de méthanol.
Solution Tampon Tris-Hcl 0,05M a ph=6,6	1g de Tris est dissous dans 200ml d'eau distille et le ph par la suite est ajuste avec Hcl pour avoir un ph=6,6
Solution BSA a 0,5%	Une masse de 0,25g de poudre de BSA est ajoute a 50ml de tampon Tris-Hcl.
Salicylate de sodium 20 mM	Une quantité de 32,022mg de poudre de salicylate de sodium est mélangé avec 10ml d'eau distille.
$FeSO_4$ a 1,5 mM	8,3403mg de la poudre $FeSO_4$ est dissoute dans 20ml d'eau distille.
Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 30%	Un volume de 10,203 ul de solution H_2O_2 (6Mm) est mélangé avec 15ml d'eau distille.
Solution BHT	On pèse 10mg de poudre BHT est mélangé avec 10ml de méthanol
Acide Ascorbique	10mg d'acide ascorbique est dissoute dans 10ml de méthanol
Chlorure d'aluminium $AlCl_3$ 0,2%	2g d'$AlCl_3$, $6H_2O$ est mélangé avec 100ml de méthanol
Trolox (1mg/ml)	5,4mg de trolox est mélangé avec 5400ul d'éthanol
Solution vanilline 4%	4g de vanilline dans 100ml de méthanol
Carbonat de sodium $NaCO_3$ (7,5%)	7,5 g de carbonat de sodium est dissoute dans 100ml d'eau distille.
Acétate de sodium 5%	5g de poudre est mélangé avec 100ml d'éthanol
HCL (37%)	36,46mg de Hcl est dissoute dans 100ml d'eau distille

Annexe II : les courbes d'étalonnage

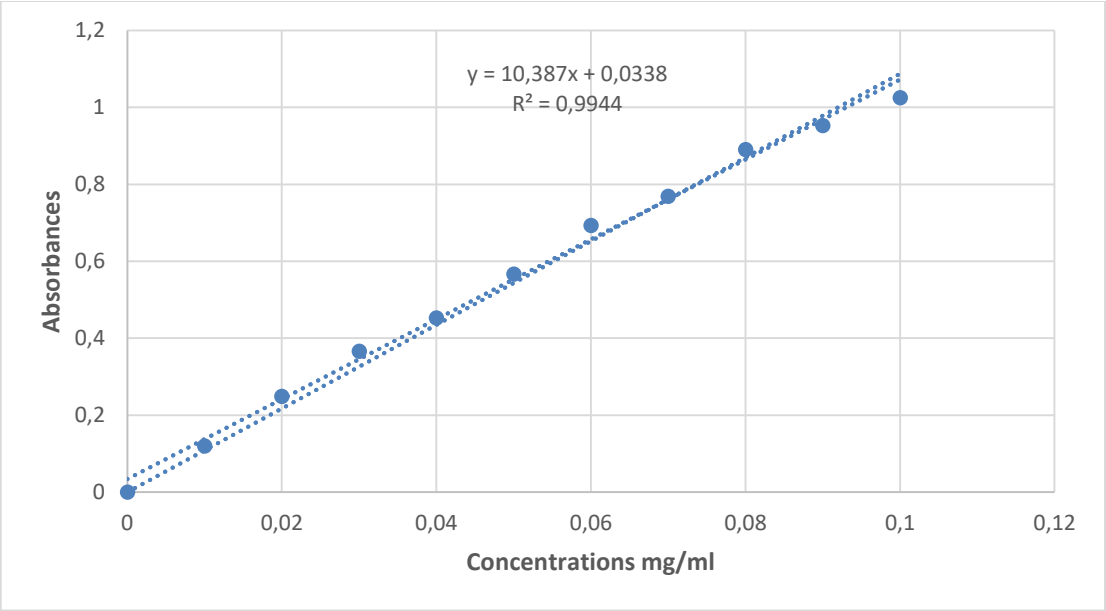


Figure1 : Courbe d'étalonnage acide gallique

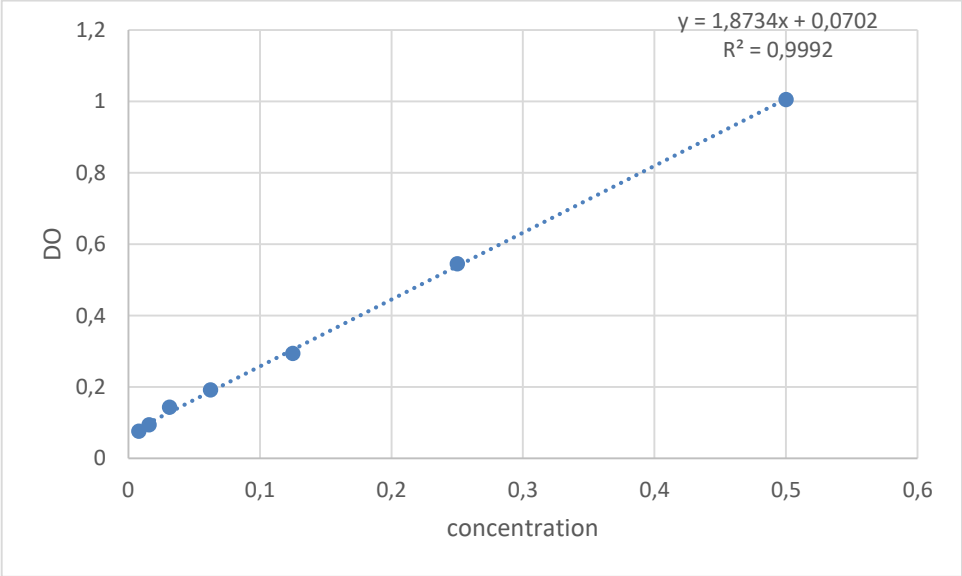


Figure 2 : courbe d'étalonnage quercétine (flavonoïdes)

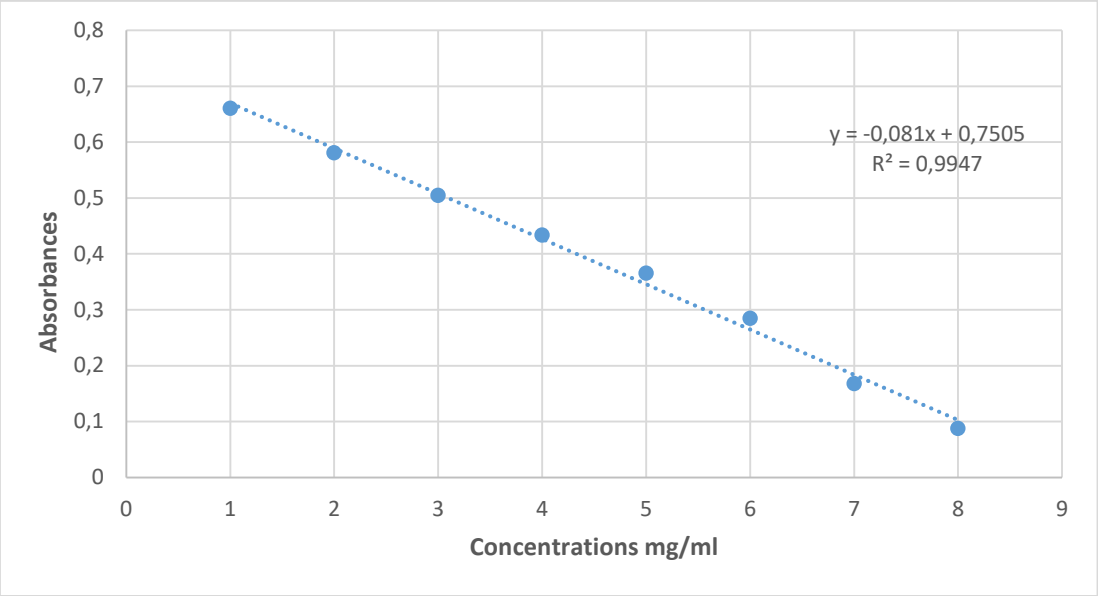


Figure3 : courbe d'étalonnage Trolox

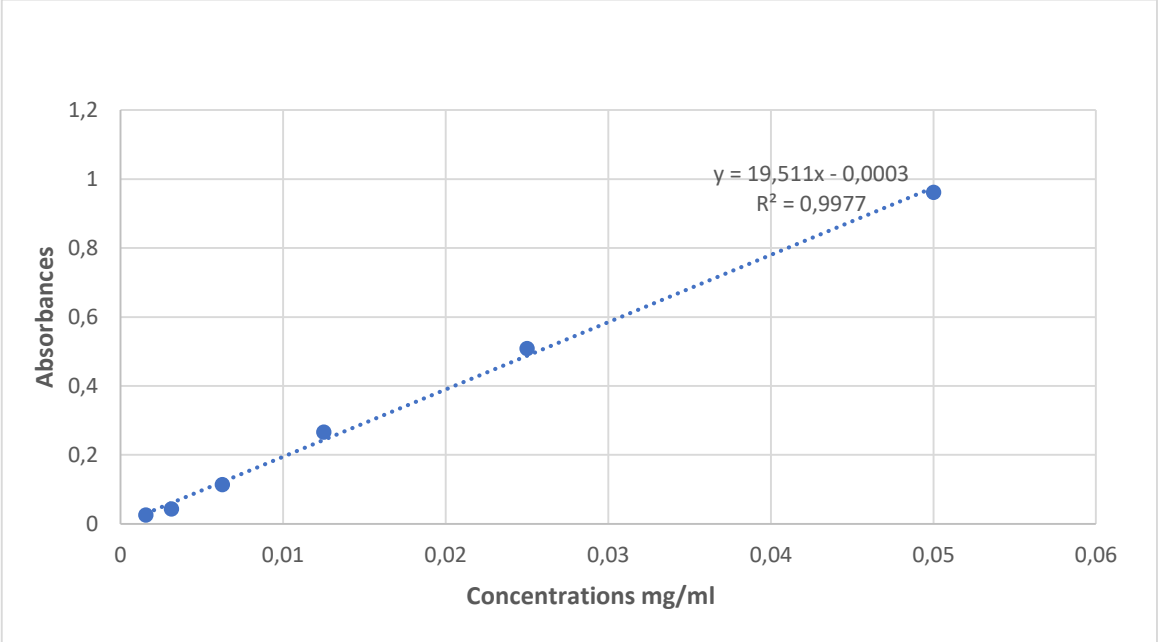


Figure4 : Courbe d'étalonnage quercétine

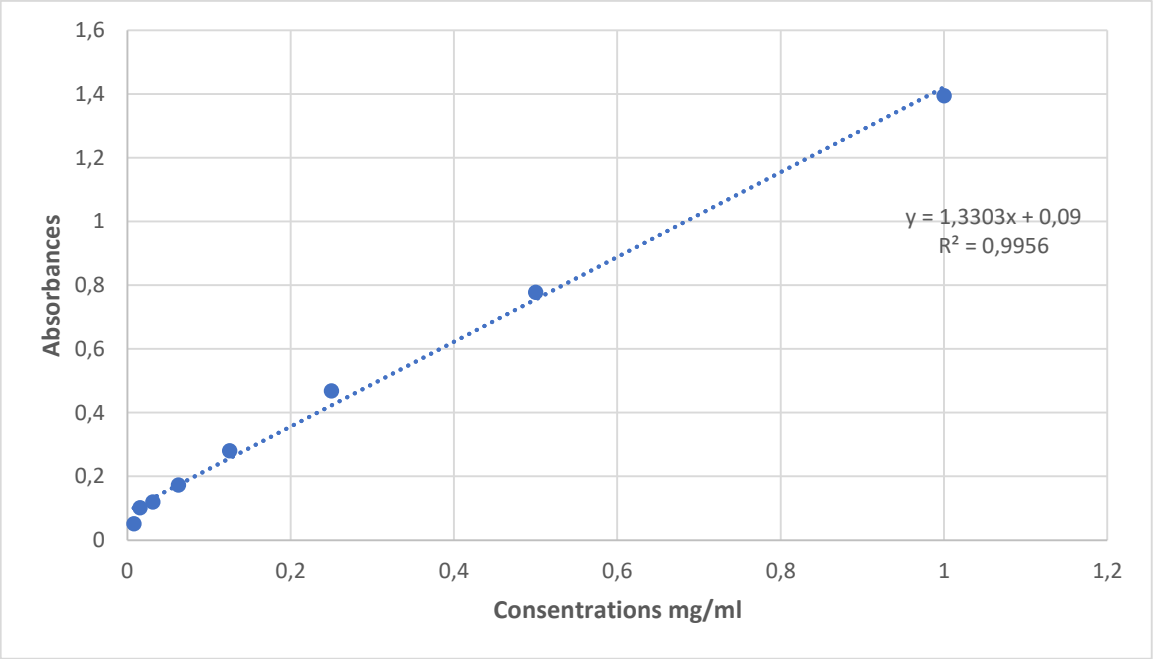


Figure 5 : Courbe d'étalonnage catéchine**.**

Annexe III : **les résultats statistiques**

Test LSD ; variable PTS (Feuille de données3)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = ,06576, dl = 4,0000

extrait	PTS Moy.	1	2
Feuille	19,02956	****	
Fleur	46,87783		****

Figure 1 : Analyses statistique des composés phénolique totaux des extraits de *Calendula arvensis*

Test LSD ; variable Flavonoide (Feuille de données3)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = 1,2352, dl = 4,0000

extrait	Flavonoide Moy.	1	2
Feuille	46,4076	****	
Fleur	104,7721		****

Figure 2 : Analyse statistique des flavonoïdes des extraits de *Calendula arvensis*

Test LSD ; variable Flavonol (Feuille de données3)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = ,02450, dl = 4,0000

extrait	Flavonol Moy.	1	2
Feuille	3,601558	****	
Fleur	6,687168		****

Figure 3 : analyse statistique de dosages des flavonol

Test LSD ; variable Tanin C (Feuille de données3)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = ,17238, dl = 4,0000

extrait	Tanin C Moy.	1	2
Fleur	1,593625	****	
Feuille	6,815505		****

Figure 4 : Analyse statistique de dosage des tanins condensés

Test LSD ; variable DPPH (Feuille de données1)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000 (Recherche Non-Exhaustive)
Erreur : MC Inter = ,69919, dl = 40,000

extrait	DPPH Moy.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
fl1	14,03359	****													
fe1	14,45242	****													
AS1	14,54178	****													
BHT1	15,22109	****													
BHT2	23,63946		****												
fl2	29,31967			****											
fe2	30,96948				****										
AS2	35,24140					****									
BHT3	40,44785						****								
fl3	56,67521							****							
fe3	58,40814								****						
BHT4	65,84467									****					
fe4	71,90305										****				
fl4	76,40194											****			
fe5	80,90963												****		
BHT5	81,68934												****		
fl5	83,57529													****	
AS3	84,21509													****	
AS4	97,10899														****
AS5	97,22463														****

Figure 5 : analyse statistique de DPPH avec les deux standards.

Test LSD ; variable ic DPPH (IC50.sta)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = 18,571, dl = 8,0000

extrait	ic DPPH Moy.	1	2	3
as3	155,0232		****	
fl2	232,0542	****		
fe1	237,1476	****		
bht4	300,3651			****

Figure 6 : analyse statistique des IC50 de test DPPH

Test LSD ; variable ABTS (Feuille de données1)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000 (Recherche Non-Exhaustive)
Erreur : MC Inter = 3,3113, dl = 40,000

extrait	ABTS Moy.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
AS1	8,76289	****													
fe1	19,07187		****												
fe2	25,45885			****											
BHT1	29,23977				****										
fl1	35,72154					****									
AS2	37,55352					****									
BHT2	42,20183						****								
fl2	48,15935							****							
AS3	52,28426								****						
fe3	57,53425									****					
fl3	59,96885									****	****				
BHT3	61,67558										****				
AS4	68,23105											****			
fl4	69,41176											****			
fe4	77,88725												****		
BHT4	78,65297												****		
BHT5	84,85895													****	
AS5	87,76371													****	****
fe5	89,92999														****
fl5	90,52739														****

Figure 7 : analyse statistique d'ABTS des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* avec les deux standards

Test LSD ; variable ic ABTS (IC50.sta)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = 111,46, dl = 8,0000

extrait	ic ABTS Moy.	1	2	3	4
fl2	141,2761	****			
bht4	161,3780		****		
fe1	218,2233			****	
as3	241,7179				****

Figure 8 : analyse statistique des IC50 d'ABTS

Test LSD ; variable OH (Feuille de données1)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000 (Recherche Non-Exhaustive)
Erreur : MC Inter = 2,8365, dl = 40,000

extrait	OH Moy.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
fl1	21,11872	****											
fl2	29,94519		****										
AS1	31,54762		****										
BHT1	32,21523		****										
fe1	37,18638			****									
AS2	38,99371			****									
BHT3	49,27335				****								
BHT2	49,75542				****	****							
AS3	50,08726				****	****							
fl3	52,34018					****	****						
fe2	53,05410						****						
fe3	56,30970							****					
BHT4	57,65063							****					
fe4	61,85522								****				
fl4	62,67123								****				
AS4	72,04161									****			
fe5	84,75858										****		
fl5	87,61416											****	
BHT5	88,83072											****	
AS5	92,09184												****

Figure 9 : analyse statistique de radical OH des extraits de *Calendula arvensis* avec les deux standards

Test LSD ; variable IC OH (IC50.sta)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = 43,305, dl = 8,0000

extrait	IC OH Moy.	1	2	3
fe1	140,6075		****	
bht4	181,9129	****		
as3	182,8205	****		
fl2	242,4172			****

Figure 10 : analyse statistique des valeurs IC50 de radical OH

Test LSD ; variable BSA (Feuille de données1)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000 (Recherche Non-Exhaustive)
Erreur : MC Inter = 8,8070, dl = 30,000

extrait	BSA Moy.	1	2	3	4	5	6	7	8
fl1	20,13536	****							
co1	23,79845	****	****						
fl2	26,31134		****						
fe1	38,24027			****					
fe2	40,88409			****					
co2	46,31783				****				
fl3	46,80626				****				
fe3	47,84264				****				
fe4	55,37225					****			
fl4	59,51777					****			
fl5	69,01438						****		
fe5	73,35025						****	****	
co3	75,00000							****	
co4	94,39922								****
co5	98,19767								****

Figure 11 : analyse statistique de BSA des feuilles et fleurs de *Calendula arvensis* avec diclofinac

Test LSD ; variable IC50 (Feuille de données6)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = 60,476, dl = 6,0000

extrait	IC50 Moy.	1	2	3
dic3	134,8073	****		
fe1	240,2734		****	
fl2	290,7882			****

Figure 12 : analyse statistique d'IC50 de BSA

Test LSD ; variable celebrex (Feuille de données3)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = 3,0960, dl = 8,0000

concentration	celebrex Moy.	1	2	3	4
c1	17,08428	****			
c2	31,01746		****		
c3	47,53227			****	
c4	54,32802				****

Figure 13: analyse statistique celebrex

Test LSD ; variable IC50 (Feuille de données6)
Groupes Homogènes, alpha = ,05000
Erreur : MC Inter = 225,96, dl = 6,0000

extrait	IC50 Moy.	1	2	3
fe1	240,2734	****		
fl2	290,7882		****	
cel3	348,4898			****

Figure 14 : valeurs IC50 Ovalbumine

Résumé

Les résultats préliminaires de l'étude sur la *Calendula arvensis* en Algérie révèlent une richesse remarquable en métabolites bioactifs, notamment les polyphénols et les flavonoïdes, dans les extraits aqueux des fleurs et des feuilles. Ces composés phytochimiques sont connus pour leur potentiel antioxydant, mis en évidence par les tests ABTS, DPPH et OH. Les fleurs montrent particulièrement des pourcentages élevés d'inhibition des radicaux libres, indiquant une capacité significative à neutraliser les dommages oxydatifs. De plus, l'étude explore l'activité anti-inflammatoire des extraits à travers le test de dénaturation de deux protéines, BSA et ovalbumine. Les résultats suggèrent que les extraits aqueux, en particulier ceux des fleurs, offrent une protection notable contre la dénaturation des protéines, soulignant leur potentiel dans le traitement des processus inflammatoires. L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques, incluant le temps, la fréquence et la durée d'extraction, a joué un rôle crucial dans l'amplification des propriétés bioactives des extraits. Cette approche méthodologique permet de maximiser la concentration des polyphénols et flavonoïdes, renforçant ainsi leur activité antioxydant et anti-inflammatoire. En conclusion, cette recherche met en lumière non seulement la diversité végétale de l'Algérie à travers la *Calendula arvensis*, mais aussi son potentiel en tant que source naturelle prometteuse de composés bioactifs bénéfiques pour la santé humaine, justifiant ainsi la poursuite des investigations pour une application éventuelle en médecine et en nutrition.

Abstract :

The preliminary results of the study on *Calendula arvensis* in Algeria reveal a remarkable richness in bioactive metabolites, particularly polyphenols and flavonoids, in the aqueous extracts of the flowers and leaves. These phytochemical compounds are known for their antioxidant potential, as evidenced by the ABTS, DPPH, and OH tests. The flowers, in particular, show high percentages of free radical inhibition, indicating a significant capacity to neutralize oxidative damage. Furthermore, the study explores the anti-inflammatory activity of the extracts through the protein denaturation test using BSA and ovalbumin. The results suggest that the aqueous extracts, especially those from the flowers, offer notable protection against protein denaturation, highlighting their potential in treating inflammatory processes. The optimization of extraction conditions for phenolic compounds, including time, frequency, and duration of extraction, played a crucial role in amplifying the bioactive properties of the extracts. This methodological approach allows for maximizing the concentration of polyphenols and flavonoids, thereby enhancing their antioxidant and anti-inflammatory activities. In conclusion, this research not only highlights the plant diversity of Algeria through *Calendula arvensis* but also its potential as a promising natural source of bioactive compounds beneficial for human health, thereby justifying further investigations for possible applications in medicine and nutrition.