



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Végétale et Environnement

Option : Biodiversité et gestion des écosystèmes.

Intitulé

**Propriétés phytochimiques et pharmacologiques de deux Plantes
Médicinales du Nord-est d'Algérie : *Calendula suffruticosa subsp
suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L.**

Présenté par : M^{elle} SOFIANE Ismahene.

Membres du Jury :

ALI AHMED Mounia	(Professeure)	Présidente	Université d'Annaba
SERIDI Ratiba	(Professeure)	Promotrice	Université d'Annaba
NASRI Hicham	(Professeur)	Examinateur	Université d'El Tarf
LAREDJ Hacène	(Professeur)	Examinateur	Université d'Annaba
BOUCHELAGHEM Sabrina	(MCA)	Examinatrice	Université d'El Tarf
HAMEL Tarek	(MCA)	Examinateur	Université d'Annaba

Année universitaire : 2017/2018

Avant-propos

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont été menées grâce la contribution de ces laboratoires :

- Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, Université Badji Mokhtar (Annaba, Algérie).
- Laboratoire de Toxicologie et Pharmacologie, Centre de Recherche et de Développement-SAIDAL (Alger, Algérie).
- Laboratoire de Chimie Analytique, Centre de Recherche et de Développement-SAIDAL (Alger, Algérie).
- Laboratoire de Pharmacognosie, Facultat de Farmacia, Univaersitat de Valencia (Valence, Espagne).
- Laboratoire de Mass Spectrometry, l'Institut de Technologie Chimique (ITQ) Valencia (Espagne).

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement ma directrice de thèse Mme **SERIDI Ratiba**, Professeure à l'Université Badji Mokhtar (Annaba- Algérie), pour m'avoir fait l'honneur d'accepté de diriger ce travail avec gentillesse et bienveillance et par la disponibilité de son temps précieux. Ainsi que pour son aide, ses conseils au long de ces années et sa rigueur scientifique.*

Je remercie les membres du jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail en espérant être à la hauteur de leur confiance.

*J'exprime toute ma gratitude à Monsieur **Pr ALI AHMED Mounia**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar (Annaba- Algérie). Président du jury, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury de ma soutenance de thèse malgré ses multiples obligations.*

*Je m'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **NASRI Hichem**, Professeur à l'Université Chadli Bendjedid (El Tarf- Algérie), et Mme **BOUCHELAGHAM Sabrina**, Maître de conférence Classe A, à l'Université Chadli Bendjedid (El Tarf- Algérie), pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs et de participer à mon jury de thèse et surtout pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce manuscrit.*

*Je tiens aussi à remercier, Monsieur **LAREDJ Hocine**, Professeur à Badji Mokhtar (Annaba- Algérie). Pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce travail.*

*Je remercie également Monsieur **HAMEL Tarek**, Maître de conférence Classe A, à l'Université Badji Mokhtar (Annaba- Algérie), d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail. Qu'elle trouve l'expression de toute ma gratitude.*

*Je remercie aussi particulièrement Monsieur **TAHAR Ali**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar (Annaba- Algérie). Pour son aide dans l'étude statistique de ce travail, et de me avoir fait bénéficier de sa grande expérience en analyses statistiques et de ses multiples conseils.*

*Mes vifs remerciements vont à **Mr Diego CORTES MARTINEZ**, Professeur en Pharmacologie (Université de Valence, Espagne) qui a accepté de m'accueillir dans son Laboratoire et qui a pris toutes les dispositions pour que mon stage se déroule dans les meilleures conditions. Je lui suis reconnaissante de m'avoir accompagnée dans l'étude phytochimique de ce travail, ses précieux conseils, son aide, son soutien et sa confiance.*

Remerciements

*Mes vifs remerciements vont à Mme **CABEDO ESCRIG Nuria** (Chercheur à l'INCLIVA), pour ses précieux conseils, son aide, son soutien, son amitié et sa précieuse disponibilité durant la réalisation de mon stage. Sans sa collaboration efficace, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour. Qu'elle trouve toute ma gratitude.*

*Je voudrais exprimer ma reconnaissance aux personnes avec lesquelles j'ai eu le plaisir de travailler durant mon stage à CRD-SAIDAL Alger, en particulier Mme **AZIN Kenza** pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son Laboratoire de Toxicologie et Pharmacologie, pour ses enseignements qui m'ont permis d'obtenir et approfondir les résultats pharmacologiques de ce travail. Je remercie aussi Mme **BOUBKER Sihem** du Laboratoire de Chimie Analytique pour son aide, ses conseils précieux dans le domaine de la chimie, son soutien, son amitié et les encouragements qu'elle a su me donner.*

*Je voudrais aussi remercier Dr **HAMEL Tarek** docteur à l'Université Badji Mokhtar –Annaba pour leur contribution à l'identification botanique des espèces végétales. Et Mr **HEMAIDI Sofiane** pour son aide efficace lors des sorties des récoltes.*

Mes remerciements aussi à tous les membres du Département de Biologie et tous mes enseignants. Un grand merci aussi à mes collègues et amis du laboratoire (LBVE), pour leur aide et leur sympathie durant la réalisation du travail au laboratoire.

*Une pensée très spéciale pour ma famille qui m'a toujours encouragée, ils ont toujours été là pour moi sans faille. Et surtout mes oncles **SEFIANE Khelil** et **SEFIANE Wahid** et ma tante **BOUMALI Sameh**, je les remercie de tout mon cœur. J'exprime toute ma reconnaissance à ma tante Mme **SEFIANE Wadad**, qui m'a été d'une aide précieuse lors de la correction de ce travail.*

*Ainsi qu'un grand merci à la famille **Vila Dasi** pour leur soutien lors de mon voyage en Espagne.*

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

A ma chère maman

Modèle de tendresse et d'amour, qui s'est sacrifié pour notre bien être

Je te remercie pour tes encouragements incessants, pour ton amour et ma profonde gratitude.

A mon cher père

Qui a déployé beaucoup d'effort pour me voir réussir. Je te remercie pour ton soutien durant toute ma vie, Pour tes sacrifices et pour ton amour.

J'espère que ce travail sera à l' hauteur de l'espoir que vous avez fondé au moi.

Ismahene

Abréviations

Liste des Abréviations

AlCl₃	Chlorure d'aluminium.
BHA	Butylated hydroxyanisole.
BHT	Butylated hydroxytoluene.
°C	Degré Celsius.
CaCO₃	Calcaire.
<i>C. arvensis</i>	<i>Calendula arvensis</i> .
CC	Chromatographie sur colonne ouverte.
CCM	Chromatographie sur couche mince.
CD₃OD	Méthanol deutéré.
CDCl₃	Chloroforme deutéré.
CHCl₃	Chloroforme.
CH₂Cl₂	Dichlorométhane.
C₂H₅OH	Ethanol.
CH₃CL₃	Chloroforme.
CH₃COOH	Acide acétique glacial.
CLHP	Chromatographie liquide haute performance.
<i>C. officinalis</i>	<i>Calendula officinalis</i> .
cm	Centimètre.
CRD	Centre de Recherche et de Développement.
<i>C. suffruticosa</i>	<i>Calendula suffruticosa</i> .
d	Doublet.
dd	Doublet dédoublé.
DPPH	2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.
EEC	Extrait éthanolique de <i>Calendula suffruticosa</i> .
EEF	Extrait éthanolique de <i>Fumaria capreolata</i> .
<i>et al.,</i>	Et autres auteurs
Fe²⁺	Ions ferreux
Fe³⁺	Ions ferriques
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
h	Heure.
H	Humidité
H₂O₂	L'eau oxygénée.
H₂SO₄	Acide sulfurique.

Liste des Abréviations

HCl	Acide chlorhydrique
g	Gramme.
K₂Cr₂O₇	Bichromate de Potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
MeOH	Méthanol.
min	Minute.
ml	Millilitre.
mm	Millimètre.
N	Normale.
NaOH	Hydroxyde de sodium.
pH	Potentiel d'hydrogène.
Rf	Rapport frontal (CCM)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN-1H	Résonance magnétique nucléaire du proton
s	Singulet
t	Triplet
tqd	Triplet de quadruplet
tR	Temps de rétention
UV	Ultraviolet
μl	Microlitre
μM	Micromole
UV	Ultra-violet.
V	Volume
V/V	Volume par volume
%	Pourcentage
Hz	Hertz
J	Constante de couplage exprimée en Hz
m/z	Masse/charge d'un ion
ppm	Partie par million
δ	Déplacement chimique exprimé en ppm
λ max	Longueur d'onde d'absorption maximale

Liste des figures

Numéro	Figure	Page
01	Répartition géographique de la famille des Papavéracées dans le monde selon (Stevens, 2001).	03
02	Répartition géographique de la sous-famille des Fumarioideae dans le monde (en rouge) selon (Stevens, 2001).	04
03	Répartition géographique de la famille des Astéracées dans le monde selon (Stevens, 2001).	07
04	Les principaux alcaloïdes contenus dans les espèces du genre <i>Fumaria</i> . (Suau <i>et al.</i> , 2002).	17
05	Quelques alcaloïdes contenus dans l'espèce <i>Fumaria capreolata</i> . (Suau <i>et al.</i> , 2002).	17
06	Saponines triterpéniques isolés à partir de <i>C. arvensis</i> (Kirmizibekmez <i>et al.</i> , 2006).	24
07	Les structures de certains flavonols et flavonoïdes dans les fleurs de souci (Albulescu <i>et al.</i> , 2004).	26
08	Morphologie des 2 espèces. (A) Aspect général de <i>Fumaria capreolata</i> L. (B) : fleur, (C) : feuille, (D) : fruit et graine, [G : X4]. (E) : Aspect général de <i>Calendula suffruticosa</i> Vahl (F): fleur. (G): feuille, (H) : graine, [G : X4].	27
09	Localisation géographique de la région de récolte des deux espèces étudiés (Hani <i>et al.</i> , 1997).	29
10	Vues spatiales de la grotte du cap de garde et du cap de fer.	30
11	Séchage des plantes.	31
12	Schéma des différentes étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce <i>Calendula suffruticosa</i> Vahl.	33
13	Schéma des différentes étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce <i>Fumaria capreolata</i> L.	34
14	Schéma des différentes étapes de traitement et fractionnement de l'extrait éthanolique de <i>Fumaria capreolata</i> L.	37
15	Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl-1 picryl-hydrazyl) (Congo, 2012).	43
16	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le	45

	complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH) (Djahra, 2013).	
17	Gavage oral des extraits de <i>F. capreolata</i> et <i>C. suffruticosa</i> .	47
18	Lotissement des souris (a et b), Administration orale des extraits (c).	50
19	Injection sub-plantaire de la carragénine.	51
20	Mesure du diamètre de l'œdème à l'aide d'un pied de coulisse digital.	51
21	Administration orale des solutions de traitement (a), injection intrapéritonéale de l'acide acétique (b).	53
22	Comptage de nombre des crampes.	54
23	Coupe transversale de la tige : (A) : <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal. (B) : <i>Fumaria capreolata</i> L.	58
24	Coupe transversale de la tige de <i>C.suffruticosa</i> . (D) : cuticule (C), épiderme (E), Parenchyme médullaire (Pm). (E) : (Parenchyme a méats (Pam), méats (M). (F) : Poil Tecteur (Pt), (G) : Poil Sécréteur (Ps).	59
25	Coupe transversale de la tige de <i>F.capreolata</i> . (H) : cuticule (C), épiderme (E), Parenchyme médullaire (Pm). (I) : Parenchyme à méats (Pam).	59
26	(J) : Les faisceaux conducteurs dans la tige de <i>Fumaria capreolata</i> . Phloème primaire (PHI), xylème primaire (XI), Phloème secondaire (PHII), xylème secondaire (XII), Cambium(Cm), Parenchyme médullaire (Pm), Collenchyme, (CI). (K) : Les faisceaux conducteurs dans la tige de <i>Calendula suffruticosa</i> . Xylème primaire (XI), Phloème secondaire (PHII), xylème secondaire (XII),: Parenchyme médullaire (Pm), Sclérenchyme (SCI).	60
27	Coupe transversale de la feuille. (A) : <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal, (B) : <i>Fumaria capreolata</i> L. (Cu) : Cuticule, (E) : épiderme, (P) : Parenchyme, (Np) : nervure principale, (Ppl) : Parenchyme palissadique, (Pl) : Parenchyme lacuneux. (C) : Poil tecteur de la feuille de <i>C. suffruticosa</i> . (D) : Poil sécréteur de la feuille de <i>C. suffruticosa</i> .	63
28	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	71
29	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.	73
30	Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal.	74
31	Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de <i>Fumaria capreolata</i> L	84

32	Structure de l'acide palmitique (composé C1).	95
33	Spectre RMN ¹ H de la fraction (20-21), de la phase organique (Phase A).	96
34	Structure de l'acide linoléique (composé C2).	97
35	Spectre RMN ¹ H de la fraction (17-19), de la phase organique (Phase A).	98
36	Spectre RMN- ¹ H de la fraction (A6), de la phase des alcaloïdes totaux.	101
37	Spectre RMN- ¹³ C de la fraction (A6), de la phase des alcaloïdes totaux.	103
38	Structure de la parfumine (composé C3).	104
39	Spectre RMN- ¹ H de la fraction FB5.	106
40	Structure du Protopine, (composé C4).	107
41	Les différentes étapes de fractionnement et d'isolement des alcaloïdes de l'extrait éthanolique de l'espèce <i>F. capreolata</i> L.	108
42	Activité anti-radicalaire des contrôles positifs (BHT, BHA et acide ascorbique).	110
43	Activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de <i>Calendula suffruticosa</i> .	111
44	Activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de <i>Fumaria capreolata</i> .	111
45	Pouvoir antioxydant des extraits éthanoliques de <i>C. suffruticosa</i> et <i>F. capreolata</i> testé par la méthode de la décoloration du β -carotène.	116
46	Pouvoir réducteur des extraits éthanoliques des plantes étudiées et de l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP.	118
47	Pouvoir réducteur des extraits éthanoliques de <i>C.suffruticosa</i> et <i>F.capreolata</i> .	119
48	Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des souris du lot témoin pendant 6h (A) ; Pourcentage de l'augmentation et d'inhibition du volume de la patte (%AUG) des souris du lot référence pendant 6h (B). p<0,05*significatif, p<0,01** très significatif, p<0,001*** hautement significatif, (n=6)	126

<p>49</p>	<p>Pourcentage d'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot EEC200 pendant 6h (C) ; Pourcentage de l'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot EEC400 pendant 6h (D). $p < 0,05$*significatif, $p < 0,01$** très significatif, $p < 0,001$*** hautement significatif, (n=6)</p>	<p>128</p>
<p>50</p>	<p>Pourcentage d'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot EEF200 pendant 6h (E) ; Pourcentage de l'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot EEF400 pendant 6h (F). $p < 0,05$*significatif, $p < 0,01$** très significatif, $p < 0,001$*** hautement significatif, (n=6).</p>	<p>134</p>
<p>51</p>	<p>Effet de l'extrait éthanolique de <i>C.suffruticosa</i> et le médicament de référence sur l'inhibition des crampes abdominales induites par une injection de l'acide acétique (1%, ip) chez la souris.</p>	<p>145</p>
<p>52</p>	<p>Effet de l'extrait éthanolique de <i>F.capreolata</i> et le médicament de référence sur l'inhibition des crampes abdominales induites par une injection de l'acide acétique (1%, ip) chez la souris.</p>	<p>148</p>

Liste des tableaux

Numéro	Tableau	Page
01	La classification botanique de l'espèce <i>Fumaria capreolata</i> L. selon (Cronquist, 1981).	05
02	La classification botanique de l'espèce <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal.	09
03	Les alcaloïdes isolés des espèces du genre <i>Fumaria</i> (Fafal et Önür, 2007).	16
04	Paramètres du milieu ambiant de l'animalerie (C.R.D-SAIDAL).	28
05	Réactifs utilisés dans la caractérisation des groupes chimiques.	32
06	Principaux réactifs utilisés pour la révélation des CCM.	39
07	Les conditions opératoires de fractionnement des différentes phases de l'extrait éthanolique de <i>Fumaria capreolata</i> L.	40
08	Déplacement chimique (en ppm) des solvants deutérés utilisés.	42
09	Profil phytochimique des différents organes de <i>Fumaria capreolata</i> L. et <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal.	65
10	Rendement des extraits éthanoliques de <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal. et <i>Fumaria capreolata</i> L.	69
11	Composés chimiques de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de <i>C. suffruticosa sp suffruticosa</i> Vhal. par (GC-MS).	75
12	Activités biologiques de quelques composés phytochimiques identifiés dans l'extrait éthanolique des parties aériennes de <i>C. suffruticosa sp suffruticosa</i> Vhal..	82
13	Composition chimique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'espèce <i>Fumaria capreolata</i> L.	85
14	Les composés majoritaires des extraits éthanoliques de <i>Fumaria capreolata</i> L. et <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal.	86
15	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la phase organique (Phase A).	87
16	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B).	89
17	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction A (FB3 (25-35) de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B).	90

18	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction B (FB5 (40-51) de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B).	91
19	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction D (de la fraction FB 7 jusqu'à la fraction FB13) de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B).	92
20	Données RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du composé C3.	99
21	Données RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃) du composé C3.	102
22	Données RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du composé C4.	105
23	Valeurs des IC ₅₀ trouvées pour les extraits des deux plantes étudiées.	112
24	Données de l'étude de la toxicité aiguë de l'extrait éthanolique de l'espèce <i>C. suffruticosa</i> Vhal..	122
25	Les doses injectées et la transformation en pourcentage du nombre de morts dans chaque lot pour l'étude de la toxicité aiguë de l'extrait éthanolique de <i>F. capreolata</i> L.	123
26	Groupes de moyennes des lots homogènes pour le variable temps : Résultats du test de Tukey.	130
27	Comparaison des différents lots testés avec le lot témoin à l'aide du test de DUNNETT.	132
28	Groupes de moyennes des lots homogènes pour le variable temps : Résultats du test de Tukey. Activité anti-inflammatoire <i>Fumaria capreolata</i> L..	136
29	Comparaison des différents lots testés avec le lot témoin à l'aide du test de DUNNETT : Activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de <i>Fumaria capreolata</i> L..	138
30	Groupes de moyennes des lots homogènes pour le variable nombre des crampes abdominales induites par une injection de l'acide acétique (1%, ip) chez la souris : Résultats du test de Tukey	146
31	Comparaison des différents lots testés avec le lot témoin à l'aide du test de DUNNETT.	146
32	Groupes de moyennes des lots homogènes pour le variable	149

	nombre des crampes abdominales : Résultats du test de Tukey pour l'activité analgésique de l'extrait éthanolique de <i>F.capreolata</i> L.	
33	Comparaison des différents lots testés avec le lot témoin à l'aide du test de DUNNETT.	149

RESUME

Fumaria capreolata L. et *Calendula suffruticosa* Vhal., sont deux Plantes Médicinales spontanées, largement répandues en Afrique du nord, particulièrement en Algérie. Elles sont reconnues depuis des siècles pour leurs vertus thérapeutiques, et sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans le traitement des maladies hépatobiliaires, les troubles gastro-intestinaux et dans le traitement des pathologies cutanées.

Le présent travail a pour objectif la détermination des caractéristiques histologiques, phytochimiques, des teneurs en flavonoïdes et des composés phénoliques des extraits éthanoliques des deux plantes du Nord-est d'Algérie. Ainsi que l'évaluation des activités pharmacologiques par l'étude de l'activité anti-oxydante *in vitro*, l'étude de la toxicité aiguë et les activités anti-inflammatoire et analgésique *in vivo*.

L'analyse qualitative des extraits éthanoliques des deux plantes, réalisée par un screening chimique, a révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires. L'estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes par la méthode colorimétrique a montré que les extraits éthanoliques sont riches en ces composés. La composition chimique de l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal. a été établie pour la première fois en utilisant GC / MS. Parmi les soixante-quatre (64) composés identifiés, cinq (05) sont majoritaires : l'acide α linoléique (24.20%), l'acide linoléique (23.58%), Stigmasterol (8.53 %), 2-Metyl-Z- 4 tétradecène (6.62 %) et α -Bisabolol (1.70 %).

Les constituants majoritaires de l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. sont le protopine (53.03 %), l'acide linoléique (12.58 %) et le parfumine (10.08 %).

L'activité anti-oxydante *in vitro* a été évaluée par trois techniques différentes: le test de DPPH, la réduction du fer « FRAP » et par le blanchissement du β -carotène. Les extraits éthanoliques des deux plantes ont montré une activité anti-oxydante très élevée. L'étude toxicologique des extraits nous a permis de constater que la DL50 des deux plantes est supérieure à 1000 mg/Kg de P.C. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par le test de l'œdème inflammatoire induit par la carragénine chez la souris, et l'activité analgésique a été déterminée sur un modèle de la douleur induite par l'acide acétique. Le dicolfenac et l'acide acétylsalicylique sont utilisés comme des médicaments de référence. Les extraits étudiés à la dose 200 et 400 mg /kg et administré par voie orale, possèdent une activité anti-inflammatoire et analgésique significative (test d'ANOVA).

Mots clés : *Fumaria capreolata* L, *Calendula suffruticosa* Vhal, GC/MS, Extraits, activité anti-oxydante, activité anti-inflammatoire, activité analgésique.

ABSTRACT

Fumaria capreolata L and *Calendula suffruticosa* Vhal, are two spontaneous and widespread medicinal plants in North Africa, particularly in Algeria. They have been recognized for centuries for their medicinal properties, or they are used in traditional medicine in the treatment of hepatobiliary diseases, gastrointestinal disorders and in the treatment of cutaneous pathologies.

The present work aims to determine the histological, phytochemical and phenolic and flavonoid content of the ethanolic extracts of the two plants of northeastern Algeria. As well as to evaluate the pharmacological activities by the study of antioxidant activity *in vitro*, and the study of acute toxicity and anti-inflammatory and analgesic activities *in vivo*.

The qualitative analysis of the ethanolic extracts of the two plants, carried out by chemical screening, revealed the presence of several secondary metabolites. Quantitative estimation of total polyphenols and flavonoids by the colorimetric method has shown that ethanolic extracts are rich in these compounds. The chemical composition of the ethanol extract of *C. suffruticosa* Vhal was established for the first time using GC / MS. Sixty-four compounds identified, six are predominant: linoleic acid (24.20%), linoleic acid (23.58%), Stigmasterol (8.53%), 2-Metyl-Z-4-tetradecene (6.62%) and α -Bisabolol (1.70%). The major constituents of the ethanolic extract of *F. capreolata* L are protopine (53.03 %), l'acide linoléique (12.58 %) et le parfumine (10.08 %).

The antioxidant activity was evaluated *in vitro* by the DPPH test, the "FRAP" iron reduction technique and the β -carotene bleaching test. The ethanolic extracts of both plants showed a very high antioxidant activity.

The toxicological study of the extracts allowed us to note that the LD50 of the two plants is greater than 1000 mg / kg of PC.

The anti-inflammatory activity was evaluated by the test of the carrageenin-induced inflammatory edema in the mouse, and the analgesic activity was determined on a model of pain induced by acetic acid. Decolfinac and acetyl salicylic acid are used as reference drugs. The extracts studied at the dose 200 and 400 mg / kg administered orally, have a significant anti-inflammatory and analgesic activity (ANOVA test).

Key words: *Fumaria capreolata* L, *Calendula suffruticosa* Vhal, GC/MS, Extracts, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, analgesic activity.

المخلص

Calendula suffruticosa و *Fumaria capreolata*، هما نوعان من النباتات الطبية العفوية والواسعة الانتشار في شمال أفريقيا، لا سيما في الجزائر. وقد تم الاعتراف بها لقرون لخصائصها الطبية وعرف أنها تستخدم في الطب التقليدي في علاج أمراض الكبد واضطرابات الجهاز الهضمي وفي علاج الأمراض الجلدية. يهدف هذا العمل إلى تحديد الخصائص النسيجية، الفيتو كيميائية، و كمية المركبات الفينولية و الفلافونويدية للمستخلصات الإثنانولية لهادين النباتين من شمال شرق الجزائر و كذلك لتقييم الأنشطة الدوائية من خلال دراسة النشاط المضاد للأكسدة في المختبر و دراسة السمية الحادة و الأنشطة المضادة للالتهابات و المسكنة في الجسم الحي. كشف التحليل النوعي للمستخلصات الإثنانولية للنباتين و الذي تم إجراءه عن طريق الفحص الكيميائي وجود العديد من المركبات الثانوية. و قد أظهر التقدير الكمي للمركبات البوليفينوليا و الفلافونويدات بواسطة الطريقة اللونية أن المستخلصات الإثنانولية غنية بهذه المركبات. لقد تم دراسة التركيب الكيميائي للمستخلص الإثنانولي لنبات الأذريون لأول مرة باستخدام الكروماتوغرافيا.

من المركبات الأربعة و الستين التي تم تحديدها لنبات *Calendula suffruticosa* ستة هي الغالبة و هم

: حمض اللينولينيك (20.24%) حمض اللينولينيك (23.58%)

ستيغماسترونول (8.53%) 2 – مثيل ز -4- تيراديسين (6.62%) و ألفا بيزابولول (1.70%). المركبات الرئيسية

للمستخلص الإثنانولي ل *Fumaria capreolata* هي : بروتوبين (20.24%) بارفمين (23.58%).

تم تقييم النشاطات المضادة للأكسدة في المختبر من خلال اختبار (د ب ب ش)، اختبار ارجاع الحديد (فراب) و اختبار التبييض بيتا كاروتين. أظهرت النتائج أن المستخلصات الإثنانولية لكلتا النباتين لها نشاطا مضادا للأكسدة عالي جدا سمحت لنا الدراسة السمية للمستخلصات أن نلاحظ أن الجرعة المميتة 50 للنباتين أكبر من 1000 مغ /كغ من وزن الجسم. تم تقييم النشاط المضاد للالتهاب عن طريق اختبار الودمة الالتهابية التي يسببها الكاراجين لدى الفأر ، و تم تحديد النشاط المسكن على نموذج من الألم الناجم عن حمض الأستيك. حيث تم استخدام كل من ديكلوفيناك و حمض الأستيل ساليسيليك كأدوية مرجعية . المستخلصات التي تمت دراستها بجرعة 200 و 400 مغ /كغ يتم تناولها عن طريق الفم . لها نشاط و مضاد للالتهاب و مسكن (اختبار أنوفا).

الكلمات المفتاحية : *Calendula suffruticosa*، *Fumaria capreolata*، GC/MS، مستخلصات ،

نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للالتهابات، نشاط مسكن.

Sommaire

Sommaire

Remerciements

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale01

Partie I : Bibliographie.

Chapitre I : Aperçu sur les espèces *Fumaria capreolata* L. et *Calendula suffruticosa* Vhal.

1. La Fumeterre « <i>Fumaria capreolata</i> L. »	3
1.1. Généralités	3
1.2. Etymologie	4
1.3. Position dans la systématique botanique de <i>Fumaria capreolata</i> L	5
1.4. Caractéristiques botaniques de <i>Fumaria capreolata</i> L	5
1.4.1. Appareil végétatif et souterrain	5
1.4.2. Appareil reproducteur	5
1.5. Utilisation de la fumeterre	6
2. Le souci « <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal.»	7
2.1. Généralités sur la famille des Astéracées	7
2.2. Le genre <i>Calendula</i>	8
2.3. Etymologie	8
2.4. Position dans la systématique botanique de <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal.	9
2.5. Caractères morphologiques de <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal.	9
2.5.1. Appareil végétatif	9
2.5.2. Appareil reproducteur	9
2.6. Utilisation	10

Chapitre II : Travaux antérieurs et principaux métabolites isolés du genre *Fumaria* et *Calendula*.

1. Données pharmacologiques et phytochimiques du genre <i>Fumaria</i>	11
1.1. Les données pharmacologiques	11
1.1.1. Activités anti-inflammatoire et analgésique	11
1.1.2. Activité antidiabétique	11
1.1.3. Activité anti cholinestérase	12
1.1.4. Activité anti nociceptive	12
1.1.5. Activités anti bactérienne et antifongique	13
1.1.6. Activité hépato protective	13
1.1.7. Activité anti-oxydante	14
1.1.8. Activité neuropharmacologique	14
1.2. Les données phytochimiques du genre <i>Fumaria</i>	15
1.2.1. Les Alcaloïdes	15
1.2.2. Les acides organiques	18
1.2.3. Les composés phénoliques	18
1.2.4. Les huiles essentielles	18
2. Données pharmacologiques et phytochimiques du genre <i>Calendula</i>	19
2.1. Les données pharmacologiques.....	19
2.1.1. Activités antimicrobiennes	19
2.1.2. Activité anti-inflammatoire	20
2.1.3. Activité anti-oxydante	20
2.1.4. Activité hépato-protective	21
2.1.5. Activité anti-HIV	22
2.1.6. Activité cicatrisante	22
2.2. Les données phytochimiques sur le genre <i>Calendula</i>	23
2.2.1. Les Huiles Essentielles	23
2.2.2. Les saponines	24
2.2.3. Les caroténoïdes	25
2.2.4. Les flavonoïdes	25

Partie II : Matériels et Méthodes

1. Matériel	27
1.1. Matériel végétal.....	27
1.2. Matériel Animal et conditions d'élevage	28
2. Présentation de la zone d'étude	28
2.1. La situation géographique	28
2.2. Le couvert végétal	30
2.3. Le sol.....	30
3. Méthodes	31
3.1. Traitements des échantillons	31
3.2. Technique histologique	31
3.3. Screening phytochimique	32
3.4. Techniques d'extractions	33
3.4.1. Préparation de l'extrait éthanolique de <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal	33
3.4.2. Préparation de l'extrait éthanolique de <i>Fumaria capreolata</i> L	33
3.5. Techniques de dosage	34
3.5.1. Dosage de composés phénoliques totaux des extraits éthanoliques de <i>C. suffruticosa</i> Vhal. et <i>Fumaria capreolata</i> L. par colorimétrie	34
3.5.2. Dosage des flavonoïdes de l'extrait éthanolique de <i>C.suffruticosa</i> Vhal.....	35
3.6. Analyse des extraits par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectre de masse (GC/MS)	35
3.7. Fractionnement et Purification de l'extrait éthanolique de <i>Fumaria capreolata</i> L	36
3.7.1. Purification des deux phases	38
3.7.1.1. Les techniques chromatographiques	38
3.7.1.1.1. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	38
3.7.1.1.2. La Chromatographie sur Colonne ouverte (CC)	39
3.7.1.2. Les techniques d'identification structurale	41
3.7.1.2.1. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	41
3.8. Activités pharmacologiques des extraits éthanoliques des deux plantes étudiées	42
3.8.1. Activités pharmacologiques <i>in vitro</i>	42

3.8.1.1.	Activité anti-oxydante	42
3.8.1.1.1.	Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	42
3.8.1.1.2.	Activité antioxydante par la méthode de décoloration du β -carotène (<i>β-carotene bleaching method</i>)	44
3.8.1.1.3.	Réduction du Fer : FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>).....	45
3.8.2.	Activités pharmacologiques <i>in vivo</i>	46
3.8.2.1.	Etude de la toxicité aiguë	46
3.8.2.2.	L'activité anti-inflammatoire	49
3.8.2.3.	Etude de l'activité analgésique : (<i>writhing test</i>).....	52
3.9.	Méthodes d'analyse statistique	54
3.9.1.	Description des données	55
3.9.2.	Le test d'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA)	55
3.9.3.	Le test de Tukey	256
3.9.4.	Le test de Dunnett	56

Partie III : Résultats et discussion

1.	Histologie de <i>C.suffruticosa</i> Vhal. et <i>F.capreolata</i> L.....	58
1.1.	La tige	58
1.2.	La feuille	63
2.	Screening phytochimique de <i>Fumaria capreolata</i> L. et <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal ...	65
3.	Rendement des extraits éthanoliques de <i>C.suffruticosa</i> Vhal. et <i>F. capreolata</i> L.....	69
4.	Dosage des Métabolites Secondaires par dosage spectrométrique	70
4.1.	Teneurs des polyphénols totaux dans l'extrait éthanolique de <i>C.suffruticosa</i> Vhal. et <i>F.capreolata</i> L.....	70
4.2.	Teneur des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de <i>C. suffruticosa</i> Vhal.....	73
5.	Profil phytochimique des extraits des deux espèces étudiées	74
5.1.	Analyse chimique de l'extrait éthanolique de <i>C. suffruticosa</i> Vhal par GC/MS	74
5.2.	Composition chimique de l'extrait éthanolique de <i>F. capreolata</i> L. par GC/MS.....	84
6.	Fractionnement de l'extrait éthanolique de <i>Fumaria capreolata</i> L. et isolement des composés	87
6.1.	Purification de la phase organique (Phase A)	87

6.2. Purification de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B)	89
7. Elucidation structurale des composés isolés de l'extrait éthanolique de <i>F. capreolata</i> L	95
7.1. Elucidation structurale des composés isolés de la phase organique	95
7.1.1. La fraction A6 (20-21)	95
7.1.2. La fraction A7 (17-19)	97
7.2. Elucidation structurale des composés isolés de la phase des alcaloïdes totaux	99
7.2.1. La fraction A6	99
7.2.2. La fraction FB5	105
8. Activités pharmacologiques de <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal. et <i>Fumaria capreolata</i> L	109
8.1. Activités pharmacologiques <i>in vitro</i>	109
8.1.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante <i>in vitro</i>	109
8.1.1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	109
8.1.1.2. Test du blanchissement du β -carotène (<i>β-carotene bleaching method</i>)	116
8.1.1.3. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power)	118
8.2. Activités pharmacologiques <i>in vivo</i>	122
8.2.1. Toxicité aiguë	122
8.2.2. Activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de <i>C. suffruticosa</i> Vhal. et <i>F. capreolata</i> L. <i>in vivo</i>	125
8.2.3. Activité analgésique des extraits éthanoliques de <i>Fumaria capreolata</i> L. et <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal. <i>in vivo</i>	144

Conclusion et perspectives.

Références bibliographiques.

Annexes.

Introduction générale

La nature est la source inévitable de l'univers pour répondre à nos besoins fondamentaux en matière de vie. Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses drogues végétales trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies.

Les plantes Médicinales et Aromatiques se définissent comme étant des matières premières utilisées à des fins thérapeutiques, aromatiques et culinaires, ou en tant que composants entrant dans la fabrication de produits cosmétiques, de médicaments, d'aliments naturels et autres produits de santé.

Elles représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques (Aberkane, 2006).

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes (Kar, 2007).

Parmi ces métabolites secondaires, on distingue les polyphénols. Ils constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal (Hagerman et *al.*, 1998). Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes. Leur rôle d'antioxydants naturels dans les plantes est dû à leurs propriétés redox qui leur permettent d'agir soit comme des agents réducteurs (donneurs d'hydrogène), piègeurs de l'oxygène singulet (1O_2) ou des chélateurs de métaux (Rice-evans et *al.*, 2011).

Grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé, les études sur les polyphénols connaissent une importance croissante. En effet, ils interviennent dans la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif tel que les cancers, la cataracte, l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension artérielle, les maladies neuro-dégénératives et l'arthrite (Chun et *al.*, 2004).

Les alcaloïdes représentent également un groupe de métabolites secondaires très diversifiés retrouvés chez les organismes vivants, ils ont un large rang de types structuraux, de voies de biosynthèse et d'activités pharmacologiques.

Ces métabolites secondaires sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés. Au niveau du système nerveux central, qu'ils soient antidépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine), aussi au niveau du système nerveux autonome comme des

sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques, parasymphomimétiques, anti cholinergiques et ganglioplégiques.

Et aussi comme des curarisants, d'anesthésiques locaux, d'antif brillants, d'anti tumoraux, et d'antipaludiques (Bruneton, 2009).

Le continent africain est doté d'une biodiversité très riche et variable, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

L'Algérie est caractérisée par sa richesse floristique considérable, estimée à plus de 3000 espèces végétale dont 15% sont endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques. La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne, saharienne et une flore paléo-tropical (Quezel et Santa, 1963). Ce potentiel de plantes comporte des milliers d'espèces qui présentent divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique important et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles.

Dans ce contexte, et dans le but de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et pharmacologique de deux plantes médicinales et endémiques à l'Algérie, issues plus particulièrement de la péninsule de l'Edough à Seraidi (Nord Est de la wilaya d'Annaba, Algérie): *Calendula suffruticosa subsp suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L.

Fumaria capreolata L. et *Calendula suffruticosa subsp suffruticosa* Vhal., sont deux Plantes Médicinales spontanées, largement répandues en Afrique du nord, particulièrement en Algérie. Elles sont reconnues depuis des siècles pour leurs vertus thérapeutiques, et sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans le traitement des maladies hépatobiliaires, les troubles gastro-intestinaux et dans le traitement des pathologies cutanées (Gilani et *al.*, 2005 ; Arora et *al.*, 2013).

En effet, l'objectif de notre étude est basé sur une étude phytochimique ainsi qu'une évaluation *in vitro* de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques de ces deux espèces par trois méthodes distinctes: le piégeage du radical libre DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl), la réduction du fer ou FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) et la méthode de décoloration du bêta carotène. Egalement, Les activités anti-inflammatoires et

analgésiques de ces deux plantes ont été également évaluées *in vivo* sur des souris de la souche albinos.

Le choix de ces deux espèces est basé sur deux critères :

- Le premier étant l'endémisme de ces espèces au Nord-est d'Algérie et leurs utilisations fréquentes dans la médecine traditionnelle locale.
- Le deuxième critère est le nombre restreint des travaux réalisés sur les deux plantes de cette région et surtout l'espèce *Calendula suffruticosa subsp suffruticosa* Vhal. qui n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ou pharmacologique à notre connaissance.

Cette étude est divisée en quatre parties :

- La première partie est consacrée à l'étude bibliographique des deux espèces, elle est divisée en deux chapitres :
 - Le premier chapitre aborde un aperçu général sur les deux familles botaniques Asteraceae et Papaveraceae, une description botanique des espèces étudiées (*Calendula suffruticosa subsp suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L.), leurs répartitions géographiques et leurs utilisation en médecine traditionnelle.
 - Le deuxième chapitre porte sur une mise au point bibliographique sur les principaux principes actifs isolés et les travaux phytochimiques et pharmacologiques, réalisés sur les deux espèces retenues pour l'étude ou sur d'autres espèces du même genre.
- La deuxième partie décrit les méthodes et les conditions opératoires utilisées dans cette étude : histologie, extractions, dosages spectrophotométrique, techniques d'analyse et de purification (GC/MS, RMN) des extraits, tests anti-oxydantes *in vitro* et activités pharmacologiques étudiés *in vivo*.
- La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats avec interprétations et la discussion.

Notre travail s'achève par une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude et des perspectives.

PARTIE I

Bibliographie

Chapitre I :

Aperçu sur les espèces

Fumaria capreolata L. et *Calendula suffruticosa*

Vhal.

1. La Fumeterre « *Fumaria capreolata* L. » :

1.1. Généralités :

Les Papavéracées constituent une famille de plantes herbacées annuelles ou vivaces et de quelques arbustes. Les espèces de cette famille possèdent des feuilles alternes au moins à la base de la tige, elles sont généralement découpées et dépourvus de stipules ; les inflorescences sont composés des fleurs solitaires ou plus rarement cyme, racème ou panicule. Les fleurs sont hermaphrodites, actinomorphes à zygomorphes et le fruit est une capsule s'ouvrant par des pores apicaux ou des valves, et parfois une silique (Spichiger, 2000).

La plupart des plantes de cette famille sont caractérisées par la présence de laticifères. Elles sécrètent un latex de couleur blanche, crème, jaune, orange ou rouge (Judd et *al.*, 2002).

Cette famille comprend 40 genres et 770 espèces, largement répandues dans les régions de type tempéré ; surtout diversifiées dans l'hémisphère nord, mais aussi en Afrique du sud et dans l'est de l'Australie (Judd et *al.*, 2002) (Fig. 1).

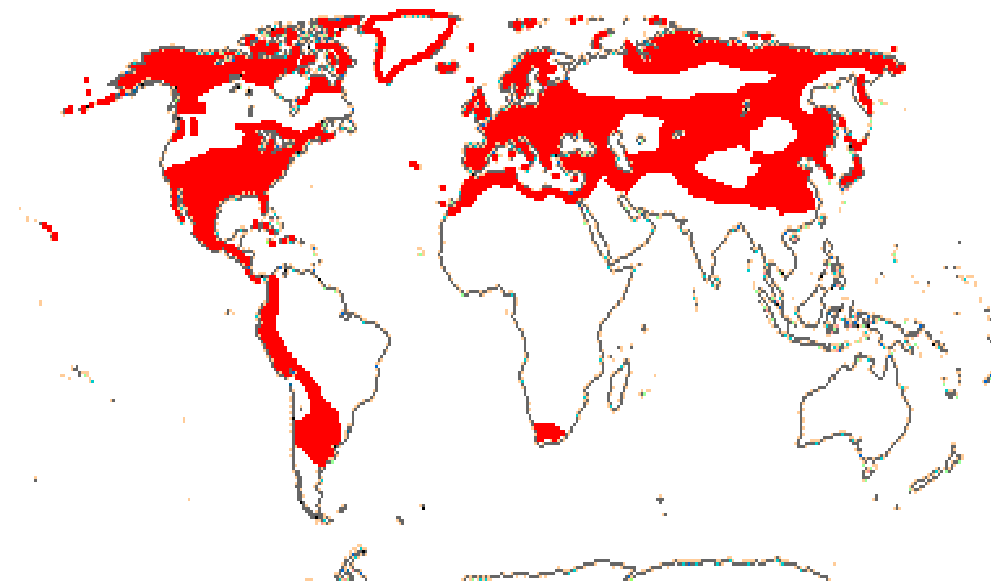


Figure 01: Répartition géographique de la famille des Papavéracées dans le monde (en rouge) selon (Stevens, 2001).

La fumariacée est souvent considérée comme une sous-famille (fumarioideae) de la grande famille de Papavéracée et est représentée par environ 19 genres et plus de 400 espèces. Elles sont distribuées dans les régions tempérées du nord d'Amérique, l'Asie, l'Afrique et l'Europe (Sharma, 2009). (Fig. 2)



Figure 02: Répartition géographique de la sous-famille des Fumarioideae dans le monde (en rouge) selon (Stevens, 2001).

Le genre *Fumaria* comprend environ 50 espèces (Judd et al., 2002), répandues dans l'Eurasie, l'Afrique et les îles de l'Atlantique (Burrows et Tyrl, 2012). Les espèces de la famille de Papavéracées renferment des alcaloïdes divers dont la majorité sont utilisés dans le domaine pharmaceutique comme par exemple le *Papaver somniferum* qui est la source de l'opium et de ses dérivés tels que la morphine, la codéine et l'héroïne. Les graines de cette espèce, dépourvues d'opium, sont utilisées comme épice. Beaucoup d'espèces ont des fleurs voyantes et sont cultivées comme plantes ornementales, telles les espèces d'*Argemone*, de *Macleaya* et de *Cordalis* (Judd et al., 2002).

1.2. Etymologie de *Fumaria capreolata* L.:

Cette plante doit son nom générique à son feuillage finement découpé et légèrement bleuté, qui évoque une délicate fumée s'élevant de terre, d'où le nom de la plante (*Fumaria*). C'est également l'origine du nom latin *Fumaria*, de *fumus*, fumée peut être aussi par allusion à l'amertume de la plante qui rappelle celle de la fumée (Couplan, 2012).

Les feuilles faisant usage de « vrilles » (latin : *capreolata*) expliquent le qualificatif (Beniston et Beniston, 1984).

1.3. Position dans la systématique botanique de *Fumaria capreolata* L. :

Tableau 01 : La classification botanique de l'espèce *Fumaria capreolata* L. selon (Cronquist, 1981).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Caryophyllidae
Ordre	Caryophyllales
Famille	Papaveraceae
Genre	<i>Fumaria</i>
Espèce	<i>Fumaria capreolata</i> L.

1.4. Caractéristiques botaniques de *Fumaria capreolata* L. :

1.4.1. Appareil végétatif et souterrain :

Fumaria capreolata L. est une plante herbacée annuelle et peut atteindre de 0.20 à 1m de hauteur (Polese, 2007). Elle a des tiges molles et angulaires (Leight, 2011 ; Polese, 2007) glabres, simples ou faiblement ramifiées ; grimpantes ou couchées de couleur verte ou glauque (Bojnanský et al., 2007). Les feuilles sont alternes et pétiolées (Polese, 2007) ; Le limbe est de couleur bleu- vert pâle (Beffa, 2012). Il est profondément découpé en un ou deux lobes (Leight, 2011) à divisions oblongues ou cunéiformes (Clapham et al., 1990).

La racine est solide, tubéreuse et globulaire (Rose, 1981).

1.4.2. Appareil reproducteur :

Les inflorescences sont assez denses, en grappes pédonculées à l'aisselle des fleurs (Beniston et Beniston, 1984). Les fleurs sont tubulaires, étroites de 10 à 12 mm de long, de couleur blanche avec des pointes violettes (Leigh, 2011). Elles sont sous-tendus par des bractées linéaires-lancéolées, acuminées, égalant ou plutôt plus court que la fleur. Le calice est composé de 4 à 6 Sépales de 2.5 à 3 mm de long, celles-ci sont ovales, aiguées ou acuminées, et dentées à la base (Clapham et al., 1990). La corolle est de 1 cm de long, forme un tube étroit blanc-rosé à extrémité pourprée, et comportent quatre pétales soudées à la base. L'androcée porte six étamines à filets soudés par trois (Beniston et Beniston, 1984).

Le fruit est sub-rectangulaires ou sub-orbiculaires, lisse ou légèrement rugueux (Clapham et *al.*, 1990).

1.5. Utilisation de la fumeterre :

Les espèces du genre *Fumaria* ont été utilisées depuis longtemps dans la médecine traditionnelle comme anti-hypertensives, diurétiques, hépato-protectives et des laxatifs (pour traiter les troubles gastro-intestinaux), ainsi que dans le traitement de certaines maladies de la peau, telles que les éruptions cutanées ou les conjonctivites (Martindale, 1996 *in* Suau et *al.*, 2002).

Fumaria capreolata L. est l'une des espèces du genre *Fumaria*. Elle est largement utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne dans le cas de dysfonctionnement hépatobiliaire et des troubles de l'appareil digestif. Au Pakistan et en Inde, elle a été réputée comme anthelminthique, anti-dyspeptique, purificateur du sang, cholagogue, diurétique, laxatif, sédatif, tonique et aussi jugée efficace pour le traitement des crampes abdominales, la fièvre, la dysenterie ainsi que la syphilis et la lèpre (Gilani et *al.*, 2005 *in* Benabdesselam et *al.*, 2007).

Ces activités biologiques sont principalement associées à la présence d'alcaloïdes isoquinoléiques (Suau et *al.*, 2002).

Même si leur utilisation alimentaire n'est pas très répandue, certaines espèces du genre *Fumaria* sont consommées par les français, les italiens, les espagnols et quelques arabes, généralement dans les zones rurales. La partie comestible est la feuille, qui est parfois cuite, mais elle est également utilisée dans les salades (Wright, 2001).

2. Le souci « *Calendula suffruticosa* Vhal. » :

2.1. Généralités sur la famille des Astéracées :

L'Astéracée appelée aussi l'aster, marguerite ou la famille de tournesol, est l'une des familles les plus courantes qui ont une très grande valeur médicinale. Elle constitue la plus grande famille des plantes vasculaires, avec plus de 22.750 espèces réparties en 12 sous-familles et 1620 genres (Nasir et Ali, 1982 in Shaheen et al., 2012).

Ce sont des herbes érigées ou grimpantes, parfois arbustes ou arbres; les feuilles sont alternes ou opposées, parfois en rosettes basales ou terminales chez les arbustes monocauls, simples, entières ou découpées et parfois composées, les stipules sont absentes. Les fleurs sont cycliques, hétérochlamydes, gamopétales, actinomorphes ou zygomorphes, bisexuées, unisexuées ou stériles. Le fruit est un akène surmonté du pappus persistant parfois comprimé, ailé ou épineux (Spichiger et al., 2002).

Les espèces de cette famille sont des cosmopolites, surtout fréquentes dans les montagnes au climat tempéré ou tropical, dans les habitats ouverts et secs (Judd et al., 2002).



Figure 03: Répartition géographique de la famille des Astéracées dans le monde

(En rouge) selon (Stevens, 2001).

De nombreuses plantes de cette famille sont appréciées pour être alimentaires, par exemple : l'artichaut (*Cynara*), la chicorée (*Cicharium*), le pissenlit (*Taraxacum*) et la laitue (*Lactuca*) (Judd et al., 2002). Le tournesol (*Helicanthus*) est également cultivé pour ses graines utilisées comme huile alimentaire, fourrage et huile industrielle (Vigan, 2012). Tandis que d'autres sont aromatiques et médicinales comme l'armoise (*Artimisia*), l'absinthe (*Absenthum*) et la camomille (*Chamaemelum*).

On rencontre également des espèces ornementales dans les genres *Calendula* (le souci), *Leucanthemum* (la marguerite) et *Echinacea purpurea* (échinacée) (Tardif, 2003).

Les Astéracées ont bien d'autres applications comme le caoutchouc naturel extrait de pissenlit (*Taraxacum*) et gagule (*Parthenium argentatum*), des colorants et des médicaments d'*Artemisia*, *Anthemis nobilis* L. et *Arnica montana* L., des insecticides et des épices d'estragon (*Artemisia dracunculus* L.) (Vigan, 2012).

Le plus souvent, les Astéracées sont cultivées comme fleurs ornementales, mais elles existent à l'état naturel et peuvent être considérées comme des mauvaises herbes ou adventices tels que : le chardon, le chiendent et en particulier le *Parthenium hysterophorus* (Vigan, 2012).

Cette famille ne comporte qu'un petit nombre des plantes toxiques, dont une seule s'est avérée mortelle : le chardon à glu (*Atractylis gummifera*) de la région méditerranéenne (Couplan, 2009).

2.2. Le genre *Calendula* :

Calendula est relativement un petit genre d'environ 12 à 20 espèces originaires de la Micronésie et de la Méditerranée (Coste, 1937 in Paolini, 2010). Ce sont des Herbes annuelles ou vivaces, parfois ligneuses à la base ; souvent glandulaires et aromatiques. Les feuilles sont alternes et simples. L'inflorescence est parfois ramifiée. Les fleurons extérieurs ligulés, jaune ou orange. Tandis que les fleurons internes sont tubulaires, jaunes ou oranges. Le fruit est toujours un akène (Tutin et Heywood, 1976).

2.3. Etymologie de *Calendula suffruticosa* Vhal.:

Le nom du genre « *Calendula* » date du Moyen Age. Il provient du latin « *Calendae* » : les calendes étant, dans le calendrier romain le premier jour du mois, probablement avec un sens analogue à calendrier, indicateur métrologique en raison de sa longue période de floraison car les capitules s'ouvrent et se ferment avec l'apparition du soleil (Couplan, 2012). Tandis que *suffruticosa*, dérivé du latin « *frutex* » veut dire buisson ; car cette espèce ligneuse se rapproche des sous-arbrisseaux (Beniston et Beniston, 1984).

2.4. Position dans la systématique botanique de *Calendula suffruticosa* Vhal. :

Tableau 02 : La classification botanique de l'espèce *Calendula suffruticosa* Vhal. selon (Cronquist, 1981).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	Astérideae
Sous-classe	Campanulideae
Ordre	Asterales
Famille	Astéraceae
Genre	<i>Calendula</i>
Espèce	<i>Calendula suffruticosa</i> Vhal., 1791

2.5. Caractères morphologiques de *Calendula suffruticosa* Vhal. :

2.5.1. Appareil végétatif :

Calendula suffruticosa Vhal. est une plante herbacée, vivace et visqueuse, atteignant environ 40 cm de haut; la tige est plus ou moins dressée (Beniston et Beniston, 1984). Elle est boisée habituellement une certaine distance au-dessus de la base, simple ou peu ramifiée (Tutin et Heywood, 1976). Les feuilles sont d'une couleur vert pâle, de forme lancéolées, légèrement ondulées et dentées, et les feuilles supérieures sont embrassantes (Beniston et Beniston, 1984).

2.5.2. Appareil reproducteur :

Les fleurs sont tubulaires, réunies en capitules dépassant 2 cm de diamètre. Les fleurs périphériques ligulées sur 2 rangées, et celles du centre sont tubuleuses et dentées (Beniston et Beniston, 1984). Le pédoncule est souvent long et nu ou avec quelques petites bractées subulées (Tutin et Heywood, 1976), involucre à deux rangs de bractées de couleur verte, linéaires et ligulées et aiguës. La corolle comprend des pétales de couleur jaune ou orangée; L'androcée porte cinq étamines et les anthères forment un tube autour du style (Beniston et Beniston, 1984). Le fruit est un akène de 3 sortes souvent recourbés et pourvus de pointe (Beniston et Beniston, 1984).

2.6. Utilisation :

Les espèces du genre *Calendula* sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle asiatique et de l'ouest européen dans le traitement des maladies de la peau, des plaies, des brûlures, de la dysménorrhée et des ulcères duodénaux. Les tri-terpénoides isolés à partir des espèces de *Calendula* ont plusieurs activités pharmacologiques telles que, hypoglycémique, gastro-protecteur, antiviral, antimutagène et anti-inflammatoires (Kirmizibekmez, 2006).

Chapitre II :

**Travaux antérieurs et principaux Métabolites
Secondaires isolés du genre *Fumaria* et *Calendula***

1. Données pharmacologiques et phytochimiques du genre *Fumaria* :

1.1. Les données pharmacologiques :

Les espèces du genre *Fumaria* constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives contre les virus, les bactéries et certaines cellules cancéreuses. Différentes espèces de la fumeterre sont utilisées dans le monde entier en médecine traditionnelle et leur activité a été confirmée dans le traitement de plusieurs affections.

1.1.1. Activités anti-inflammatoire et analgésique :

Dans ce contexte, en 2011, Nainwal et ses collaborateurs ont mis en évidence les propriétés analgésiques et anti-inflammatoires des extraits éthanoliques des parties aériennes de l'espèce *Fumaria vaillantii* Loisel.

Une autre étude a été réalisée sur une espèce du même genre : *Fumaria indica*, par Rao et ses collaborateurs en 2007, montre que l'extrait éthanolique de cette plante est une bonne source des composés à effet inhibiteur de l'œdème des pattes de rat induit par des différents antagonistes comme l'histamine et la carragénine.

1.1.2. Activité antidiabétique :

Le diabète est l'une des cinq principales maladies causant un nombre important de décès dans le monde. Certaines plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter cette maladie (Gipsen et al., 2000 ; Rahimi et al., 2005).

Akhtar et al., ont publié en 1984 un document dans lequel ils ont examiné les niveaux de glucose sanguin des lapins albinos mâles normaux et diabétiques par l'alloxane après l'administration orale de différentes doses de la poudre de *F. parviflora* et ils ont conclu que la plante possède des propriétés hypoglycémiques (Akhtar et al., 1984 in Fathiazad et al., 2013).

Dans une étude récente faite par Fathiazad et ses collaborateurs en 2013 sur les effets de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la même espèce (*F. parviflora*) où l'apparition du diabète a été provoquée par la streptozotocine, l'administration orale de l'extrait de *F. parviflora* a montré un effet puissant d'abaissement du glucose à 100 mg / dl seulement chez les rats diabétiques ($p < 0,001$). Cependant, aucune différence significative dans les niveaux de glucose sanguin ont été enregistrés chez les rats diabétiques qui ont reçu les doses de 125 ou 250 mg / kg d'extrait de la plante (Fathiazad et al., 2013).

1.1.3. Activité anti cholinestérase :

Des espèces du genre *Fumaria* et notamment l'espèce *Fumaria capreolata* L. ont été criblés pour leur activité anti cholinestérase contre deux enzymes : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyryl-cholinestérase (BChE) *in vitro* par la méthode de ELLMAN à des concentrations de 10 µg/ml et 1 mg/ml. Les extraits n'ont aucune inhibition notable contre les deux enzymes à la dose de 10 µg/ml.

Par contre, l'ensemble des extraits du genre *Fumaria* ont montré une inhibition très puissante à la fois contre les deux enzymes à concentration de 1 mg/ml par rapport à celle du standard (Orhan et al., 2004).

Şener et Orhan, en 2004, ont mesuré l'activité inhibitrice d'acétylcholinestérase de dix espèces du genre *Fumaria* (*Fumaria asepala*, *F. capreolata*, *F. cilicica*, *F. densiflora*, *F. judaica*, *F. kralikii*, *F. macrocarpa*, *F. parviflora*, *F. petteri* subsp. *Thuretii* et *F. vailantii*) par une méthode spectrophotométrique modifiée développée par Ellman. Tous les extraits montrent une activité inhibitrice élevée (Şener et Orhan, 2004 in Fafal et Önur, 2007).

1.1.4. Activité anti nociceptive :

Heidari et al., en 2004 ont étudié les effets anti nociceptifs des deux extraits méthanoliques (par percolation et par soxhlet) de l'espèce *F. parviflora*. Les souris ont été soumises à deux stimuli douloureux : le premier est thermique à l'aide d'une plaque chauffante et le deuxième est chimique par le formol. L'injection intra péritonéale (Ip) de l'extrait de percolation a provoqué des effets anti nociceptifs significatifs à la dose de 100 mg/kg dans la deuxième phase de test au formol. L'effet anti nociceptif maximal a été induit par la dose de 300 mg/kg qui a été significative dans les deux phases de test au formol. La dose de 400 mg/kg de l'extrait de percolation induit des effets aigües indésirables tels que la diarrhée, la polyurie et l'hyperventilation chez les souris. L'extrait de soxhlet de *F. parviflora* (300 mg/kg) a également montré des effets significatifs dans les deux phases du test au formol. La dose la plus efficace de l'extrait percolé ainsi que l'extrait de soxhlet est (300 mg/kg) a été évalué dans le test thermique. Les résultats ont montré que seulement l'extrait percolé avait un effet anti nociceptif important dans le test thermique. Le prétraitement des souris avec le naloxane, qui est un antagoniste des opioïdes, n'a pas changé l'effet anti nociceptif de l'extrait de percolation dans le test du formol, mais dans le test chimique il a augmenté l'effet de l'extrait après les 15 premières minutes. Ces résultats ont montré que l'espèce *F. parviflora* est relativement un bon remède pour l'usage et une bonne source pour d'autres recherches afin de déterminer les composés toxiques les plus efficaces dans cette espèce.

1.1.5. Activités anti-bactérienne et antifongique :

Naz et *al.*, en 2013 ont testé *in vitro*, sur sept bactéries, l'activité antibactérienne des extraits et trois composés (un alcool le nonacosane-10-ol, homologue de β -sterol : 23a-homostigmast-5-en-3 β -ol et un alcaloïde : *cis*- et *trans*-prtopinium) isolés de *F. parviflora*. La zone d'inhibition (ZI) et l'indice d'activité (IA) étaient maximales pour les bactéries Gram négatifs *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella typhi*. Les trois composés montrent une forte activité antibactérienne dans les concentrations de 100, 200 et 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ contre les souches testées. L'étude des effets antifongiques de l'huile essentielle de *Fumaria vaillantii* Loisel. a été réalisée contre la souche d'*Aspergillus flavus* par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats montrent que l'huile essentielle de la plante présente une forte activité antifongique sur *A. flavus*. Ces activités sont en relation avec la présence d'un phénol monoterpénique naturel « le thymol » qui est le composé majoritaire de l'huile essentielle (Moghtader, 2013).

Khan et *al.*, en 2014 ont analysé *in vitro* les activités antimicrobiennes de différentes concentrations allant de 100 à 500 mg / ml des extraits méthanoliques de *Fumaria indica* sur différentes souches bactériennes cliniques (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas multocida* et *Klebsiella pneumonia*) et des souches fongiques (*Aspergillus flavus*, *Candida kruesie* et *Candida albicans*) utilisant la méthode de diffusion des disques et la méthode de dilution en bouillon. Les résultats ont révélé que l'extrait méthanolique de *F. indica* possède une plus forte activité antibactérienne que l'activité antifongique et les valeurs de la CMI étaient de 150 ml / ml et 250 ml / ml contre *E. coli*.

1.1.6. Activité hépato protective :

Les espèces du genre *Fumaria* sont utilisées traditionnellement contre les troubles liés au foie dans de nombreux pays dont la Turquie. Le stress oxydatif est également connu pour être fortement lié aux problèmes hépatiques. Par conséquent, Orhan et *al.*, en 2010 ont réalisé une étude sur les extraits éthanoliques de quatre espèces du genre *Fumaria*; (*F. cilicica* Hausskn, *F. densiflora* DC, *F. kralikii* Jordanie. et *F. parviflora* Lam.).

Dans les deux essais, les fractions du chloroforme et l'acétate d'éthyle de *F. cilicica* ont révélés être les plus actifs et ont encore été étudié *in vivo* pour l'activité hépato protective dont la toxicité a été induite par CCL₄.

Les données révèlent que les fractions de chloroforme et l'acétate d'éthyle de *F. cilicica* n'ont pas un effet hépato protecteur. Bien que l'effet protecteur de certaines espèces *Fumaria* dans les maladies hépatiques a été montré dans plusieurs études précédentes (Orhan *et al.*, 2010).

1.1.7. Activité anti-oxydante :

Les espèces du genre *Fumaria* contiennent certains types d'acides gras avec un effet antioxydant, dont la plupart sont des phospholipides. L'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques de *F. indica* a été déterminée par l'utilisation du DPPH (1,1 diphényle 2-picrylhydrazyl) et le taux de piégeage des radicaux libres est de 61,8% (Habibi Tirtash *et al.*, 2011 ; Fazal *et al.*, 2011 *in* Gupta *et al.*, 2012).

Maiza-Benabdesselam *et al* en 2007 ont étudié les activités anti-oxydantes des alcaloïdes de deux espèces du genre *Fumaria* : *F. capreolata* L. et *F. bastardii* L. par la mesure de leur pouvoir réducteur, leur capacité à inhiber la peroxydation de l'acide linoléique, et leurs activités de piégeage des radicaux 2,2- diphényl -β- Picrylhydrazyl (DPPH). Les extraits alcaloïdiques des deux plantes possèdent une forte activité anti-oxydante totale, cependant, l'activité de l'extrait de *F. bastardii* était plus puissante que *F. capreolata*. Les concentrations de 100, 300, et 500 µg/ml ont montré un pourcentage de 42, 55, 65 et 48.3, 60, et 67.8% d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, pour les extraits de *F. capreolata* et *F. bastardii*, respectivement.

D'autre part, la concentration 500 µg/ml de l'antioxydant hydroxyanisole butyle (BHA), la quercétine, et la caféine possède un taux d'inhibition de la peroxydation lipidique de 80, 56.2 et 64.3%, respectivement. En outre, les deux extraits avaient un pouvoir réducteur efficace de l'activité de piégeage des radicaux libres (DPPH) à 250 et 50 µg /ml.

1.1.8. Activité neuropharmacologique :

L'extrait éthanolique de *F. indica* a été étudié pour son activité neuropharmacologique, antidépressive et les effets généraux sur le système nerveux central à des doses de 100, 200 et 400 mg / kg. Les résultats ont montré que l'extrait éthanolique de *F. indica* avait une diminution marquée du temps de sommeil chez le rat et une diminution significative de la locomotion. Cependant, les différentes doses de l'extrait de *F. indica* n'ont montré aucun effet relaxant musculaire et aucune activité antidépressive. Tandis que d'autres études ont indiqué que *F. indica* a une activité antidépressive significative du système nerveux central et elle est dépourvue d'activité antidépressive chez les rongeurs (Singh et Kumar, 2010 *in* Gupta *et al.*, 2012).

1.2. Les données phytochimiques du genre *Fumaria* :

Dans cette partie nous présenterons les données phytochimiques de l'espèce *Fumaria capreolata* L. ainsi que d'autres espèces du genre *Fumaria*. D'après les recherches bibliographiques les principaux constituants chimiques détectés dans les espèces du genre *Fumaria* sont les alcaloïdes iso-quinoléiques, les flavonoïdes, les glycosides, les tannins, les saponines et les phénols (Suau et al., 2002 ; Gupta et al., 2012 ; Naz et al., 2013 ; LEPM, 2002 ; Orhan et al., 2010).

1.2.1. Les Alcaloïdes :

Les alcaloïdes représentent le groupe de substances d'intérêt thérapeutique le plus important en termes de nombre, de diversité structurale et de l'éventail de leurs activités pharmacologiques (Bruneton, 2009). Les activités biologiques des espèces du genre *Fumaria* sont principalement associées à la présence des alcaloïdes de type iso-quinoléiques (Suau et al., 2002).

Depuis plusieurs années, des différentes techniques ont été utilisées pour la détermination des alcaloïdes contenus dans les extraits des plantes du genre *Fumaria*, y compris la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie sur Couche Mince à Haute Performance (TLC), la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et la Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) ainsi que des dosages immuno-enzymatiques et radio-immunologiques (Freytag, 1980 ; Yoshikawa et Furuya, 1985 ; Valka et Simanek, 1988 ; Wieczorek et al., 1986 ; Evidente et al., 1983 ; Stahl et Schild, 1985 in Sousek et al., 1999).

Un nombre limité d'alcaloïdes a seulement été déterminé en utilisant la plupart de ces méthodes, et l'identification des alcaloïdes mineurs reste encore un problème. En outre, les composants non-alcaloïdes ont seulement été étudiés dans les extraits de *F. officinalis* L. et *F. capreolata* L. (Torck et al., 1971; Hahn et Nahrstedt, 1993 ; Boegge et al., 1995 in Sousek et al., 1999).

Divers investigations phytochimiques réalisées sur les parties aériennes et les racines des espèces Européennes, Asiatiques et Africaines du genre *Fumaria* ont permis d'isoler différents types d'alcaloïdes iso-quinoléiques en particulier l'aporphine, le protoberberine, le protopine et le benzophenanthridine. Egalement des alcaloïdes spiro-benzylisoquinolines ont été isolés tels que fumaricine, fumariline, fumaritine, fumarophycine, *O*-methylfumarophycine et parfumine (Preininger, 1986; Suau et al., 1991 in Suau et al., 2002 ; Bentley, 2000).

Le tableau 03 recense une cinquantaine d'alcaloïdes isolés des espèces du genre *Fumaria* et les figures 04 et 05 rassemblent les structures de ces alcaloïdes.

Tableau 03 : Les alcaloïdes isolés des espèces du genre *Fumaria* (Fafal et Öbür, 2007).

Les espèces	Nom des alcaloïdes
<i>Fumaria capreolata</i> L.	Sanguinarine, protopine, cryptopine, β allocryptopine, fumaritine, l-stylopine, coptisine, l-capnoidine, isoboldine, bicuculline, fumariline, parfumine, cheilanthifoline, scoulerine, adlumiceine, fumariline, fumarophycine et N-methylstylopine.
<i>Fumaria officinalis</i> L.	Sanguinarine, protopine, cryptopine fumariline, d-corydaline, l-sinactine, dl-bicuculline, fumarofine, l-scoulerine, fumaritine, corytuberine, parfumine, fumaricine, adlumidiceine, fumaroficine, O-methylfumarofycine, stylopine, palmatine, adlumiceine et N-methylstylopine.
<i>Fumaria vaillantii</i> Loisel.	Oxysanguinarine, fumaramidine, cordeline, 8 acetonyldihydrosanguinarine, juziphine 8 methoxydihydrosanguinarine, fumaricine, dihydrosanguinarine, norsanguinarine, isocorydine, fumarophycine et O-methylfumarophycine.
<i>Fumaria parviflora</i> Lam.	adlumidiceine, coptisine, fumariline, parfumine, protopine, fumaranine, fumaritine, paprafumicin, paprarine, fumarophycine, cryptopine, sinactine, stylopine, bicuculline, adlumine, perfumidine et dihydrosanguirine.
<i>Fumaria indica</i> Hasskn.	Papracine, paprazine, sitosterol, stigmasterol, campesterol, protopine, octacosanol, narceimine, narlumidine, adlumidine, Narlumicine, protopine, narlumidine, fumariline, bicuculline tetrahydrocoptisine et oxysanguinarine.
<i>Fumaria muralis</i>	Coptisine, cryptopine, fumariline, fumaritine, fumarophycine, parfumine, O-methylfumarophycine, N-methylstylopine.
<i>Fumaria bastardi</i>	Protopine, protoberberine, stylopine, fumariline, fumarophycine, fumaritine, fumarofine, fumaricine, dihydrofumariline et phtalidisoquinoline.

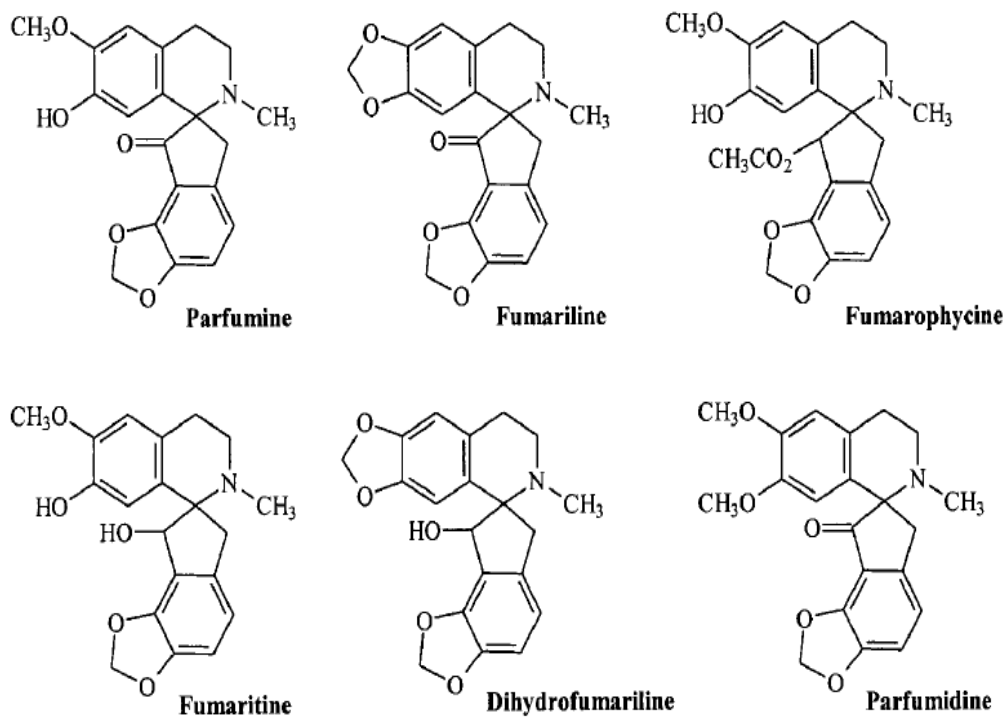


Figure 04 : Les principaux alcaloïdes contenus dans les espèces du genre *Fumaria*. (Suau et *al.*, 2002).

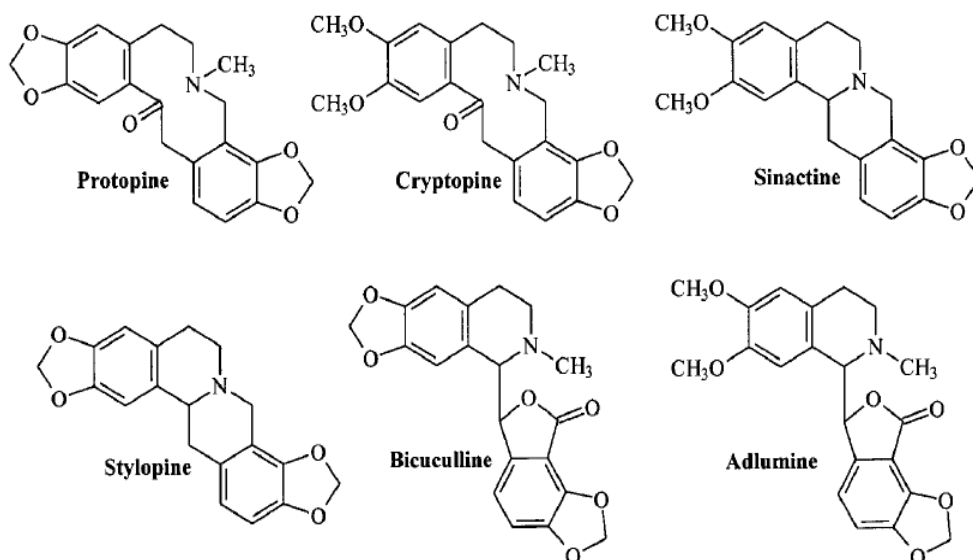


Figure 05 : Quelques alcaloïdes contenus dans l'espèce *Fumaria capreolata*. (Suau et *al.*, 2002).

En 2007, Maiza-Benabdesselam et ses collaborateurs, ont étudiés et identifiés les alcaloïdes contenus dans les extraits méthanoliques des parties aériennes de deux espèces algériennes: *F. capreolata* et *F. bastardi*, par GC/MS (Chromatographie Gazeuse Couple à la Spectrométrie de Masse). Ils ont mis en évidence la présence d'un nombre important d'alcaloïdes tels que : stylopine, protopine, fumaritine, fumaricine, fumarophycine, fumariline et fumarofine.

La teneur des alcaloïdes totaux étaient 426 mg par 100 g pour *F. capreolata* et 521 mg par 100 g pour *F. bastardi*.

1.2.2. Les acides organiques :

Dans une étude réalisé par Sousek et *al.*, en 1999 sur des espèces du genre *Fumaria* cultivés en Turquie, les acides organiques, tels que l'acide citrique, coumarique, férulique, fumarique, malique, 3-hydroxybenzoïque, protocatéchuïque, caféïque et son ester méthylique ont été identifiés par Chromatographie en Phase Gazeuse dans les espèces : *Fumaria agraria*, *F. capreolata*, *F. densiflora*, *F. muralis*, *F. officinalis*, *F. parviflora*, et *F. vaillantii*.

1.2.3. Les composés phénoliques :

La teneur totale en composés phénoliques a été quantifiée par une méthode colorimétrique à l'aide de réactif Folin-Ciocalteu et l'acide gallique comme un standard.

La teneur des composés phénoliques dans les espèces du genre *Fumaria* varient entre 5171 et 1672 mg / 100g de la matière sèche. Contrairement aux espèces étudiés *F. spicata* a la plus faible teneur en composés phénoliques. Tandis que le contenu de *F. muralis* en composés phénoliques est environ deux fois plus que dans les autres plantes du genre *Fumaria* (Sousek et *al.*, 1999).

1.2.4. Les huiles essentielles :

Selon Moghtader (2013), la teneur de l'huile essentielle de *F. vaillantii* était de 0,25%. Ce dernier a été analysé par Chromatographie en Phase Gazeuse capillaire (GC) en utilisant l'ionisation de flamme (FID) et la Chromatographie en Phase Gazeuse sur colonne capillaire couplé Spectrométrie de masse (GC/MS). Dix-huit composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *F. vaillantii* dont les composants majeurs sont le parfumidine avec un pourcentage de 18,94%, le fumaricine (16,30%), le Thymol (12,45%) et fumaritine (10,78%) (Moghtader, 2013).

2. Données pharmacologiques et phytochimiques du genre *Calendula* :

2.1. Les données pharmacologiques :

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur les espèces du genre *Calendula*, ce sont des herbes médicinales populaires bien connu en raison de leurs vastes domaines d'activités biologiques comme antibactériennes, antimicrobiennes, antimutagènes et anti-inflammatoires. Les fleurs des espèces *Calendula* sont utilisées dans de nombreux produits pharmaceutiques et cosmétiques.

2.1.1. Activités antimicrobiennes :

Plusieurs auteurs ont rapporté que les extraits du souci officinal (*Calendula officinalis*) possèdent des propriétés antibactériennes.

Des différents extraits de *Calendula officinalis* (racines, feuilles et fleurs) ont été criblés pour leurs activités antibactériennes contre certaines souches bactériennes importantes, tel que : *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et *Agrobacterium tumefaciens*. Toutes les parties de la plante ont montré une activité antibactérienne significative mais l'activité la plus élevée a été observée dans l'extrait de l'éther de pétrole des feuilles séchées contre *Klebsiella pneumoniae* (Bissa et Bohra, 2011).

Efstratiou et ses collaborateurs en 2012 ont évalué l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques et éthanoliques de souci (*Calendula officinalis*) contre un groupe de micro-organismes pathogènes y compris: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes*, *Candida albicans*, *Candida krusei* et *Candida glabrata* par la méthode de diffusion sur disque. L'extrait méthanolique a présenté la meilleure activité antibactérienne contre la plupart des bactéries testées. Tandis que les deux extraits (méthanolique et éthanolique) ont montré une excellente activité antifongique contre les souches de champignons testées, en comparaison avec le fluconazole. Egalement les travaux de Tiwari et ses collaborateurs en 2011 confirment le potentiel antimicrobien des racines du *Calendula officinalis*. L'extrait d'éther de pétrole des racines de «souci» a montré un effet antibactérien *in vitro* sur un certain nombre des bactéries.

L'étude *in vitro*, a montré une activité antifongique de l'huile essentielle des fleurs de *Calendula officinalis* contre quelques mycètes de microbes pathogènes; Les résultats de l'essai antifongique ont montré pour la première fois que l'huile essentielle a un large spectre antifongique (Gazim et al., 2008).

2.1.2. Activité anti-inflammatoire:

Dans des études réalisées par Preethi et *al* en 2009, l'administration orale de l'extrait éthanolique du *Calendula officinalis* à des doses de 250 et 500 mg / kg de poids corporel produit une inhibition significative de 50,6 et 65,9%, respectivement dans l'œdème de la patte du rat induite par la carragénine et 42,9 et 42,4%, respectivement dans l'inflammation produite par le dextrane.

Ainsi que la production de TNF- α dans une culture de macrophages traités par le lipopolysaccharide (LPS) a été trouvée significativement inhibée par l'extrait. En outre, des niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF- α et IFN- γ et de protéines de phase aiguë, la protéine C réactive (CRP) chez des souris produites par injection de LPS ont été inhibées de manière significative par l'extrait.

L'application topique d'un extrait éthanolique à 70% de fleurs à des souris à une dose de 1,2 mg / oreille (correspondant à 4,16 mg médicament brut) réduit l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton. L'application externe d'un extrait de dioxyde de carbone de fleurs (300 mg / cm²) supprime l'œdème de l'oreille chez la souris induit également par l'huile de croton (Della et *al.*, 1994 in Singh et *al.*, 2011).

2.1.3. Activité anti-oxydante :

Les propriétés anti-radicalaires de produits naturels sont souvent liés à leur aptitude à façonner les radicaux stables (Rice-Evans et *al.*, 1996). Jusqu'à ce jour, plusieurs études décrivant l'activité anti-oxydante dans les différents essais ont été rapportées sur l'espèce *C. officinalis* en particulier.

Par exemple; l'extrait butanolique de *C. officinalis* a une forte activité de piégeage des radicaux d'hydroxyle et de super oxyde (Cordova et *al.*, 2002 in Rigane et *al.*, 2013). Dans une autre étude sur *C. arvensis* et *C. officinalis* croissante en Serbie-et-Monténégro, où le potentiel de piégeage a été mesuré comparativement contre le DPPH, l'hydroxyle et les radicaux pyroxyles. les extraits obtenus à partir de ces deux espèces ont piégés tous les radicaux de manière dépendante de leurs concentration, bien que la meilleure activité anti-oxydante a été démontrée par l'extrait aqueux de *C. officinalis* à 0,75 mg/ml (Cetkovic et *al.*, 2004 in Rigane et *al.*, 2013).

Dans une étude similaire, Danila et *al.*, en 2011, ont testé les extraits aqueux et alcooliques de plusieurs espèces de plantes en provenance de Roumanie, y compris *C. officinalis* pour leur activité anti-oxydante. Dall'acqua et *al.*, en 2008, ont étudié l'activité anti-oxydante de onze espèces végétales utilisées dans la médecine traditionnelle (y compris *C. arvensis*), utilisant le

test de piégeage des radicaux par le DPPH et *C. arvensis* a été trouvé pour classer 7^{ème} parmi les espèces végétales testées en terme d'effet de piégeage des radicaux vers DPPH (Danila et al., 2011; Dall'acqua et al., 2008 in Rigane et al., 2013).

Les travaux réalisés par Rigane et ses Coll., en 2013, montraient que l'effet de piégeage des extraits hydro-méthanoliques et de standard sur le radical DPPH exprimés en valeurs IC50, était dans l'ordre suivant: les fleurs (0,35 mg.ml⁻¹), les feuilles (0,57 mg.ml⁻¹) et le BHT (8,11 mg.ml⁻¹). Ces données révèlent que les extraits de différentes parties ont probablement un effet plus fort de piéger les radicaux libres que le contrôle positif (BHT). Il semble qu'il y ait une corrélation entre le contenu de la plante en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité anti-oxydante.

L'extrait aqueux de *C.officinalis* à la concentration de 100 µg / ml a montré des activités anti-radicalaires et anti-oxydantes par un taux d'inhibition de 74,6% de la peroxydation lipidique d'acide linoléique, cette activité est supérieure à d'autres concentrations (25 et 50 µg / ml) et à celle de l'α-tocophérol (63%) qui a été utilisé comme un standard (Kassim GHaima et al., 2013).

2.1.4. Activité hépato protective :

Le foie joue un rôle vital dans le maintien de la santé et en même temps il est très sensible aux maladies et aux blessures, en raison de son rôle central dans le métabolisme des xénobiotiques, également son emplacement au sein dans le portail circulatoire, et sa structure anatomique et physiologique. (Jones, 1996 ; Cubero et Nieto, 2006 ; Ajith et al., 2007 in Hussein et al., 2010).

Aujourd'hui, de nombreux chercheurs se sont concentrés pour la recherche de la meilleure approche dans le traitement des maladies du foie en utilisant les préparations à base de plantes médicinales.

L'effet de l'extrait méthanolique des feuilles de *Calendula officinalis* à 80% a été étudié contre les lésions hépatiques induites par l'acétaminophène dans chez les rats mâles albinos. L'acétaminophène à la dose de 1 g / kg produire une mortalité à 100% chez les rats, tandis que le prétraitement des rats avec l'extrait de *Calendula officinalis* (1,0 g / kg) a réduit la mortalité à 30%. Et le post-traitement avec trois doses successives de l'extrait des feuilles (500mg / kg. 6 horaire) restreint l'atteinte hépatique induite par l'acétaminophène (Jamshed et Khan, 2006 in Singh et al., 2011).

Les effets hépato-protecteurs des extraits de *Morus alba* et *Calendula officinalis* ont été évalués contre la cytotoxicité et le stress oxydatif induit par le tétrachlorure de carbone

(CCL₄) dans les hépatocytes primaires de rat. Ces dernières ont été isolées par perfusion de collagénase. La cytotoxicité a été déterminée en évaluant la viabilité des cellules et la perte des enzymes cytosoliques, tels que l'alanine amino-transférase (ALT), l'aspartate amino-transférase (AST) et l'acétate déshydrogénase (LDH).

L'exposition des hépatocytes isolés de rat à CCL₄ cause une cytotoxicité et une oxydation qui se manifeste par la perte de la viabilité cellulaire et une augmentation significative d'ALT, AST et LDH. La pré-incubation d'hépatocytes avec les extraits de *M. alba* et *C. officinalis* amélioré l'hépto-toxicité et le stress oxydatif induit par le CCL₄, par une amélioration significative de la viabilité des cellules et la perte des enzymes (ALT, AST et LDH). De plus, une amélioration significative de la teneur en GSH et la diminution significative de la formation de TBARS par rapport aux cellules traitées par le CCL₄ (Hussein et *al.*, 2010).

2.1.5. Activité anti-HIV :

Les extraits de fleurs de *Calendula officinalis* ont été prouvés pour leur capacité à inhiber la réplication du virus de l'immunodéficience humain de type 1 (HIV-1). Les résultats montrent que les extraits organiques et aqueux sont relativement non toxiques pour les cellules lymphocytaires Molt-4, et seulement la phase organique présentait une puissante activité anti-VIH *in vitro* dans un dosage basé en MTT ketrazolium. En outre, en présence de l'extrait organique (500 pg / ml), les cellules non infectées Molt -4 ont été complètement protégées jusqu'à 24 h à partir de la fusion et la mort provoquée par une co-culture avec les cellules infectées 937/HIV-1. L'extrait organique des fleurs a également provoqué une réduction significative du temps de transcription inverse (RT) du HIV-1 (Kalvathev et *al.*, 1997).

2.1.6. Activité cicatrisante :

L'application externe d'un extrait hydro-alcoolique a accéléré la vitesse de contraction et épithélialisation des plaies d'excision chez le rat. Un extrait aqueux lyophilisé à 3% des fleurs induit une vascularisation dans l'essai de membrane chorio-allantoïde de poussin. Des coupes histologiques des membranes chorio-traités ont également indiqué la présence de l'acide hyaluronique, un glycosaminoglycane tissulaire associée à la néo-vascularisation (Rao et *al.*, 1991; Kfm et *al.*, 1996 in Meenatchisundaram et *al.*, 2009).

L'huile infusée du souci (*Calendula officinalis*) est considéré comme bénéfique pour de nombreuses maladies de la peau et la reprise des tissus. Il est utilisé seulement après le traitement de l'infection. Il n'est pas utilisé sur des plaies profondes, car il est estimé qu'il peut sceller la plaie trop rapidement empêchant le drainage (Lans et *al.*, 2007 in Singh et *al.*, 2011).

2.2. Les données phytochimiques sur le genre *Calendula* :

La recherche bibliographique réalisée sur la phytochimie des espèces du genre *Calendula*, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Ce qui a permis d'isoler un grand nombre de substances connues pour leurs diverses activités biologiques, dont les plus majoritaires sont : les huiles essentielles, les flavonoïdes en particulier les aglycones et flavonols de glycosides (tels que l'isorhamnétine et la quercétine), les saponosides, les stérols, les lipides, les caroténoïdes, les acides organiques et les saccharides (Albulescu et *al.*, 2004).

L'espèce *Calendula suffruticoa subsp suffruticoa* Vhal. n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique à notre connaissance.

2.2.1. Les Huiles Essentielles :

En 2010, Paolini et Coll. présente les résultats d'une étude où quatre-vingt-cinq composants d'huiles essentielles ont été identifiés pour la première fois dans l'huile essentielle de *Calendula arvensis*, L'huile contenait une concentration élevée de sesquiterpènes, dont δ cadinene et α cadinol ont été les principaux composants. La relation entre la concentration des composés volatils et la situation géographique des échantillons a été également étudiée.

En 2008, Gazim et ses Coll., a étudié la composition chimique de l'huile essentielle des fleurs de *Calendula officinalis* L cultivée dans le sud du Brésil. Cette huile essentielle a été obtenue par trois méthodes d'extraction qui sont la distillation à la vapeur (SD), la micro extraction (HS-SPME) et l'extraction en espace vide-froid (HS-CF).

Les composés majeurs présents dans la fraction volatile des fleurs de *C. officinalis* étaient δ -cadinène (22.5, 22.1 et 18.4%) et γ -cadinène (8.9, 25.4 et 24.9%), tandis que l' α -cadinol (20.4%) a été seulement identifié dans les échantillons extraits par la distillation à la vapeur. Petrovic et coll. (2007) présente la composition chimique de l'huile essentielle des fleurs de *C. officinalis* de la Serbie, obtenue par la méthode de CO₂ supercritique. La teneur de l'huile essentielle obtenue était de 0.050 %, et les principaux constituants détectés dans cette huile par la GC-MS et GC-FID sont : l' α cadinol (26.54%), T-cadinol et T-muurolol (9.80%), γ cadinene (2.99%), l'acide hexa-décanoïque (2.95%), et ledane (2.45%).

2.2.2. Les saponines :

Une étude chimique sur l'extrait méthanolique fractionné des parties aériennes de *C. arvensis* a permis d'isoler une nouvelle saponine tri-terpénique : l'arvensoside (**1**) et l'identification de quatre autres saponines tri-terpéniques connus à squelette oléanane. Trois glycosides flavonol connus ont été également obtenus et leurs structures ont été élucidées. Il s'agit de l'isorhamnétine 3-O- β -D-glucopyranoside (**2**), la quercétine 3-O- β -D-glucopyranoside (**3**) et la quercétine 3-O- β -D-galactopyranoside (**4**) (Kirmizibekmez et al., 2006).

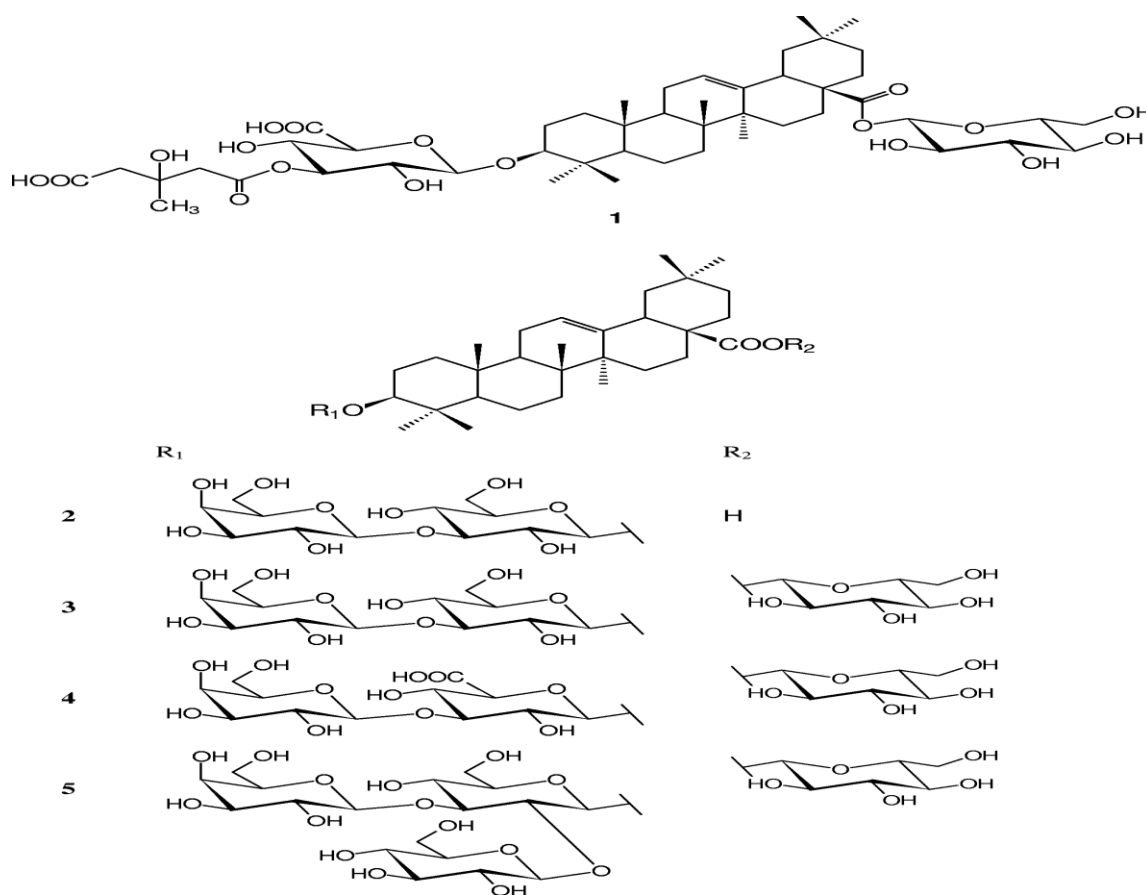


Figure 06: Saponines triterpéniques isolés à partir de *C. arvensis*.

(Kirmizibekmez et al., 2006)

2.2.3. Les caroténoïdes :

Les espèces du genre *Calendula* accumulent de grandes quantités de caroténoïdes dans leurs inflorescences (Khalid et Da silva, 2012).

Les caroténoïdes sont des composés biologiquement actifs, ils sont importants pour l'homme en tant que précurseurs de la vitamine A et les rétinoïdes. Aujourd'hui, de nombreux caroténoïdes sont utilisés comme des colorants dans l'industrie alimentaire (Sausserde et Kampuss, 2014).

La composition des caroténoïdes dans les fleurs de *Calendula* a récemment commencée à être explorée. Dans une étude récente sur quatre variétés sélectionnées des fleurs du *Calendula officinalis* qui sont le Double Esterel Orange, le Radio Extra sélectionné, le Bonbon Abricot et le Double Esterel Jaune, la teneur en caroténoïdes totaux a été évaluée par spectrophotométrie et les pigments ont été séparés par des méthodes chromatographique (CC, TLC, HPLC).

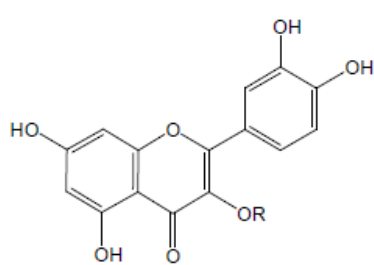
La teneur en caroténoïdes était plus élevée dans les variétés de fleurs oranges, elle est de l'ordre de 276 mg/100 g pour la variété Double Esterel Orange et 111 mg/100 g pour la variété de fleurs Radio. Les principaux pigments identifiés sont: le flavoxanthin, la lutéine, le rubixanthin, β -carotène, le γ -carotène et le lycopène (Pintea et *al.*, 2003).

2.2.4. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes rassemblent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Camilleri et Snoussi, 2012). Largement répandus chez les végétaux, ce sont des pigments quasiment universels qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Roux et Catier, 2007).

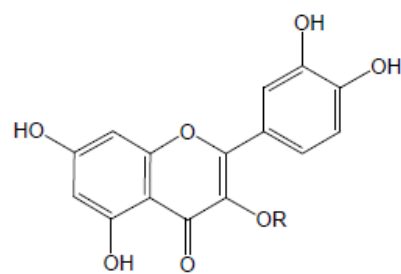
Les flavonoïdes dans les fleurs de l'espèce *Calendula officinalis* sont largement étudiés par plusieurs chercheurs, ils sont présents essentiellement sous forme de flavonols glycosides, isorhamnétine et quercétine aglycone (Fig.07). Selon la littérature, les flavonols représentent 0.3 à 1.5% des fleurs de *Calendula* (Vidall-Ollivier et *al.*, 1989 in Wilen et *al.*, 2004).

Les flavonoïdes décrits à ce jour pour l'espèce *C. officinalis* sont quasiment toujours des flavonols glycosides tels que l'isorhamnétine (3 Métoxi-4', 3, 5, 7-tetrahydroxyflavone), l'isorhamnétine-3-O-glucoside, la rutine, la quercétine-glucoside, la quercétine-neohesperoside et la quercétine-2G-rhamnosil-rutinoside (Albulescu et *al.*, 2004).



R: - H= Isorhamnetin

R: - Glu = isorhamnetin-3-O-glucoside



R: - H = quercetin

R: - Ru = quercetin-3-O-rutinoside

R: - Glu = quercetin-3-O-glucoside

Figure 07 : Les structures de certains flavonols et flavonoïdes dans les fleurs de souci.

(Albulescu et *al.*, 2004)

PARTIE II

Matériels et méthodes

1. Matériel :

1.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué des sommités fleuries, feuilles, tiges et racines des deux plantes médicinales : *Calendula suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L. Les plantes ont été récoltées en pleine floraison et fructification, entre les années 2014 et 2015, dans la région de l'Edough à Seraidi, wilaya d'Annaba.

Les échantillons que nous avons prélevés, étaient au stade de pleine floraison et fructification. La récolte a été réalisée dans la période allant du mois de Février 2014 au mois de Mai 2015, de deux stations de la région de l'Edough (Cap de fer et Cap de garde). Les prélèvements ont été faits manuellement et au hasard au niveau des deux stations.

L'identification botanique de ces espèces a été faite selon la flore de Quezel et Santa, (1962-1963) et validé par le Docteur Hamel. T, enseignant-chercheur en Physiologie Végétale au Département de Biologie de l'Université d'Annaba, Algérie.

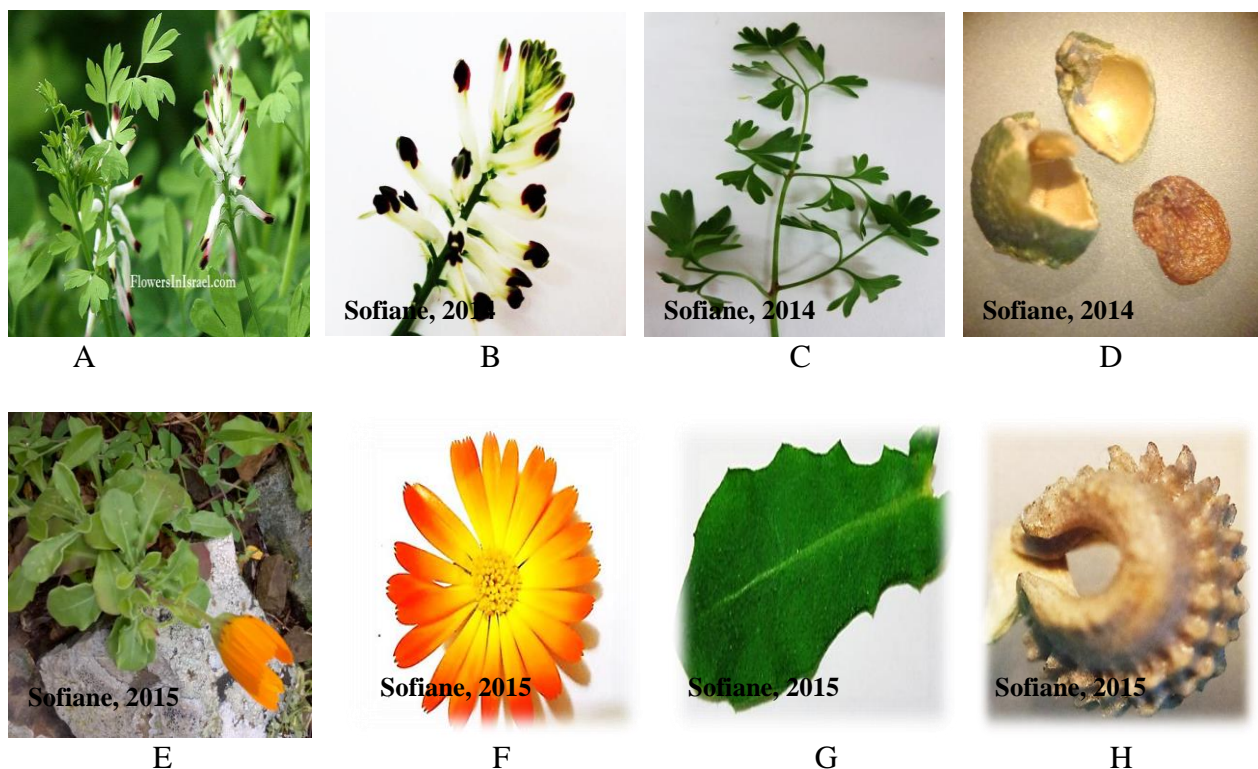


Figure 08 : Morphologie des 2 espèces.

(A) Aspect général de *Fumaria capreolata* L. (B) : fleur, (C) : feuille, (D) : fruit et graine, [G : X4]. (E) : Aspect général de *Calendula suffruticosa* Vhal (F): fleur. (G): feuille, (H) : graine, [G : X4].

1.2. Matériel animal et conditions d'élevage :

L'étude pharmacologique a été réalisée sur des souris albinos de souche Swiss, de poids variant entre 20.30 et 26.70 g. Ces animaux (mâles et femelles) forment une population relativement homogène puisqu'ils proviennent de l'animalerie du Centre de Recherche et Développement (CRD SAIDAL, Alger). Après une période d'acclimatation (02 semaines) les souris sont séparées aléatoirement en groupe de 6 dans des cages en polypropylène (32cm x 20cm x 13cm), elles ont été élevées dans un local d'espace moyen de longueur de 6 m, de largeur de 3,15 m et de hauteur de 2,20 m.

Dans cette pièce la température est stable (22 ± 2 °C), la photopériode était de 12 heures et l'hygrométrie de $50 \% \pm 10\%$. La nourriture ainsi que l'eau sont données ad-libitum.

Tableau 04: Paramètres du milieu ambiant de l'animalerie (C.R.D-SAIDAL, Alger).

Température	Ventilation	Humidité	Eclairage	Bruit
22°C régulée par climatiseur	Fenêtre (2.05m x2.6m) ventilation	50 % \pm 10%	12h/ 24h Naturel et artificiel	Allées et venues limitées dans l'animalerie

2. Présentation de la zone d'étude :

2.1. La situation géographique :

La péninsule de l'Edough est formée d'un seul tenant dans l'espace forestier compris entre le Cap de Fer à l'Ouest et l'agglomération d'Annaba à l'Est. Ce massif dont l'altitude atteint 1008 m au Kef Sbaa est bordé par la méditerranée aux Nord et Nord-Est, au sud et sud- Est par le lac Fetzara et les riches plaines agricoles d'Annaba. Au Nord-Ouest par la plaine de Senhadja et les massifs de Chétaibi (DGRF, 2006 *in* Saadi, 2013).

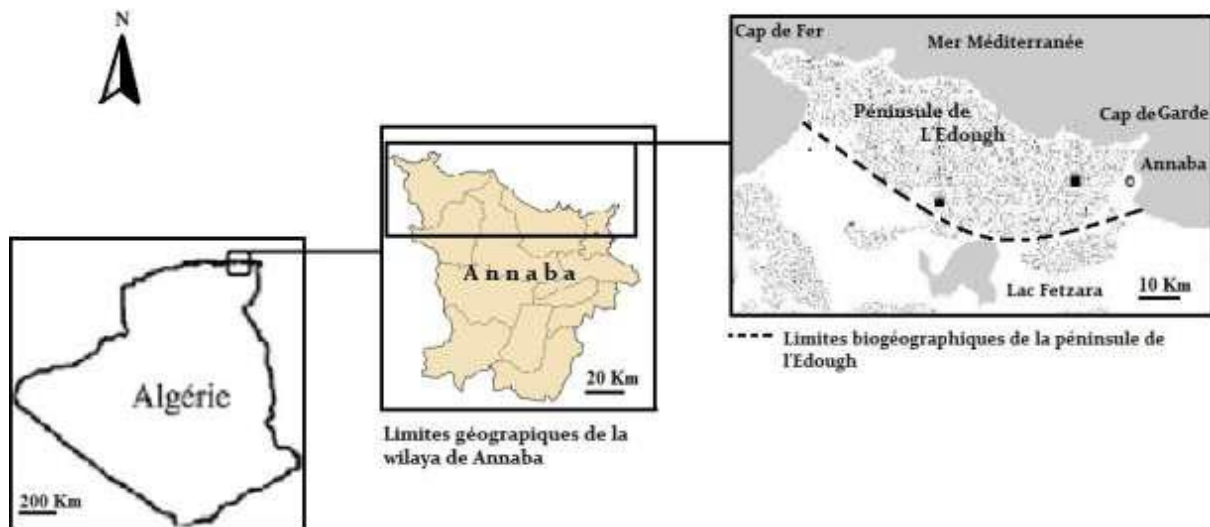


Figure 09 : Localisation géographique de la région de récolte des deux espèces étudiées (Hani *et al.*, 1997).

La région de la récolte des deux espèces se compose de deux secteurs situés aux deux extrémités respectivement Est et Ouest la péninsule de l'Edough : Cap de Garde et Cap de Fer.

➤ **Le Cap de Garde :**

Le secteur de Cap de Garde, autrefois appelé Ras el Hamra, à une altitude de 100 - 161m dominé par une exposition de Nord et Nord-Est, rochers calci-magnésiques (Toubal et Toubal, 1998); le sol est très squelettique, insaturé, dominé par la roche ; incendié, complanté en *Pinus pinaster*, très piétiné, raviné par les eaux (Hamel, 2013).

➤ **Le Cap de Fer :**

Le Cap de Fer est le dernier prolongement à l'ouest du massif de l'Edough, il appartient tout entier au terrain éruptif. Il commence à la masse importante du djebel Sidi Yahia, dont la route de Berrahal à Chétaibi, contourne le flanc oriental et se prolonge en mer par la presqu'île Takouch (Boumaza, 2012).



Figure 10 : Vues spatiales de la grotte du cap de garde et du cap de fer.

2.2. Le couvert végétal :

La flore du massif forestier de l'Edough est caractérisée par deux essences principales : le chêne-liège, qui occupe 3419 ha et le chêne zène, qui couvre en massif compacts toutes les parties humides ou fraîches des versants Nord et Est (DGRF, 2006 *in* Saadi, 2013). La flore à usage thérapeutique est relativement importante. Parmi les principales plantes figurent de nombreuses Lamiacées (qui sont largement utilisées dans la pharmacopée locale), Astéracées, Fabacées et Zygophyllacées (Hamel et *al.*, 2018)

2.3. Le sol :

L'étude pédologique de la forêt domaniale de l'Edough a fait ressortir plusieurs types de sols répartis dans les classes suivantes :

- Classe des sols peu évolués.
- Classe des sols à sesquioxyde de fer.
- Classe des sols brunifiés (DGRF, 2006 *in* Saadi, 2013).

3. Méthodes :

3.1. Traitements des échantillons :

Les échantillons récoltés ont été séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière sur les paillasses du Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement (LBVE) de l'Université BADJI Mokhtar –Annaba, pendant deux semaines, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Après séchage, les échantillons ont été pesés puis réduits en poudre fine à l'aide d'un moulin électrique. La poudre obtenue est stockés dans des flacons en verre, pour les fleurs et dans des sacs en papier pour les autres organes. Cette poudre, ou drogue végétale est réservée pour nous investigations phytochimiques et les activités pharmacologiques. Notons qu'avant le séchage une partie des deux plantes a été réservée pour l'étude histologique.



Figure 11: Séchage des plantes.

3.2. Technique histologique :

Nous avons effectué des coupes histologiques au niveau des feuilles et des tiges, selon la technique de la double coloration (vert de méthyle- au rouge Congo) comme suit (Paris et Hurabielle, 1976) :

- Réalisation de coupes transversales fines au niveau des organes (feuille et tige) à l'aide d'une lame de rasoir.
- Immersion des coupes dans de l'eau de javel, pendant 15mn.
- Traitement des coupes avec de l'acide acétique dilué pendant 1mn.
- Coloration des échantillons au vert de méthyle pendant 10mn.
- Coloration des échantillons au rouge Congo pendant 20mn.
- Observation des coupes au microscope optique (Leica DM LS2) couplé à un appareil photo (Type : SONY Cyber-shot DSC-W690).

- Nous avons effectué cette étude, afin de déterminer les différents tissus et les différents organes de sécrétion.

3.3. Screening phytochimique :

La méthode du screening par réactions en tubes, nous a permis d'identifier quelques grandes familles chimiques telles que : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les quinones, les stérols et terpènes, ...etc (Guenther, 1950 *in* Ngakegni-Limbili, 2012).

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation des composés des grandes familles chimiques présentes. Celle-ci est effectuée sur les broyats des végétaux secs et/ou frais (Guenther, 1950 ; Boyle, 1955 *in* Ngakegni-Limbili, 2012).

Ces tests préliminaires ont été réalisés selon les techniques de Solfo (1973) et Harborne (1989).

Le tableau 05, indique les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

Tableau 05 : Réactifs utilisés dans la caractérisation des groupes chimiques.

Groupes chimiques	Réactifs	Composition du réactif	Résultats positifs
Alcaloïdes	Draragendorf	Nitrate de bismuth + acide acétique	précipité rouge orangé
	Mayer	iodure de potassium + chlorure de mercure	Précipité jaunâtre
Flavonoïdes	Shinoda	Ethanol 95 °+ HCl (N/2) + (Mg ou Zn)	coloration orangée, rouge ou violette
Stéroïdes et Terpénoïdes	Lieberman Bouchard	Anhydride acétique + d'acide sulfurique	coloration violette - bleue ou verte
Tannins	FeCl ₃ 1 %	FeCl ₃ à 1 %	coloration bleu-foncée, verte ou noire.
Quinones	Bornstraëgen	/	coloration rouge ou violette
Anthocyanes	HCl à 20%		coloration rose à froid, rouge-orangé à chaud
Saponosides	H ₂ O distillée		Indice Mousse (IM) : test positif si IM>100

3.4. Techniques d'extractions :

3.4.1. Préparation de l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal. :

L'extraction a été réalisée selon la procédure décrite par Rigane et al., (2013).

Les différents organes de *C. suffruticosa* Vhal., préalablement nettoyés et broyés, sont mis à macérer dans l'éthanol à 90 % (150 ml), sous agitation à 350 tours par minute à 35 ° C pendant 24 h. L'extrait éthanolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre, l'éthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un évaporateur rotatif, permettant d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur vert foncée (vert noirâtre), qui est considéré comme étant l'extrait brut. Ce dernier est conservé dans un flacon ambré à 4 °C jusqu'au moment des analyses phytochimiques et de l'évaluation des activités biologiques.

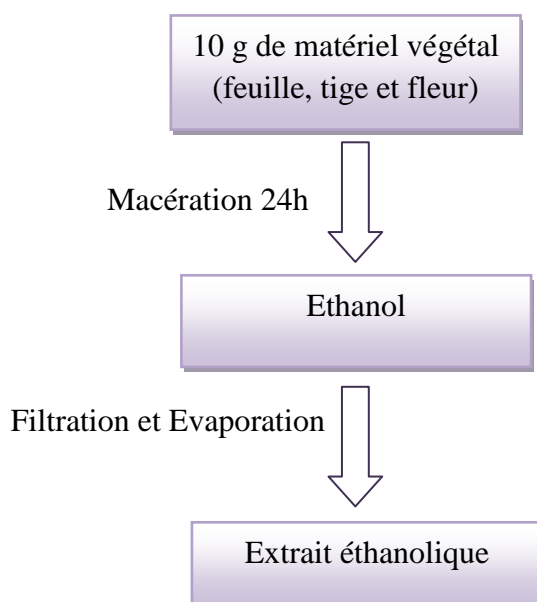


Figure 12 : Schéma des différentes étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce *Calendula suffruticosa* Vahl.

3.4.2. Préparation de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. :

L'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. a été préparé selon la méthode de Rehman et al., 2010.

10g de la drogue végétale en poudre (feuille, tige et fleur) et 150ml de l'éthanol à 90 % ont été placés dans un appareil soxhlet à 40 °C pendant une période de 150 min (onze cycles d'extraction). L'extrait a été filtré et évaporé à sec sous pression réduite, ce dernier est considéré comme étant l'extrait brut.

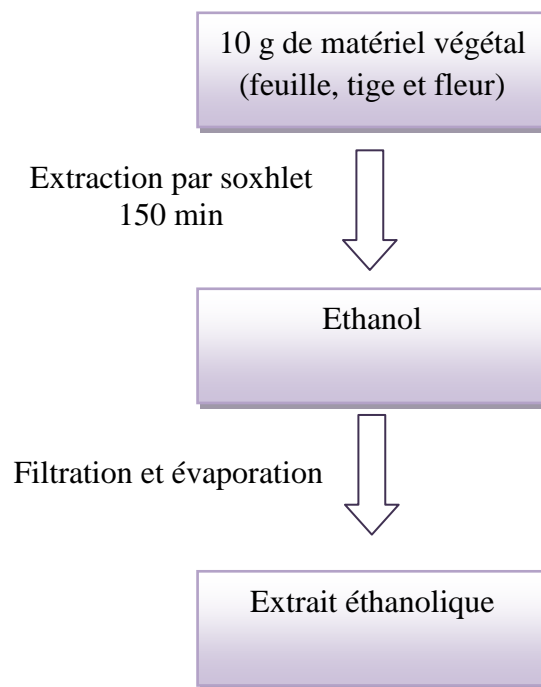


Figure 13 : Schéma des différentes étapes d'extraction des parties aériennes de l'espèce *Fumaria capreolata* L.

3.5. Techniques de dosage :

3.5.1. Dosage de composés phénoliques totaux des extraits éthanoliques de *C. suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L. par colorimétrie :

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3) (Ribereau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005).

La méthode que nous avons pu adapter à notre matériel végétale, décrite par Juntachote et al., en 2006.

0.5ml de l'extrait éthanolique des deux plantes (*F. capreolata* L. et *C. suffruticosa* Vhal.) dilué dans 5 ml d'eau distillée a été mélangé avec 0.5 ml du réactif de Folin Ciocalteu (FCR) dans un tube à essai. Ensuite 0.5 ml de la solution carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) à

20% (poids/volume) a été ajouté au mélange. Après incubation du mélange réactionnel pendant 1 heure à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été déterminée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE/g). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

3.5.2. Dosage des flavonoïdes de l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa* Vhal.:

La teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de l'espèce *C.suffruticosa* Vhal. a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996). À 1 ml d'échantillon ou de la solution de quercétine (préparé dans le méthanol) avec dilutions convenables, est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 415 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

3.6. Méthode d'analyse des extraits par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Spectre de Masse (GC/MS) :

Les constituants des extraits éthanoliques de *C. suffruticosa* et *F. cpareolata* ont été identifiés par GC/MS au niveau du Laboratoire de Mass Spectrometry de l'Institut de Technologie Chimique (ITQ) de Valencia (Espagne). L'analyse a été réalisée par un chromatographe à phase gazeuse du type Shimadzu couplé à un spectromètre de masse. La colonne capillaire était du type QP 2010 S de 25 m longueur et le diamètre de 0.25 mm. Le débit du gaz porteur (hélium) était de 1ml / min. 3µl de l'extrait a été injecté en utilisant le mode splitless. La température de la colonne a été maintenue à 90°C pendant 10 min puis augmentée de 20°C par min jusqu'à 220°C et enfin de 4°C par min jusqu'à 300°C pour 20 min.

Le mode d'ionisation était par impact électronique et l'intervalle de balayage était compris entre 40 et 620 (m / z). Les spectres de masse obtenus étaient à 0-2 minutes d'intervalle.

L'identification des composés des deux extraits a été effectuée à l'aide de la base des données de l'Institut National des Normes et de la Technologie (NIST) et la base des données Wiley spectra.

3.7. Fractionnement et Purification de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. :

L'étude phytochimique et la purification de l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. a été effectuée au niveau du Laboratoire de Pharmacognosie de la faculté de Pharmacie de l'Université de Valence, Espagne.

En premier temps, l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. a été fractionné par le dichlorométhane et l'HCl à 5%, après cette extraction liquide/ liquide on a obtenu deux phases : une phase organique de dichlorométhane et une autre aqueuse acide.

1. Traitement de la phase organique : la première phase de dichlorométhane que nous avons obtenue a été séchée par le sodium de sulfate anhydre (Na_2SO_4), après filtration et évaporation on a obtenu une phase organique dite (Phase A).

2. phase aqueuse d'HCl à 5% : cette phase a été basifiée par l'ammonium concentré (NH_4OH) jusqu'à l'obtention d'un pH basique, puis elle a été extraite plusieurs fois avec le dichlorométhane. Après cette extraction liquide-liquide on obtient deux autres phases :

- Une phase organique de dichlorométhane : cette dernière a été séchée par le sodium de sulfate anhydre (Na_2SO_4), et après filtration et évaporation on a obtenu un extrait des alcaloïdes totaux, cette phase est dite (Phase B).
- Une phase aqueuse basique : a été extraire plusieurs fois avec l'acétate d'éthyle jusqu'à l'obtention d'un extrait organique, cette phase est dite (Phase C).

La figure 14, montre les différentes étapes de traitement, fractionnement et purification de l'extrait éthanolique du *Fumaria capreolata* L.

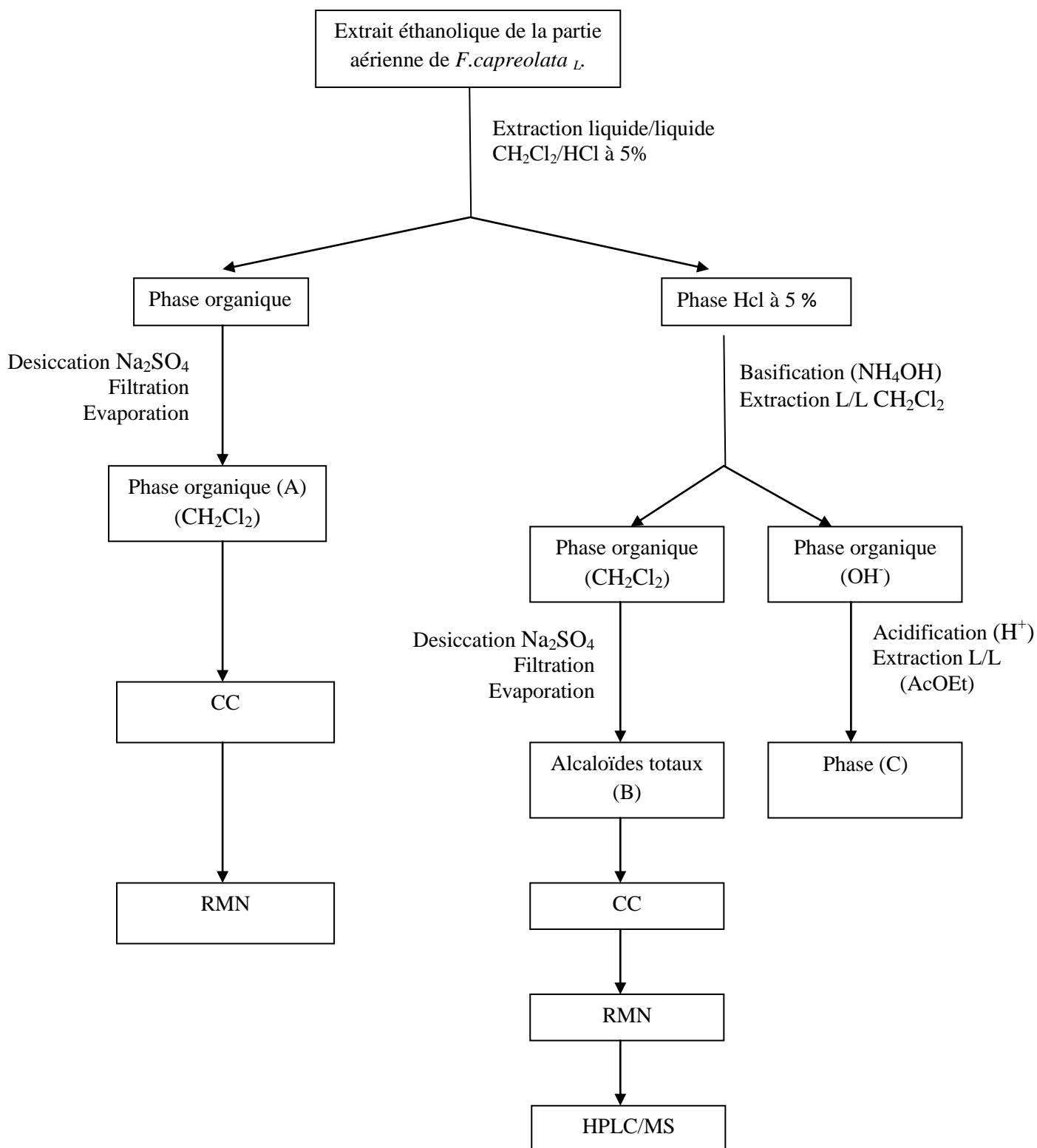


Figure 14 : Schéma des différentes étapes de traitement et fractionnement de l'extrait éthanologique de *Fumaria capreolata* L.

3.7.1. Purification des deux phases :

Dans notre étude phytochimique, nous avons utilisés les techniques chromatographiques suivantes :

3.7.1.1. Les techniques chromatographiques :

3.7.1.1.1. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) :

Au début, l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. a été analysé par une chromatographie analytique sur couche mince (CCM) pour mettre au point le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats. Ensuite, Les chromatographies sur couche mince ont été employées dans le suivi et le contrôle des purifications des différentes fractions, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et le degré de pureté des composés étudiés.

Les analyses par chromatographie sur couche mince ou CCM ont été effectuées sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 F254 (MARCHERY-NAGEL).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire de solvants.

Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont adaptés aux besoins spécifiques de chaque analyse.

Les systèmes de solvants utilisés sont les suivants (les proportions sont données en volume et ils sont classés par polarité croissante) :

- **Extraits apolaires** : Dichlorométhane/Méthanol (9:1)
- **Extraits polaires** : Dichlorométhane/Méthanol (9.5:0.5) (9.8:0.2)
Hexane/ Acétate d'éthyle (4 :6) (2 :8)

Les CCM sont analysées en lumière visible et sous U.V. (254 et 356 nm), avant et après révélation par des réactifs appropriés. L'utilisation de différents réactifs permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes, et aussi d'obtenir des renseignements supplémentaires sur le type d'une molécule (cas de réactifs spécifiques). Les fractions sont ensuite séchées sous pression réduite.

Tableau 06 : Principaux réactifs utilisés pour la révélation des CCM.

Réactifs	Substances révélées	Mode de préparation et d'utilisation
Anisaldéhyde sulfurique (Deleu-Quettier 2000)	Réactif polyvalent	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Préparer une solution de <i>p</i>-anisaldéhyde à 0,5% dans un mélange CH₃OH/Ac OH/H₂SO₄ (85:10:5). ➤ Pulvériser sur la plaque. Après chauffage intense, les composés organiques apparaissent sous forme de taches colorées en lumière du jour.
Mounir	Révéléateur des alcaloïdes	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Préparer 10 ml de la solution mère de l'anicianidure et 20 ml de l'acide acétique et on complétant j'jusqu'à 100 ml par l'eau distillé. ➤ Pulvériser sur la plaque : les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches de couleur orangé en lumière du jour.

3.7.1.1.2. La Chromatographie sur Colonne ouverte (CC) :

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, les deux phases A et B provenant de l'extraction liquide / liquide de l'extrait éthanolique de l'espèce *Fumaria capreolata* L. ont été mis en œuvre dans des colonnes en verre.

La taille, le diamètre de la colonne, le débit de la phase mobile et le volume des fractions récupérées ont été adaptés à la quantité et à la nature des échantillons à purifier.

Au cours des différentes opérations de séparation et de purification, la phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale de type (60, 230-400 mesh ASTM). L'élution est réalisée par simple gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait à lieu sous forme solide. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

Le tableau 07, représente les conditions opératoires que nous avons utilisées dans le fractionnement de la phase organique (phase A), la phase des alcaloïdes totaux (phase B) et des trois fractions (A, B et C) issus du fractionnement de la phase des alcaloïdes totaux.

Tableau 07 : Les conditions opératoires de fractionnement des différentes phases de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L.

La matière primaire	Le poids (mg)	Le diamètre de la colonne (mm)	La phase stationnaire	La phase mobile
La phase organique (phase A)	235.5	23	Gel de silice (type 60, 230-400 mesh ASTM)	dichlorométhane / méthanol
La phase des alcaloïdes totaux (phase B)	270	20	Gel de silice (type 60, 230-400 mesh ASTM)	dichlorométhane/ méthanol
La fraction A (FB3 (25-35))	31.1	10	Gel de silice (type 60, 230-400 mesh ASTM)	Hexane/ Acétate d'éthyle
La fraction B (FB5 (40-51))	11.69	10	Gel de silice (type 60, 230-400 mesh ASTM)	Hexane/ Acétate d'éthyle
La fraction D (FB 7-FB13)	147.8	20	Gel de silice (type 60, 230-400 mesh ASTM)	dichlorométhane / méthanol + 2 gouttes de NH ₃

3.7.1.2. Les techniques d'identification structurale :

3.7.1.2.1. Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

L'identification des structures moléculaires des composés isolés à partir des fractions recueillies a été faite par la résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et du carbone.

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P , et l'azote ^{15}N .

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (^1H , ^{13}C , etc...) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «le spin». La technique de RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Les échantillons sont dissous dans un solvant deutéré qui peut être du méthanol, du chloroforme, de la pyridine etc... Ces solvants possèdent des déplacements chimiques spécifiques (Tableau 08). Le tube contenant l'échantillon est soumis au champ magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à l'élucidation structurale (Boudonneu, 1990 ; Canet, 1991 *in* Lagnika, 2005).

Dans notre étude les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN 1D (RMN (^1H) et RMN (^{13}C)) ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Université de Valencia (Espagne) sur des appareils de type Brüker Avance 300, les fréquences sont de 300.13 (^1H) et 75.47 MHz (^{13}C).

Les échantillons des différentes fractions ont été solubilisés dans les solvants deutérés chloroforme deutéré CDCl_3 , et le méthanol deutéré MeOHD (Sigma Aldrich) dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Tableau 08: Déplacement chimique (en ppm) des solvants deutérés utilisés.

Solvants	δ 1H (ppm)	δ 13C (ppm)
Chloroforme-<i>d1</i>	7,27 (1)	77,0 (3)
Méthanol-<i>d4</i>	4,87 (1), 3,30 (5)	49,0 (7)

3.8. Activités pharmacologiques des extraits éthanoliques des deux plantes étudiées :

3.8.1. Activités pharmacologiques *in vitro* :

3.8.1.1. Activité anti-oxydante :

La mise en évidence de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits éthanoliques des deux plantes étudiés a été réalisée par trois méthodes: le piégeage du radical libre DPPH, le test de blanchiment de β -carotène et la réduction du fer.

3.8.1.1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

L'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (Markowicz Bastos et *al.*, 2007).

➤ Principe:

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre stable de couleur violacée en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:

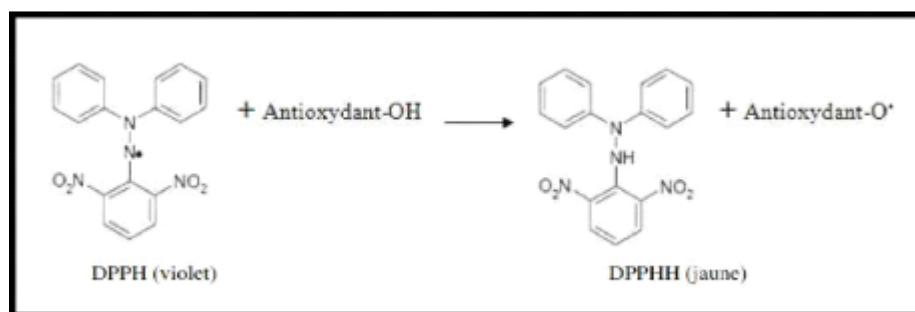


Figure 15 : Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl-1 picryl-hydrazyl) (Congo, 2012).

Où: **(AH)** représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Brand-William *et al.*, 1995).

Le protocole expérimental suivi pour mesurer l'activité du balayage du radical DPPH est celui de Benhammou *et al.* (2007).

➤ **Mode opératoire :**

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,3 mM. Dans des tubes on introduit 1ml de méthanol et 1 ml de chaque extrait (à différentes concentrations 1mg/ml dans le méthanol) et on ajoute 2ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH et de 2.5 ml de méthanol. Le BHT, BHA et l'acide ascorbique ont été utilisés comme des antioxydants synthétiques de référence.

La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Le pourcentage d'activité antioxydante a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité antiradicalaire} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

Les résultats sont la moyenne de deux mesures séparées \pm écart type.

➤ **Calcul des CI₅₀**

CI₅₀ ou concentration inhibitrice à 50% est la concentration de l'échantillon testée nécessaire pour réduire 50% du radical libre DPPH.

3.8.1.1.2. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du β -carotène (*β -carotene bleaching method*) :

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique.

La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible.

Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats (Laguerre et *al.*, 2007).

➤ **Mode opératoire :**

Le protocole expérimental suivi est celui d'Ozsoy et *al.*, (2008).

L'émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 10 ml du chloroforme, puis 1 millilitre de cette solution est mélangé avec 20 mg d'acide linoléique purifié et 200 mg du Tween 40. Le chloroforme a été complètement évaporé par un évaporateur rotatif à 40 °C et le résidu obtenu est repris par 50 ml d'eau saturée en oxygène (H₂O₂), l'émulsion résultante a été agitée vigoureusement.

Des tubes contenant 5 mL de cette émulsion sont préparés, pour lesquels, 200 μ L de solution d'extraits éthanoliques de nos plantes étudiées ou d'antioxydant de référence (BHA) à différentes concentrations sont ajoutés.

Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à t_0 contre un blanc qui contient l'émulsion sans le β -carotène. Les tubes couverts sont placés dans un bain marie réglé à 50 °C et la lecture de l'absorbance est faite après 120 minutes.

Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 millilitres de l'émulsion du β -carotène et 200 μ l d'éthanol.

➤ **Expression des résultats :**

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [1 - (A_o - A_t / A_o^0 - A_t^0)] \times 100 \text{ (Ozsoy et al., 2008)}$$

◆AA : Activité antioxydante ;

◆A^o : Absorbance de l'échantillon à t₀

◆A_t : Absorbance de l'échantillon après incubation de 120 minutes

◆A^o_o : Absorbance du contrôle négatif à t₀

◆A^o_t : Absorbance du contrôle négatif après incubation de 120 minutes.

3.8.1.1.3. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice des extraits brutes éthanologiques des deux plantes étudiés est déterminée selon la méthode de Oyaizu (1986), basée sur la réaction chimique de réduction du Fer (III) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fer (II). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

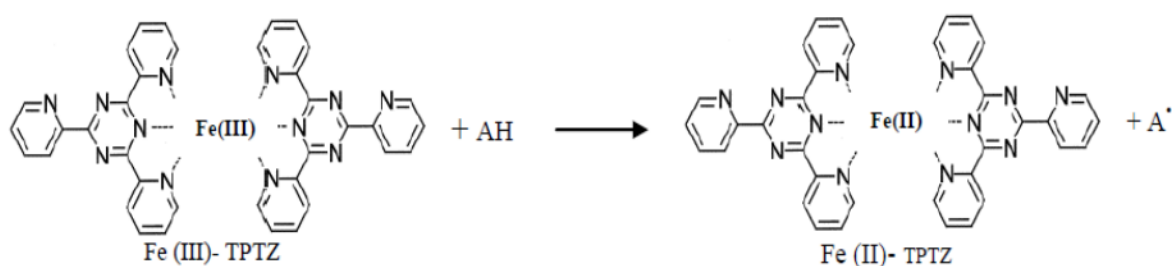


Figure 16 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH) (Djahra, 2013).

➤ **Mode opératoire :**

Les extraits brutes éthanologiques des deux plantes dilués (1ml) à différentes concentrations ont été mélangés avec 2.5ml de la solution tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 2.5ml de ferricyanure de potassium ((K₃Fe (CN)₆) à 1%). L'ensemble a été incubé à 50° C pendant 20 min. Ensuite, 2.5ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% a été additionné au mélange pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 3000 rpm. L'eau distillée

(2.5ml) et le chlorure ferrique (FeCl_3) (500 μl à 0,1%) ont été ajoutés à 2.5 ml du surnageant. La lecture des absorbances a été mesurée à 700 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

➤ **Expression des résultats :**

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

3.8.2. Activités pharmacologiques *in vivo* :

3.8.2.1. La toxicité aiguë :

L'étude de la toxicité aiguë est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le médicament. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux et fournit pour autant que cela est possible, l'indication de la DL50 avec ses limites de confiance (95 %). L'étude sur l'animal de laboratoire doit être effectuée sur un nombre égal d'animaux mâles et femelles. La durée de l'observation des animaux est précisée par l'expérimentateur. En général elle n'est pas inférieure à une semaine (Ruckebusch, 1981). La DL50 est la dose d'une substance, qui administrée à des animaux de laboratoire provoque la mort de la moitié d'entre eux (Wallace Hayes, 2008).

Le test de toxicité aiguë des extraits a été réalisé selon la méthode décrite par Rasekh et ses collaborateurs en (2008) *in* Boussahel (2011).

L'étude a été réalisée sur des souris mâles et femelles de souche Swiss pesant entre 20 et 27g. Ces derniers sont pesés, marqués et répartis au hasard en six lots. Un lot est utilisé comme témoin et les autres lots sont traités chacun par une dose unique de l'extrait testé de chaque plante.

➤ Administration

Après avoir soumis les souris à jeun, pendant 12 heures, l'administration est réalisée sur des souris mâles et femelles par gavage oral à l'aide d'une sonde rigide. La technique repose sur le principe suivant: bien tenir la souris pour qu'elle ne bouge pas lors de l'administration, puis lui faire avaler la sonde. Une fois le bout de la sonde arrive à son estomac l'extrait est injectée doucement (Fig. 17).



Figure 17 : Gavage oral des extraits de *F. capreolata* et *C. suffruticosa*.

Les doses administrées sont de 100, 200, 400, 800 et 1000 milligramme d'extrait de chaque plante par kilogramme de poids corporel de souris respectivement. Les extraits ont été repris avec de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) à un volume constant de 10 ml de solution par kilogramme de poids corporel de souris.

➤ Observations :

Après l'administration des extraits, les souris sont surveillées en permanence pendant 4 heures avec prise de notes sur les signes de toxicité apparents. Pour le reste de la période de l'expérience qui est de 14 jours les souris sont surveillées quotidiennement pour signaler s'il y a eu des morts ou des changements dans l'alimentation et la consommation d'eau ou encore des signes comportementaux ou cliniques supplémentaires de toxicité. Le jour J_{14} toutes les souris restant sont sacrifiées à la fin de l'étude et le nombre des souris déjà morts est exprimé en pourcentage.

➤ Expression des résultats :

La DL_{50} exprimée en mg/kg de poids corporel est déterminée par la méthode graphique de Miller et Tainter, (1944) et la méthode par calcul de Dragstedt et lang, (1957).

- **La méthode graphique ou méthode de Miller et Tainter (1944) :**

En général il se trouve dans chaque série d'essai une dose assez faible pour laisser en survie tous les animaux et une dose assez élevée pour tuer tous les animaux. Les pourcentages des souris morts dans chaque lot sont relevés et convertis en unités probits. Les doses correspondant à ces pourcentages sont déterminées en milligrammes par kilogramme de poids corporel. La courbe exprimant la mortalité des souris (en unités probits) en fonction du logarithme de la dose administrée (en milligrammes par kilogramme de poids corporel) est tracée. La linéarisation de cette courbe semi-logarithmique permet de déterminer la DL_{50} qui est l'abscisse du point correspondant à 50 % de mortalité (Miller et Tainter, 1944 *in* Boussahel 2011).

Pour l'estimation de l'écart type de la DL_{50} , on lit sur le graphique les doses correspondant respectivement à 16% et 84% de mortalité (probits 4 et 6); en soustrayant le premier du second, on obtient la valeur SE.

L'écart type approché est donné par :

$$SE = (\text{Log } DL_{84} - \text{Log } DL_{16}) / \sqrt{2N}$$

N étant le nombre total d'animaux dans les groupes

- **La méthode par le calcul ou méthode de Dragstedt et Lang (1957) :**

Cette méthode repose sur le postulat suivant :

- Tout animal ayant survécu à une dose qui lui aurait été administrée, survivra à toute dose inférieure à celle-ci.
- Tout animal ayant succombé à une dose qui lui aurait été administrée, succombera à toute dose supérieure à celle-ci.

Ainsi, on peut calculer pour chaque dose le pourcentage de mortalité' (M [%]) en cumulant tous les morts observés aux doses inférieures et tous les survivants observés aux doses supérieures (Dragstedt et Lang 1957 *in* Boussahel 2011).

$$M (\%) = \frac{\text{Nombre de morts cumulés}}{\text{Nombre de vivants cumulés} + \text{nombre de morts cumulés}} \times 100$$

La DL_{50} est calculée par interpolation :

$$DL_{50} = \frac{50(X_2 - X_1) + (X_1 Y_2 - X_2 Y_1)}{Y_2 - Y_1}$$

X_2 : Dose supérieure encadrant la DL_{50} ;

X_1 : Dose inférieure encadrant la DL_{50} ;

Y_2 : Pourcentage de mortalité correspondant à X_2 ;

Y_1 : Pourcentage de mortalité correspondant à X_1 .

3.8.2.2. L'activité anti-inflammatoire :

L'étude expérimentale de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode décrite par (Winter et *al.*, 1962).

➤ Principe :

Des œdèmes au niveau des pattes de souris sont induits après injection sub-plantaire d'une solution de carragénine au niveau de la patte arrière droite des souris, une heure après l'administration de l'extrait par voie orale. L'inflammation causée sera diminuée en présence de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire (Winter et *al.*, 1962).

➤ Protocole expérimental :

• Prétraitement par les extraits :

Pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits des deux plantes étudiés, deux groupes de quatre lots de six souris pesant $23.38 \pm 0.40g$ ont été utilisés. Ces souris sont de même sexe et ont été mis à jeun, 16 heures avant l'essai.

Le diamètre de la patte arrière droite de chaque souris a été mesuré avant chaque traitement, et chaque groupe reçoit par voie orale les solutions expérimentales comme suit :

1. Groupe de l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal. :

- Lot témoin (n=6) : Les souris de ce lot reçoivent l'eau physiologique (NaCl à 0.9 %).
- Lot référence (n=6) : Les souris de ce lot ont été traités avec un anti-inflammatoire utilisé en thérapeutique (dicolfénac), l'administration de l'anti-inflammatoire se fait à raison de 50 mg/Kg de PC.
- Lot EEC 200 (n=6) : L'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal. est administré aux souris par voie orale à raison de 200 mg/kg de PC.

- Lot EEC 400 (n=6) : Les souris de ce lot reçoivent l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal à la dose de 400 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0,9%.

2. Groupe de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. :

- Lot témoin (n=6) : une solution de NaCl (0.9 %).

- Lot référence (n=6) : l'anti-inflammatoire diclofénac (50 mg/Kg) dissous dans du NaCl à 0.9 %.

- Lot EEF 200 (n=6) : L'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. est administré aux souris par voie *orale* à raison de 200 mg/kg de PC.

- Lot EEF 400 (n=6) : Les souris de ce lot reçoivent l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* à la dose de 400 mg/Kg de PC dissous dans du NaCl 0,9%.



Sofiane, 2016

(a)



Sofiane, 2016

(b)



Sofiane, 2016

(c)

Figure 18 : Lotissement des souris (a et b), Administration orale des extraits (c).

• Injection de la carragénine :

Une heure après l'administration des différentes solutions, les souris de chaque groupe d'essai reçoivent une injection sub-plantaire de 0.025 ml d'une solution de carragénine à 1 % au niveau de la patte arrière droite (Fig. 19).



Figure 19 : Injection sub-plantaire de la carragénine.

➤ **Évaluation de l'activité anti-inflammatoire :**

• **Mesure de l'œdème :**

Pour apprécier l'activité anti-inflammatoire, le diamètre de la patte a été mesuré aux temps 1, 2, 3, 4, 5, et 6 heures après l'injection, à l'aide d'un pied à coulisse à affichage électronique de marque COGEX SENSEMAT (France). Donc nous avons effectué une étude cinétique de 6h avec 1h d'intervalle (Fig. 20).

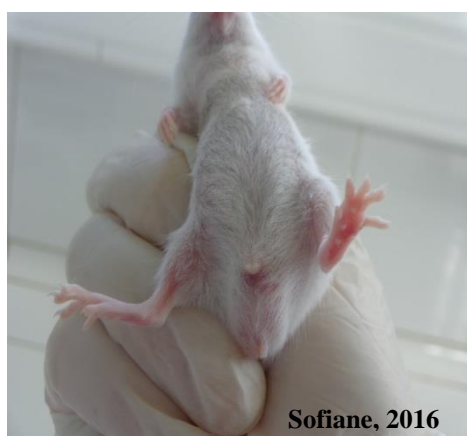


Figure 20 : Mesure du diamètre de l'œdème à l'aide d'un pied de coulisse digital.

• **Calcul du pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG) :**

Ensuite, le pourcentage d'augmentation (%AUG) de l'œdème est calculé pour chaque lot des deux groupes des souris. Il est donné par la formule suivante (Ndiaye *et al.*, 2006).

$$\%AUG = (Dn - D0) \times 100 / D0$$

Dn : diamètre de la patte la ...ième heure après l'injection de la carragénine.

D0 : diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine.

- **Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH) :**

Le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème est également calculé pour chaque lot des deux groupes de souris traitées par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante (Ndiaye *et al.*, 2006).

$$\%INH = (\%AUG \text{ témoin} - \%AUG \text{ traité}) \times 100 / \%AUG \text{ témoin}$$

3.8.2.3. Etude de l'activité analgésique : (*writhing test*)

L'étude de l'activité analgésique des extraits éthanoliques de *C.suffruticosa* et *F. capreolata* a été réalisée selon La méthode décrite par Koster *et al.*, (1951), et modifiée par Collier *et al.*, (1968).

➤ **Le principe :**

Ce test est basé sur l'injection intra-péritonéale de l'acide acétique à 1% chez la souris qui provoque un syndrome douloureux qui se traduit par des contorsions caractéristiques de type de mouvement d'étirement des pattes postérieures et du muscle dorso-ventral.

➤ **Protocole expérimental :**

- **Prétraitement par les extraits :**

Quatre lots de six souris pesant 22.27 ± 1.149 g ont été utilisés pour chaque groupe d'essai. Ces souris ont été mises à jeun 16 heures avant l'essai.

1. Groupe d'essai de l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal. :

- **Lot témoin (n=6) :** Les souris de ce lot reçoivent l'eau physiologique (NaCl à 0.9 %) 30 minutes avant l'injection de l'acide acétique à 1% par voie *ip*.

- **Lot référence (n=6) :** Les animaux de ce lot ont été traités par orale avec un analgésique utilisé en thérapeutique (l'acide acétyle salisilique) 30 minutes avant l'injection *ip* de l'acide acétique. L'administration de l'analgésique de référence se fait à raison de 200 mg/ Kg.

- **Lot EEC 200 (n=6) :** Les animaux reçoivent, par voie orale l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal. à raison de 200 mg/kg, et ceci 30 minutes avant l'injection de l'acide acétique.

- **Lot EEC 400 (n=6) :** Les animaux reçoivent, par voie orale l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa* Vhal. à raison de 400 mg/kg, et ceci 30 minutes avant l'injection de l'acide acétique.

2. Groupe d'essai de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. :

- **Lot témoin (n=6)** : Les souris de ce lot reçoivent l'eau physiologique (NaCl à 0.9 %).
- **Lot référence (n=6)** : Les souris de ce lot ont été traités par orale avec l'analgésique de référence (200 mg/ Kg) dissous dans du NaCl 0.9 %.
- **Lot EEF 200 (n=6)** : Les animaux reçoivent, par voie ip l'extrait à tester à raison de 200 mg/kg, et ceci 30 minutes avant l'injection de l'acide acétique.
- **Lot EEF (n=6)** : Les animaux reçoivent, par voie ip l'extrait à tester à raison de 400 mg/kg, et ceci 30 minutes avant l'injection de l'acide acétique.

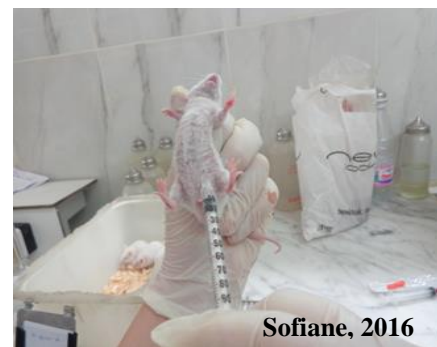
Pour les deux essais l'administration de l'aspirine et de l'extrait à étudier se fait à raison de 10ml/kg par voie orale (figure 21).

- **Injection intra-péritonéale de l'acide acétique à 1% :**

30 minutes après l'administration des différentes solutions, les souris des deux groupes d'essais reçoivent une injection intra-péritonéale de l'acide acétique à 1% (Fig. 21).



(a)



(b)

Figure 21: Administration orale des solutions de traitement (a), injection intra-péritonéale de l'acide acétique (b).

➤ **Evaluation de l'activité analgésique :**

Après l'injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5 minutes, nous avons compté pour chaque souris le nombre de torsions au cours des 30 minutes suivantes (Fig. 22).

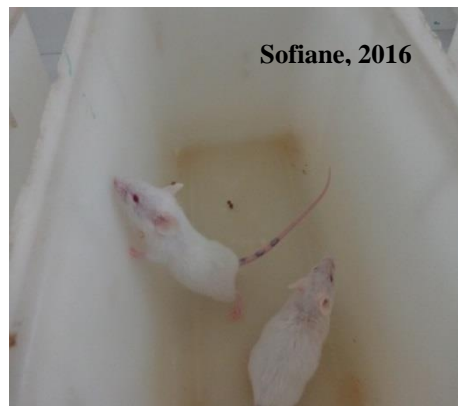


Figure 22 : comptage de nombre des crampes.

- **Calcul du pourcentage d'inhibition des crampes (% INC) :**

L'activité analgésique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur pour chaque groupe traité par les différentes doses de l'extrait testé, l'aspirine et l'eau physiologique.

Le pourcentage d'inhibition de la douleur pour chaque groupe, traitées par les différentes doses d'extraits et le médicament de référence, a été calculé en comparant la moyenne de groupe de souris traitées avec celle du groupe témoin ayant reçu uniquement de l'eau physiologique. Ce pourcentage d'inhibition de la douleur a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition des crampes} = [\text{Moyenne témoin} - \text{Moyenne essai}] / \text{Moyenne témoin.}$$

3.9. Méthodes d'analyse statistique :

Dans cette partie, nous présenterons les principales méthodes statistiques univariées utilisées pour traiter et analyser les données obtenues dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire et analgésique *in vivo* des extraits éthanoliques des deux plantes.

L'étude statistique a été réalisée sous la direction du Pr Tahar. A, Professeur de bio-statistique à l'université BADJI Mokhtar ANNABA.

Les données obtenues sont analysés statistiquement à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données « Minitab 16-français ».

3.9.1. Description des données :

Pour la description des différentes caractéristiques de chaque groupe étudié et de chaque lot, nous avons calculé certains paramètres statistiques de base tels que la moyenne arithmétique (\bar{x}), qui est un paramètre de position et de tendance centrale, (s) qui mesure la dispersion des données autour de la moyenne, les valeurs minimales (X_{\min}) et (X_{\max}) maximales qui donnent, toutes les deux, une idée sur l'étendue des données, et enfin, l'effectif (n) qui nous renseigne sur l'importance des données traitées.

3.9.2. Le test d'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA) :

Le test d'analyse de la variance à un critère ou à un facteur de classification consiste à comparer plus de deux moyennes de plusieurs populations à partir des données d'échantillons aléatoires simples et indépendants (Dagnelie, 2009).

La réalisation du test se fait soit en comparant la valeur de F obs. avec une valeur théorique $F_{1-\alpha/2}$ extraite à partir de la table F de FISHER pour un niveau de signification $\alpha= 0.05 ; 0.01$ ou 0.001 et pour K_1 et K_2 degrés de liberté, soit en comparant la valeur de la probabilité p avec toujours les différentes valeurs de $\alpha= 5\%, 1\%$ ou 0.1% . Selon que cette hypothèse d'égalité des moyennes est rejetée au niveau $\alpha=0.05 ; 0.01$ ou 0.001 , on dit conventionnellement que l'écart observé est significatif, hautement significatif ou très hautement significatif. On marque généralement ces écarts d'un, deux ou trois astérisques (étoiles) (Dagnelie, 2009).

Ce test a été utilisé :

- Pour comparer les diamètres de l'œdème mesurés de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa*, en fonctions de temps entre les 4 lots testés (Témoins, Référence, C200 et C400).
- Pour comparer les données de l'activité analgésique (nombre des crampes compté) de l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa*, entre les 4 lots testés (Témoins, Référence, C200 et C400).
- Pour comparer les diamètres de l'œdème mesurés de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *F. capreolata*, en fonctions de temps entre les 4 lots testés (Témoins, Référence, F200 et F400).
- Pour comparer les données de l'activité analgésique (nombre des crampes compté) de l'extrait éthanolique de *F. capreolata*, entre les 4 lots testés (Témoins, Référence, F200 et F400).

3.9.3. Le test de Tukey :

A chaque fois, que l'hypothèse d'égalité de plusieurs moyennes a été rejetée par test de l'analyse de la variance pour des facteurs fixes, nous avons utilisé le test de Tukey pour rechercher les groupes de moyennes qui sont identiques ou en d'autres termes les groupes de lots qui sont homogènes dans chaque activité.

La méthode de Tukey est une méthode qui s'applique en une seule étape, et qui est, de ce fait, d'une utilisation très facile. Elle consiste à comparer toutes les paires de moyennes à une valeur critique qui correspond à la plus petite amplitude (p.p.a.s.) de New Man et Kews calculée pour q stations (Dagnelie, 2009).

Ce test a été utilisé :

- Pour rechercher les groupes de lots homogènes dans les quatre lots testés de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des deux plantes étudiées et ceci en fonctions de temps.
- Pour rechercher les groupes de lots homogènes dans les quatre lots testés de l'activité analgésique de l'extrait éthanolique des deux plantes étudiées.

3.9.4. Le test de Dunnett :

Le test de Dunnett est toujours utilisé après avoir rejeté l'hypothèse d'égalité de plusieurs moyennes par l'analyse de la variance pour un facteur fixe.

Le principe de ce test consiste à calculer, chaque fois, la plus petite différence significative (p.p.d.s.) entre une moyenne d'un lot quelconque et la moyenne de lot de référence.

Et de rejeter l'hypothèse d'égalité des deux moyennes chaque fois que la différence en valeur absolue entre les deux moyennes est supérieure ou égale à cette p.p.d.s. (Dagnelie, 2009).

Les valeurs de $d_{1-\alpha/2}$ se trouvent dans des tables spéciales proposées par Dunnett. Elles sont exprimées en fonction des moyennes à comparer au témoin et du nombre de degrés de liberté du carré moyen (CM) qui a servi de base de comparaison lors de l'analyse de la variance. Tandis que n représente le nombre de données (ou répétitions) qui ont servi à calculer chacune de ces moyennes (Dagnelie, 2009).

Nous avons utilisé ce test pour comparer la moyenne de lot témoin avec la moyenne des autres lots pour chaque activité des extraits éthanoliques des deux plantes étudiées.

PARTIE III

Résultats et discussion

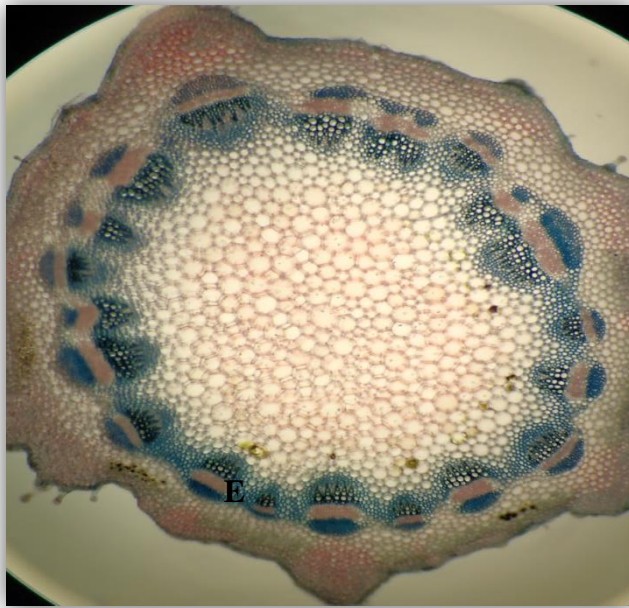
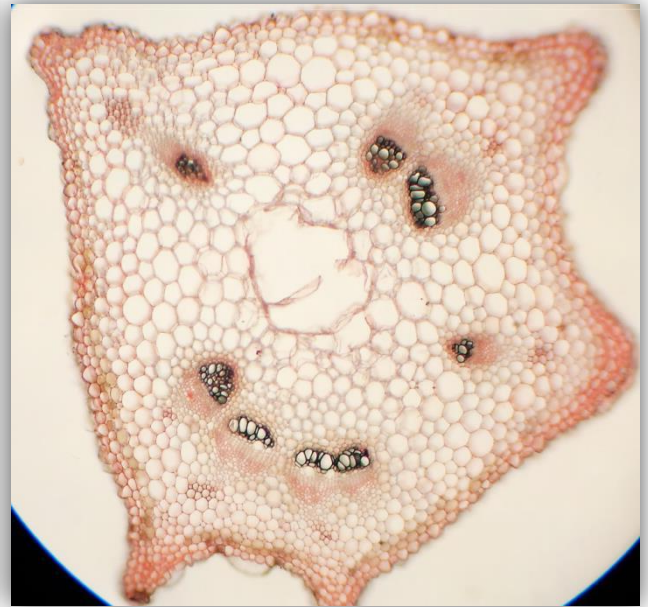
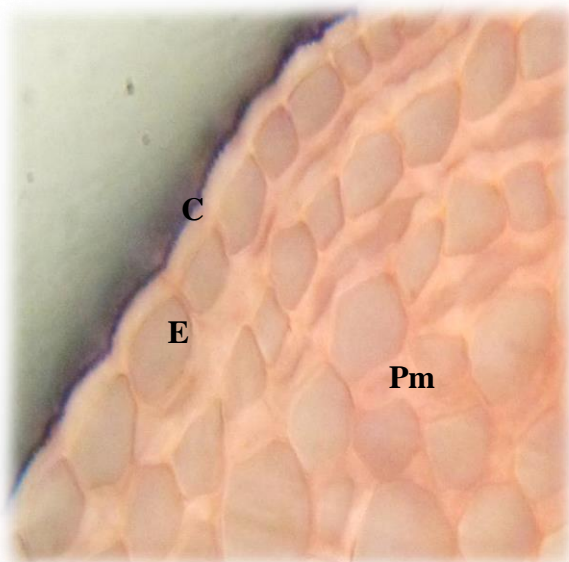
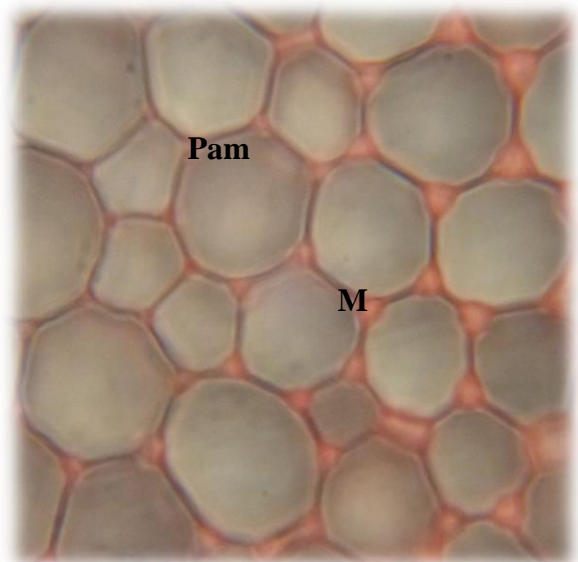
1. 0Histologie de *C.suffruticosa* Vhal. et *F.capreolata* L.:**1.1. La tige :****(A)****(B)**

Figure 23: Coupe transversale de la tige : (A) : *Calendula suffruticosa* Vhal. (B) : *Fumaria capreolata* L. (GX100)

**(D)****(E)**

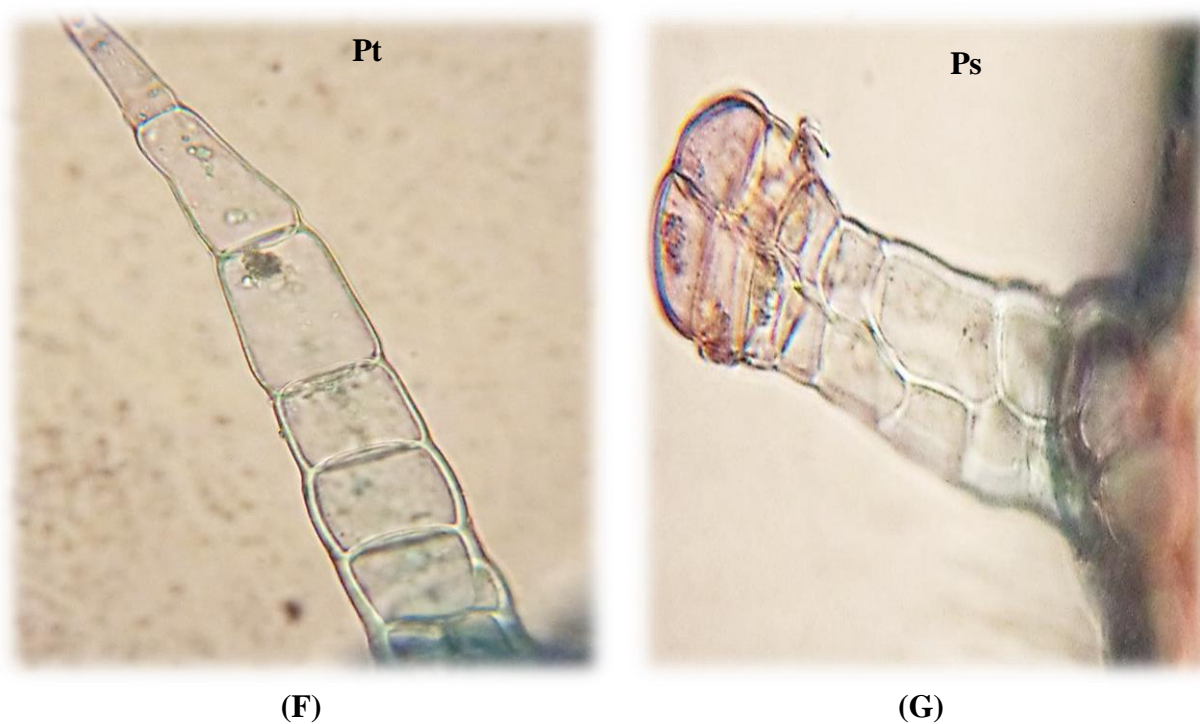


Figure 24 : Coupe transversale de la tige de *C.suffruticosa* Vhal.

(D) : cuticule (C), épiderme (E), Parenchyme médullaire (Pm).

(E) : (Parenchyme à méats (Pam), méats (M).

(F) : Poil Tecteur (Pt), (G) : Poil Sécréteur (Ps).(GX400)

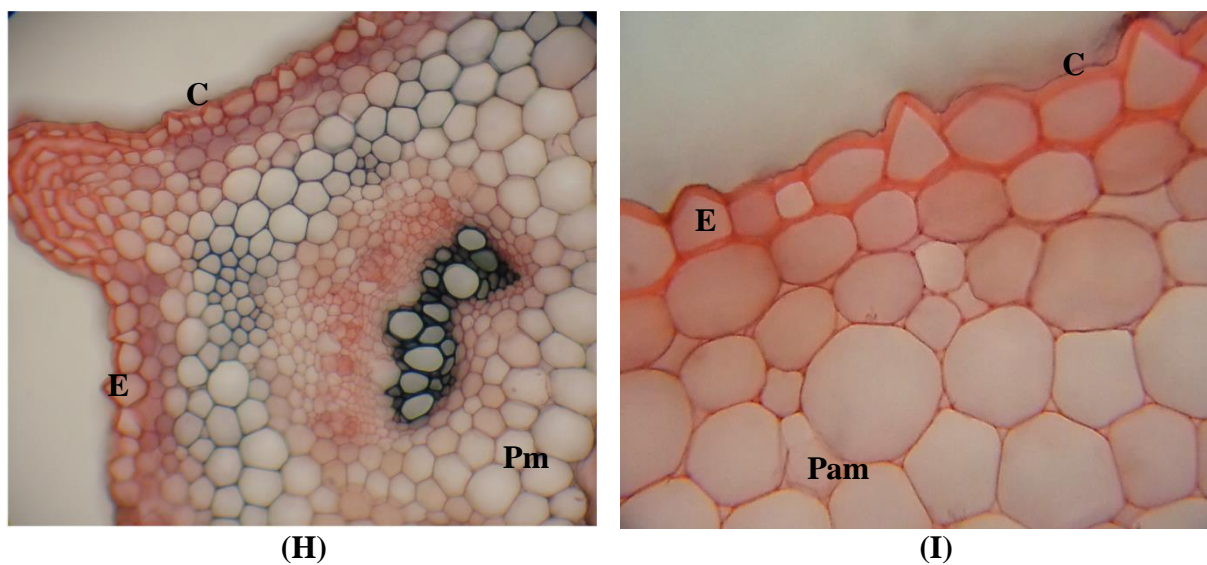


Figure 25 : Coupe transversale de la tige de *F.capreolata* L.

(H) : cuticule (C), épiderme (E), Parenchyme médullaire (Pm).

(I) : Parenchyme à méats (Pam).(GX400).

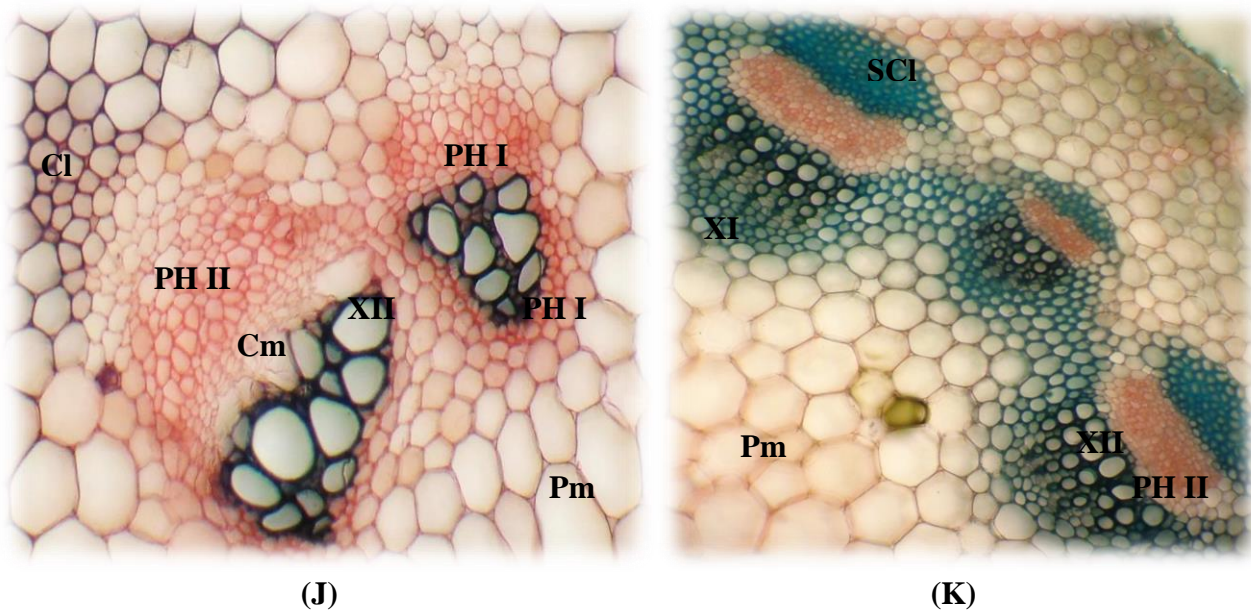


Figure 26: (J) : Les faisceaux conducteurs dans la tige de *Fumaria capreolata* L. Phloème primaire (PHI), xylème primaire (XI), Phloème secondaire (PHII), xylème secondaire (XII), Cambium(Cm), Parenchyme médullaire (Pm), Collenchyme, (CI).
Figure 26: (K) : Les faisceaux conducteurs dans la tige de *Calendula suffruticosa* Vhal. Xylème primaire (XI), Phloème secondaire (PHII), xylème secondaire (XII),: Parenchyme médullaire (Pm), Sclérenchyme (SCI). (GX400)

En coupe transversale, la tige de *Fumaria capreolata* L. présente une symétrie axiale et un contour pentagonal à cinq cotes (Fig. 23(B)). Ce dernier est très fréquent chez les espèces du genre *Fumaria* tel que *Fumaria parviflora*, *F.vaillantii*, *F. densiflora*, *F. officinalis* et *F. schleicheri* (Keshavarzi et al., 2011). Tandis que la tige de *Calendula suffruticosa* Vhal. présente une section circulaire (Fig. 23 (A)). Cette forme est présente également chez d'autres espèces de la famille des Astéracées (Wichtel et Anton, 2003).

Nous observons que les deux espèces étudiés possèdent la même organisation tissulaire. De l'extérieur vers l'intérieur, on distingue trois zones : l'épiderme, le cortex et les faisceaux conducteurs.

Les coupes transversales de la tige de *Calendula officinalis* sont composées également d'un épiderme, cortex, faisceaux vasculaires et moelle (Azzaz et al., 2007 ; Prat, 2007).

La zone externe est formée par un tissu de revêtement, l'épiderme, constitué d'une assise cellulaire à paroi cellulosique.

Ce revêtement ou cuticule est imperméable, car les cellules plus ou moins épaisses sont riches en cutine.

Au microscope optique, la tige de *F. indica* se présente sous forme quadrangulaire à pentagonale. L'épiderme le plus superficiel est uni-strate et recouvert d'une cuticule (Gupta et al., 2012 ; Srivastava et Choudhary, 2014 ; Prat, 2007) .

Nous avons remarqué que la tige de l'espèce *F. capreolata* L. est dépourvue des poils, est totalement glabre. Tandis qu'au niveau de l'épiderme de l'espèce *C. suffruticosa* nous avons observé la présence de deux types de poils (Fig. 24) :

- Les poils tecteurs (Pt) (Fig. 24 (F)) : une expansion des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la protection de la plante, notamment contre la dessiccation.
- les poils sécréteurs (Ps) (Fig. 24 (G)) : c'est une expansion des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la sécrétion des différentes substances telle que les huiles essentielles.

La deuxième zone est le cortex, composée de deux types de tissus (soutien et remplissage) :

Le parenchyme cortical, est à méats formé par trois couches de cellules ; ce nombre augmente au niveau des angles jusqu'à cinq à six couches chez *F. capreolata* L.

Les cellules parenchymateuses sont en général isodiamétriques ou allongées, plus ou moins arrondis et délimité entre eux par des méats ; Chaque cellule parenchymateuse est entourée par cinq à sept méats.

De plus vers l'intérieur nous avons observé que chez les deux espèces, la tige est renforcée par un tissu de soutien.

Dans le cas de l'espèce *F. capreolata* L. c'est le collenchyme, ce dernier est un tissu de soutien périphérique de type angulaire qui présente des épaisissements supplémentaires de cellulose aux angles de ses cellules (Bryon, 2012). Il joue un rôle important dans la croissance de l'organe (Prat, 2007). La disposition de collenchyme varie sur l'ensemble de la tige, où il apparait plus dense dans les angles que le reste de la tige.

Dans une étude comparative de l'anatomie des espèces du genre *Fumaria* en Iran, Keshavarzi et al en 2011, ont montré que la densité de collenchyme varie dans les angles par rapport à l'âge des individus étudiées.

Gupta et al. en 2012, ont montré que chez l'espèce *F. indica* les faisceaux vasculaires sont surmontés d'un tissu de soutien : le sclérenchyme.

Nous notons aussi chez l'espèce *C. suffruticosa* Vhal, la présence d'un tissu de type sclérenchyme, formé par deux à trois couche de cellule en forme angulaire.

La troisième zone est représentée par les faisceaux conducteurs, composé du xylème primaire et secondaire, du phloème primaire et secondaire et le cambium.

Dans les deux tiges, il existe un seule cercle de faisceaux vasculaire. Ceci est fréquent chez les dicotylédones ou les faisceaux conducteurs disposés en cercle autour de la moelle (Bowes et Mauseth, 2012).

Ces faisceaux sont disposés soit seuls ou en groupes de deux dans les côtés de la tige de *F. capreolata* L. Cette disposition a été montrée également chez l'espèce *Fumaria indica* par Gupta et ces collaborateurs en 2012. De la périphérie vers le centre on observe :

- Un faisceau de cellules à paroi cellullosique coloré en rouge correspond au phloème : Nous avons observé la présence du phloème primaire et secondaire, le phloème ou liber est un tissu conducteur de la sève élaboré par les feuilles (Prat, 2007).
- Un faisceau de cellules a en général une forme pentagonale ou hexagonale à parois épaisses colorées en vert : Il s'agit du xylème primaire et secondaire, tissu conducteur de la sève brute (Prat, 2007).
- Le cambium fasciculaire ou zone génératrice libéro-ligneuse: est une couche unicellulaire fine de cellules méristématiques, Il se forme à partir du pro-cambium. Il joue un rôle dans la formation de xylème secondaire ou le bois vers l'intérieur et le phloème secondaire ou le liber vers l'extérieur (Prat, 2007).

La zone centrale ou moelle. Elle est large chez l'espèce *C. suffruticosa* Vhal, et constituée par des cellules de parenchyme médullaire, ce qui explique que la tige est « pleine ». Alors que le centre de la tige de *F. capreolata* L. est creux, et la moelle est disparue.

Srivastava et Choudhary en 2014, ont observés que le cortex de la tige de l'espèce *F.indica* est divisé en deux régions où l'endoderme est absent.

1.2. La feuille :

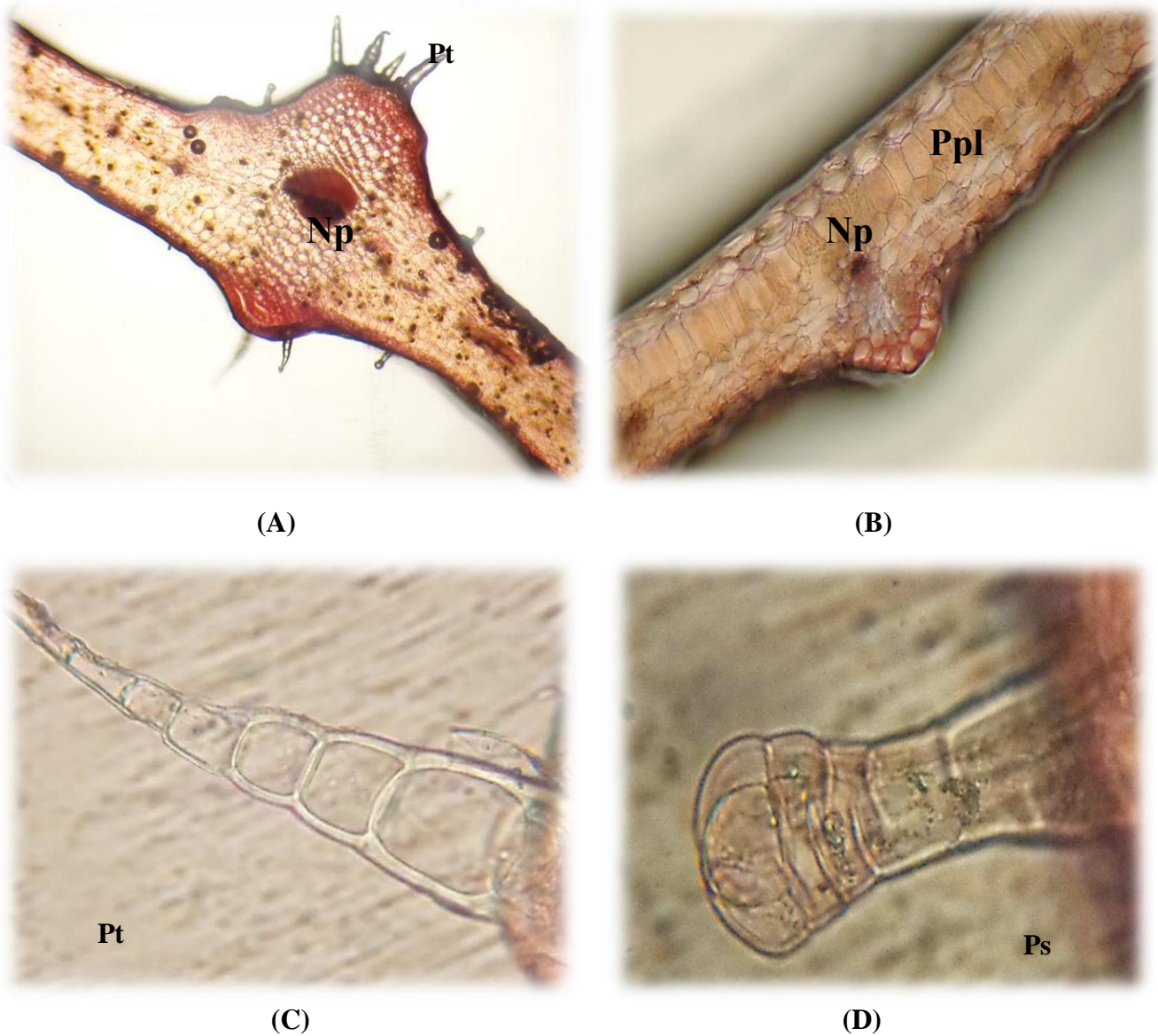


Figure 27 : Coupe transversale de la feuille.

(A) : *Calendula suffruticosa* Vhal, (B) : *Fumaria capreolata* L. (Cu) : Cuticule,
 (E) : épiderme, (P) : Parenchyme, (Np) : nervure principale, (Ppl) : Parenchyme palissadique,
 (Pl) : Parenchyme lacuneux.
 (C) : Poil tecteur de la feuille de *C. suffruticosa*.
 (D) : Poil sécréteur de la feuille de *C. suffruticosa*.

L'observation microscopique des coupes transversales des feuilles des deux plantes étudiés, nous a permis de noter la présence de deux types des poils dans la feuille de *C. suffruticosa* Vhal: les poils tecteurs qui sont des expansions des cellules épidermiques, jouant un rôle dans la protection de la plante. Les Poils sécréteurs sont aussi des expansions des cellules épidermiques, mais jouant un rôle dans la sécrétion des différentes substances naturelles. Parmi ces substances nous pouvons citer les terpénoïdes à faible poids moléculaires et d'autres huiles essentielles qui s'accumulent dans les trichomes glandulaires et les trichomes épidermiques (Alvarez, 2014 ; Sauvian et *al.*, 2013).

Ces poils glandulaires qui sont disposés à la surface de la feuille de *C. suffruticosa* Vhal. peuvent également servir d'agents de dessiccation vis-à-vis des herbivores (Hopkins, 2003).

D'autre part, nous avons noté l'absence totale de ces poils dans la feuille de *F. capreolata* L.

Les feuilles de *Calendula suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L. sont composées de la face supérieure vers la face inférieure d'un épiderme (E), constitué d'une assise superficielle constituée généralement par une seule assise de cellules.

Dans une étude sur les caractéristiques morphologique et anatomique de quelques espèces de la famille des Astéracées. Shaheen et ses collaborateurs en 2012, ont décrit des cellules de l'épiderme abaxiale et ventrale de la feuille de l'espèce *C. arvensis* qui sont de forme irrégulière, lisse, à paroi épaisse et dépourvue des trichomes et des poils.

Le mésophylle ou parenchyme est situé entre l'épiderme supérieur et inférieur de la feuille, c'est un tissu adulte d'origine primaire et secondaire qui a des fonctions de base, notamment pour la photosynthèse.

Les tissus conducteurs sont présentés par le xylème (formé de l'association de vaisseaux, il conduit donc la sève brute, minérale) et le phloème, tissu vasculaire assurant le cheminement des éléments nutritifs, il peut être d'origine primaire ou secondaire (liber).

Au microscope optique, la feuille de *F.indica* est constitué de chaque côté de l'épiderme, de cellules à parois minces de forme rectangulaire ou ovale. Le mésophylle est composé de cellules parenchymateuses à parois minces, ovales à polygonales. Les faisceaux vasculaires sont dispersés dans tout le mésophylle et les stomates sont présents sur les deux surfaces (Gupta et *al.*, 2012 ; Srivastava et Choudhary, 2014).

2. Screening phytochimique de *Fumaria capreolata* L. et *Calendula suffruticosa* Vhal. :

Les résultats du screening chimique réalisé sur l'infusé, le macéré et la poudre de *Fumaria capreolata* L. et *Calendula suffruticosa* Vhal. de l'Est Algérien sont consignés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Profil phytochimique des différents organes de *Fumaria capreolata* L. et *Calendula suffruticosa* Vhal.

Familles phytochimiques		La fumeterre <i>Fumaria capreolata</i> L.				Le souci <i>Calendula suffruticosa</i> Vhal.			
		Fleur	Feuille	Tige	Racine	Fleur	Feuille	Tige	Racine
Alcaloïdes		+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoïdes		-	-	-	-	+	+	+	+
Stérols et terpénoïdes		+	+	+	+	+	+	+	-
Tanins	galliques	+	+	+	-	+	+	+	+
	catéchiques	-	+	+	+	-	-	+	+
Quinones libres		-	-	-	-	-	-	-	-
anthocyanes		+	-	+	-	-	-	+	+
Leuco anthocyanes		+	-	-	-	-	-	-	-
Saponosides		+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon		-	-	-	-	-	-	-	-
Cardinolides		-	-	-	-	-	-	-	-
Coumarines		+	-	-	-	+	+	+	-

D'après les résultats du criblage phytochimique réalisé sur les deux espèces, nous avons pu déceler différentes familles de composés chimiques co-existantes dans les deux espèces étudiées par des réactions de coloration et de précipitation.

Le tableau 09, montre que les organes de l'espèce *Fumaria capreolata* L. renferment plusieurs groupes chimiques. Nous avons observé une présence importante des alcaloïdes, des stérols, des tanins catéchique et des saponosides, dans tous les organes de la plante. Tandis que les coumarines n'ont pu être détectés que dans les fleurs.

Nous avons noté une quasi absence des anthocyanes et leuco-anthocyanes dans tous les organes sauf dans les fleurs et les tiges de la fumeterre grimpante où ils sont présents.

Cependant le test des quinones libres, des cardinolides, des flavonoïdes et de l'amidon a produit une inférence négative pour tous les organes de la plante.

De nombreux travaux de recherche ont révélé la richesse des espèces Européennes, Asiatiques et Africaines du genre *Fumaria* en différents types d'alcaloïdes isoquinoléiques en particulier l'aporphine, le protoberberine, le protopine et le benzophenanthridine. Egalement des alcaloïdes spiro-benzylisoquinolines ont été isolés tels que fumaricine, fumariline, fumaritine, fumarophycine, *O*-methylfumarophycine et parfumine (Sousek et *al.*, 1999 ; Bentley, 2000 ; Suau et *al.*, 2002).

Maiza-Benabdesselam et ses collaborateurs (2007) en Algérie, ont identifié les alcaloïdes contenus dans les extraits méthanoliques de la partie aérienne de deux espèces algériennes : *F. capreolata* et *F. bastardi* par GC/ MS (chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse). Ils ont mis en évidence la présence d'un nombre important d'alcaloïdes tels que : stylophine, protopine, fumaritine, fumaricine, fumarophycine, fumariline et fumarofine.

Gupta et Rao (2012) dans une étude phytochimique de l'extrait méthanolique de l'espèce *Fumaria indica*, observent quatre grands groupes chimiques : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les stérols et les saponines.

Plusieurs auteurs ont également signalé la présence des tanins, des tri-terpénoïdes, des saponines et des flavonoïdes dans les différentes parties de la plante (Rahman et *al.*, 1989 in Shakya et *al.*, 2012 ; Rao et *al.*, 2007 in Shakya et *al.*, 2012 ; Gupta et *al.*, 2012).

Ces résultats confirment la présence de ces différents composés chimiques dans les organes de notre plante : *Fumaria capreolata* L.

L'analyse phytochimique réalisée sur les organes de l'espèce *Calendula suffruticosa* Vhal. a permis de constater la présence des trois grands groupes chimiques : les alcaloïdes, les flavonoïdes et les tanins galliques. Egalement la couche de mousse des saponosides a été dévoilée dans tous les organes de l'espèce étudiée. En outre, les tanins catéchiques et les anthocyanes ne semblent présents que dans les tiges et les racines de *C.suffruticosa* Vhal.

D'autre part, les quinones libres, les leuco-anthocyanes, les cardinolides et l'amidon sont absents dans toute la plante.

Plusieurs investigations phytochimiques tels que celles de Roopashree et *al.*, 2008 ; Chakraborty, 2010 ; Kirmizibekmeza et *al.*, 2010 ; Kumar et *al.*, 2010 ; Khalid et Teixeira da Silva, 2012 ; Shaheen et *al.*, 2012 ont révélé la richesse des espèces du genre *Calendula* en composés biologiquement actifs.

Les résultats des tests phytochimiques préliminaires de l'espèce *C. suffruticosa* Vhal. concordent avec ceux de Kassim Ghaima et *al.*, (2013), qui ont rapporté que le criblage phytochimique de l'extrait aqueux des fleurs de *C. officinalis* a révélé la présence des alcaloïdes, saponines, flavonoïdes, terpénoïdes, glycosides, tanins, et phénols, et l'absence des sucres réducteurs.

Il en est de même pour Muley et *al.*, (2009) qui ont prouvé par une étude phytochimique de la même plante la présence de ces composés phytochimiques, d'ailleurs doués plusieurs activités pharmacologiques comme anti-HIV, anti-inflammatoires et hépato protecteurs.

Rashmi et Goyal (2011) étudient l'activité antimicrobienne *in vitro* des extraits de l'espèce *Calendula officinalis*, et signalent la présence de nombreux composés chimiques tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpenoïdes, les triterpenoïdes, les saponines, les stérols, et les tanins.

Nos résultats sont également en accord avec ceux de Belabbes (2014), qui a travaillé sur les extraits aqueux et éthanoliques de l'espèce *Calendula arvensis* de l'ouest algérien plus précisément de la région de Ghazaouet dans la wilaya de Tlemcen, où il a révélé la présence des alcaloïdes, des saponosides, des flavonoïdes et des tanins et l'absence des coumarines et de l'amidon.

La richesse de notre plante en saponosides, a été affirmé dans plusieurs études chimiques sur des espèces du même genre comme celle de Kirmizibekmeza et *al.*, (2006), où ils ont isolé à partir de la partie aérienne de l'extrait méthanolique fractionné de *C. arvensis* une nouvelle saponine triterpénique « l'arvensoside », ils ont également identifié quatre autres saponines tri-terpéniques connus à squelette oléanane.

Les Flavonoïdes dans l'espèces du genre *Calendula* sont également, largement étudiés par plusieurs chercheurs, ils sont présents essentiellement sous forme de flavonols glycosides, l'isorhamnétine et quercétine aglycone (Vidall-Ollivier et al., 1989 in Wilen et al., 2004).

En revanche, Une analyse phytochimique de différents extraits de *C.officinalis* faite par Hussain et ses collaborateurs (2012) a montré la présence des quinones et l'absence des coumarines. Ceci ne corrobore pas avec nos résultats obtenus chez l'espèce *C.suffruticosa*.

Il est à noter que d'autres composés chimiques ont été révélés chez d'autres espèces du genre *Calendula* tels que les lipides, les acides organiques, les caroténoïdes, et les saccharides (Albulescu et al., 2004).

En conclusion, les deux espèces étudiés *F. capreolata* L. et *C. suffruticosa* Vhal. de la région de l'Edough renferment quatre grands groupes chimiques dans des proportions variées selon leurs organes. Elles constituent donc un réservoir de composés actifs potentiels dans la recherche de substances naturelles ayant des propriétés pharmacologiques importantes.

3. Rendement des extraits éthanoliques de *C.suffruticosa* Vhal. et *F. capreolata* L:

Les résultats que nous avons obtenus indiquent qu'à partir de 10g de la poudre de la partie aérienne des deux plantes *C. suffruticosa sp suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L. et 150 ml de l'éthanol et suite à une évaporation à sec de l'éthanol. Nous avons obtenu des extraits éthanoliques considéré comme étant les extraits bruts de couleur verte foncée et a un aspect pâteux pour l'espèce *C.suffruticosa*, et de couleur vert noirâtre et avec un aspect semi-solide pour l'espèce *F.capreolata*. Ces extraits pouvant contenir de la chlorophylle, des polyphénols et d'autres composés.

Le rendement est calculé par rapport au poids total de matériel végétal sec et broyé, est exprimé en pourcentage. Le tableau 10 rapporte les rendements, l'aspect et la couleur des extraits éthanoliques de la partie aérienne de *C. suffruticosa* Vhal. et *F. capreolata* L. récoltés de la péninsule de l'Edough de la wilaya d'Annaba.

Tableau 10 : Rendement des extraits éthanoliques de *Calendula suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L.

Espèce	Type d'extrait	Rendement (%)	Aspect et couleur de l'extrait
<i>Calendula suffruticosa sp suffruticosa</i> Vhal	Extrait éthanolique à 90%.	14.4 ± 3.16	pâteux de couleur verte foncée.
<i>Fumaria capreolata</i> L	Extrait éthanolique à 90%.	8.4 ± 1.94	semi-solide et de couleur vert noirâtre.

Les rendements en extraits des deux plantes sont différents, le plus élevé étant celui de l'extrait brut de *C. suffruticosa* Vhal. avec un pourcentage de 14.4 ± 3.16 %.

Ce résultat est inférieur à celui signalé dans d'autres études sur une espèce de la même famille : *C. officinalis*, où le rendement de l'extrait éthanolique brut des fleurs et des feuilles de *C. officinalis* est de 32.12 et 18.24 % (Rigane et al., 2013).

Roopashree et ses collaborateurs (2008), ont noté également un rendement de 19.56±0.49 % pour l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *C. officinalis*.

Cependant, le rendement d'extraction le plus faible a été enregistré pour l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. avec un pourcentage de $8.4 \pm 1.94\%$. Ce résultat concorde avec les résultats obtenus dans d'autres travaux menés sur des espèces du même genre, où les extraits éthanoliques de *Fumaria officinalis* et *Fumaria parviflora* ont donné des rendements similaires avec des valeurs de l'ordre de 8% et 7.4 %, respectivement (Pehlivan Karakaş et al., 2012 ; Al qasoumi et Al dosari, 2009).

Tandis que d'autres chercheurs ont signalé un rendement beaucoup plus faible, avec un pourcentage de 11% et 10.2%, pour les extraits éthanoliques de *F. officinalis* et *F.indica* (Wasu et Muley, 2009 ; Pandey et al., 2014).

La différence de rendement noté dans notre étude est peut être due à la composition chimique qui diffère d'une espèce à un autre, la teneur éventuelle en principe actifs, le matériel végétal à extraire, la nature du solvant utilisé et la technique d'extraction utilisée sans oublier la nature et la composition du sol (Duraffourd et Lapraz, 2002).

4. Dosage des Métabolites Secondaires par dosage spectrométrique :

4.1. Teneurs des polyphénols totaux dans l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa* Vhal. et *F.capreolata* L. :

La famille des composés phénoliques inclue un grand nombre de produits de métabolisme secondaire qui diffèrent par leurs structures et leur réactivité (Shahidi et Naczki, 1995 in Waston, 2014). Ces composés ont un grand intérêt au cours des dernières années en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine, de leurs puissantes propriétés anti-oxydantes et de leurs effets crédibles sur la prévention de diverses maladies associées au stress oxydatif (Manache et al., 2004 in Waston, 2014).

La détermination de la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal. a été estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu. Ce dernier est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phospho-tungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phospho-molybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3) (Ribereau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005).

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE/g) selon l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y = 0.0688x + 0.0708$).

Cette dernière montre une très bonne corrélation ($R^2 > 0.9879$) entre la densité optique et la concentration de l'acide gallique (Fig. 28).

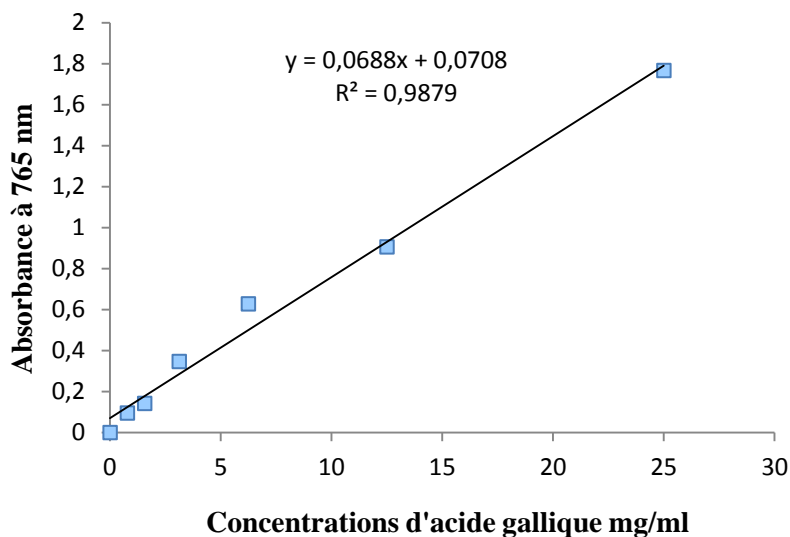


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Nous constatons que la teneur moyenne en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique de l'espèce *Calendula suffruticosa sp suffruticosa* Vhal. est de 84.236 ± 3.52 mg GAE/g. Cette valeur est légèrement inférieure à celle annoncée par Rigane et *al.*, (2012) pour l'espèce tunisienne *C. officinalis* où la valeur des polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique des fleurs est plus élevée, soit de l'ordre de 109.27 ± 0.23 mg GAE/g.

Cependant la valeur notée dans notre étude (84.236 ± 3.52 mg GAE/g) est supérieure à la teneur enregistrée par Ćetković et ses collaborateurs en 2003 (15.12 mg/g) dans l'extrait des fleurs de *C. officinalis*.

Zhao (2014), a également dosé les polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu dans les extraits aqueux et méthanoliques de l'espèce *Calendula arvensis*. Il a trouvé que la concentration en polyphénols dans ces deux extraits est de 19.50 ± 0.12 et 24.35 ± 1.73 mg GAE/g de l'extrait. Ces valeurs sont nettement inférieures à celle que nous avons obtenue dans la présente étude pour l'extrait éthanolique de l'espèce *C. suffruticosa* Vhal.

En outre, la teneur des composés phénoliques a été également déterminée dans l'extrait éthanolique de l'espèce *F. capreolata* L., elle est de 14.27 ± 1.65 mg GAE/g.

Ivanov et al., (2014), ont étudiés les teneurs des composés phénoliques des extraits éthanoliques, de cinq espèces du genre *Fumaria* : *F. officinalis*, *F. thuretii*, *F. kralikii*, *F. rostellata* et *F. schrammii*). Ils ont montré que le contenu en polyphénols dans ces espèces est compris entre $20,20 \pm 0,29$ (chez l'espèce *F. thuretii*) et $30,30 \pm 0,31$ mg GAE / g (chez l'espèce *F. officinalis*). Ces valeurs sont nettement supérieures à ce que nous avons noté dans notre étude sur l'espèce *F. capreolata* L.

Orhan et al. (2012), ont étudiés le contenu phénolique des extraits éthanoliques de quatre espèces du genre *Fumaria* : *F. cilicica*, *F. densiflora*, *F. kralikii* et *F. parviflora*, récoltées de la Turquie. Les valeurs obtenus varié entre 0,05 et 0,09 mg GAE / g d'extrait sec. D'après ces résultats, nous constatons que l'espèce *F. capreolata* L. récoltée de l'Edough (Séraïdi-Annaba, Algérie) est plus riche en composés phénoliques.

La variation que nous avons remarqué dans la quantité des polyphénols d'un extrait à un autre et d'une espèce à un autre est probablement due à plusieurs paramètres tels que : les conditions opératoires de l'extraction, la nature et de la polarité du solvant utilisé. Ces variations sont également considérables selon la variété, le stade d'évolution physiologique de la plante et la nature des tissus du végétal (Macheix et al., 1990 in Macheix et al., 2005).

4.2. Teneur des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal.:

La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) pour l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal. est exprimée en μg équivalent de quercétine /mg d'extrait. La courbe d'étalonnage de la quercétine est représentée dans la figure 29.

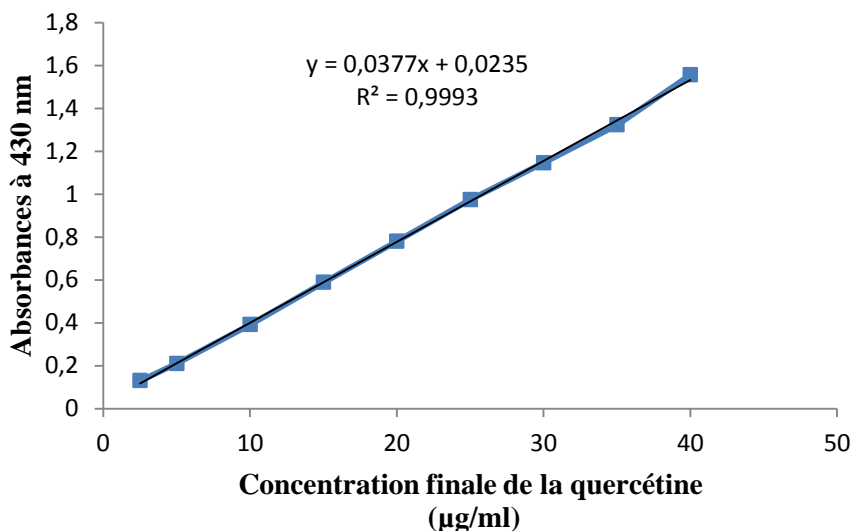


Figure 29 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Nos résultats révèlent que la teneur en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal. est de $24,59 \pm 2,71 \mu\text{g/mg}$. Cette valeur est nettement inférieure au taux des flavonoïdes constaté par Masterova et ses Coll en 1991, où la teneur totale en flavonoïdes dans les fleurons ligulés et tubulaires de l'espèce *C. officinalis* est de l'ordre de 0,88 et 0,25%, respectivement.

Dans une étude récente réalisée par une équipe de chercheurs tunisiens en 2013, la teneur des flavonoïdes totaux dans les extraits des feuilles et des fleurs de *C. officinalis* a été estimée entre $44,91 \pm 0,02$ et $76,44 \pm 0,01 \text{mg QE / g}$ de poids sec respectivement (Rigane et al., 2013).

Albulescu et ses collaborateurs (2004), ont dosé la quantité des flavonoïdes dans trois types d'extraits de *C. officinalis* : un extrait méthanolique à 80%, un extrait éthanolique à 96% et un extrait d'isopropanol à 100%.

La quantité la plus importante des flavonoles libres (30,4%) a été trouvée dans l'extrait méthanolique à 80%. Nous remarquons que cette teneur est supérieure à celle que nous avons enregistré dans notre étude pour l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* ($24,59 \pm 2,71 \mu\text{g/mg}$). Tandis que les deux autres extraits (éthanolique à 96% et l'extrait d'isopropanol à 100%) renferment une faible teneur en flavonoles libres avec un pourcentage de 16,4 et 3,9 %.

5. Profil phytochimique des extraits des deux espèces étudiées :

5.1. Analyse chimique de l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa sp suffruticosa* Vhal. par GC/MS :

Les composés phytochimiques de l'extrait éthanolique de l'espèce endémique *Calendula suffruticosa sp suffruticosa* Vhal., récoltée dans la région de l'Edough de la wilaya d'Annaba (Algérie), ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CG/MS) pour la première fois (Fig. 30).

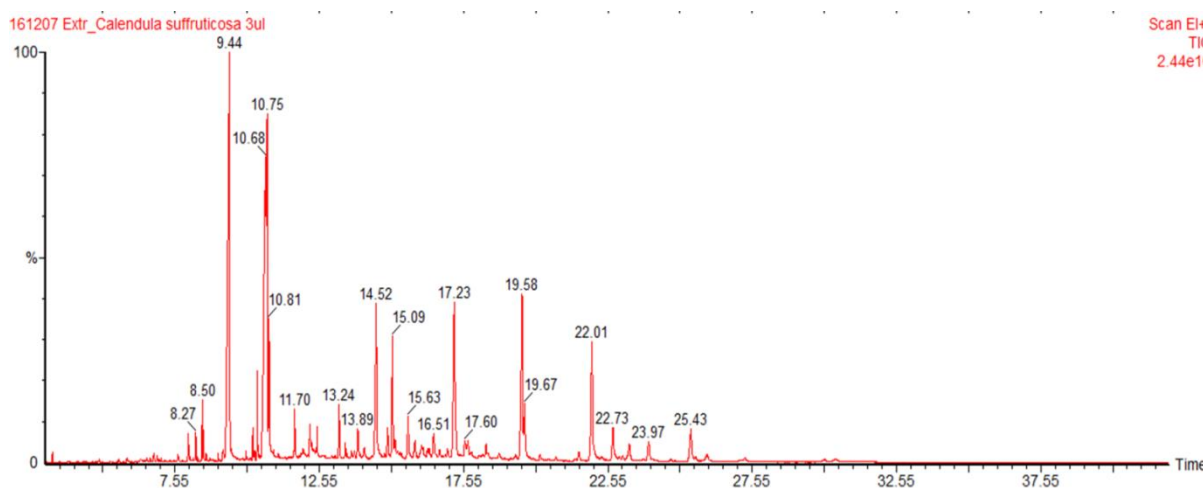


Figure 30 : Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Calendula suffruticosa* Vhal.

A partir des données recueillies des chromatographes et des spectres de la spectrométrie de masse et après traitement des résultats, nous avons pu mettre en évidence 64 composés chimiques dans l'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'espèce endémique *Calendula suffruticosa sp suffruticosa* Vhal.

Les composés identifiés avec leur temps de rétention (RT), la formule moléculaire (MF), la masse moléculaire (MW) et le % spectre de masse sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Composés chimiques de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *C. suffruticosa* sp *suffruticosa* Vhal. par (GC-MS).

No	Le temps de rétention	Nom du composé	La formule moléculaire	La masse moléculaire	Pourcentage (%)
1	6.810	Acide undécanoïque	$C_{11}H_{22}O_2$	186	-
2	6.830	2(4H)-Benzofuranone, 5, 6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl	$C_{11}H_{16}O_2$	180	-
3	7.645	α -Bisabolol	$C_{15}H_{26}O$	222	1.70%
4	7.665	3-Buten-2-one,4-(4-hydroxy-2,2,6-trimethyl-7-axabicycol(4,1,0)hept-1-yl-	$C_{13}H_{20}O_3$	224	-
5	8.015	acide myristique	$C_{14}H_{28}O_2$	228	-
6	8.070	1-cyclohexane, 2-methyl-2-oxobutyl	$C_{12}H_{20}O_2$	196	-
7	8.185	7-Hexadecene,(Z)-	$C_{16}H_{32}$	224	-
8	8.270	Acetic acid,2-(2,2,6-trimethyl-7-axa-bicyclo(4,1,10)hept-1-yl propenylester	$C_{14}H_{22}O_3$	238	0.2 %
9	8.335	Bicyclo(3,2,1)octan-3-one, 6-(2-hydroxyethyl, endo-	$C_{10}H_{16}O_2$	168	0.17%
10	8.496	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	$C_{20}H_{40}O$	296	0.22 %
11	8.546	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl	$C_{18}H_{36}O$	268	-
12	8.631	Acide pentadécanoïque	$C_{15}H_{30}O_2$	242	-
13	8.766	Phtalic acid, butyl undecylester	$C_{23}H_{36}O_4$	376	-
14	8.776	3-Octadecyne	$C_{18}H_{34}$	250	-
15	9.051	Acide palmitique, méthyl ester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	-
16	9.221	Cis, cis, cis-7, 10,13-Hexadecatrienal	$C_{16}H_{26}O$	234	-
17	9.436	Acide Palmitique	$C_{16}H_{32}O_2$	256	1.15%
18	10.011	Acide margarique	$C_{17}H_{34}O_2$	270	0.16%
19	10.241	Nonadecane	$C_{19}H_{40}$	268	-

20	10.271	Acide linolélaïdique, méthyl ester	$C_{19}H_{34}O_2$	294	-
21	10.316	Acide linoléniqne, méthyl ester	$C_{19}H_{32}O_2$	292	-
22	10.406	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	296	1.20%
23	10.656	Acide linoléique	$C_{18}H_{32}O_2$	280	23.58 %
24	10.746	Acide α -linolenique	$C_{18}H_{30}O_2$	278	24.20 %
25	10.811	Acide stéarique	$C_{18}H_{36}O_2$	284	4.93 %
26	11.702	Tricosane	$C_{23}H_{48}$	324	0.27%
27	12.232	Acide arachique	$C_{20}H_{40}O_2$	312	0.15%
28	12.272	7-metyl-Z-tetradecen-1-olacetate	$C_{17}H_{32}O_2$	268	0.18%
29	12.437	Ocatdecane,6-méthyl-	$C_{19}H_{40}$	268	1.13%
30	12.477	Adipic acid , bis(2-ethylhexyl) ester	$C_{22}H_{42}O_4$	370	1.46%
31	13.242	Octacosane	$C_{28}H_{58}$	394	0.22%
32	13.512	Acide docosanoique, méthyl ester	$C_{23}H_{46}O_2$	354	-
33	13.673	6- β -Bicyclo[4,3,0] nonane,5 β -iodomethyl-1 β -isopropenyl-4 α -dimethyl-	$C_{15}H_{25}$	332	-
34	13.763	Disooctyl phthalate	$C_{24}H_{38}O_4$	390	-
35	13.893	Acide docosanoique	$C_{22}H_{44}O_2$	340	1.30%
36	14.113	Tetradecane2,6, 10-trimethyl-	$C_{17}H_{36}$	240	-
37	14.523	B-D-Mannofuranoside,farnesyl-	$C_{21}H_{36}O_6$	384	
38	14.923	α -Himachalene	$C_{15}H_{24}$	204	
39	15.173	Humulane-1,6-dien-3-ol	$C_{15}H_{26}O$	222	0.11 %
40	15.873	Acide Lignocerique	$C_{24}H_{48}O_2$	368	
41	16.149	Globulol	$C_{15}H_{26}O$	222	0.24 %
42	16.364	Thujopsene	$C_{15}H_{24}$	204	0.13 %

43	16.514	5-(7a-isopropenyl-4,5-dimethyl-octahydroinden-4-yl)-3-methyl-penta-2,4-dien-1-ol	$C_{20}H_{32}O$	288	1.61%
44	16.999	Ledol	$C_{15}H_{26}O$	222	0.17 %
45	17.224	Nonacosane	$C_{29}H_{60}$	408	4.89 %
46	17.704	4,8, 13-Cyclotetradecatriene-1,3-diol,1,5,9-trimethyl-12-(1-methylethyl)-	$C_{20}H_{34}O_2$	306	1.59 %
47	18.334	Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	380	-
48	19.670	2-Metyl-Z-4-tetradecene	$C_{15}H_{30}$	210	6.62 %
49	20.210	Vitamine E (α -tocopherol)	$C_{29}H_{50}O_2$	430	0.25 %
50	21.426	1,2-Pentanediol,5-(6-bromodecahydro-2-hydroxy-2,5,5a,8a-tetramethyl-1-naphtanyl	$C_{20}H_{35}BrO_3$	402	-
51	21.551	Campesterol	$C_{28}H_{48}O$	400	0.10 %
52	22.006	Stigmastérol	$C_{29}H_{48}O$	412	8.53 %
53	22.341	2-Hydroxy-1,1,10-trimethyl-6,9-epidioxydecalin	$C_{13}H_{22}O_3$	226	-
54	22.731	β -sitostérol	$C_{29}H_{50}O$	414	3.50 %
55	22.941	Ergosta-7,22-dien-3 β -ol,acetae	$C_{30}H_{84}O_2$		-
56	23.066	Oxalic acid,allyl pentadecyl ester	$C_{20}H_{36}O_4$	340	-
57	23.296	Urs-12-en-24-oic acid,3-oxo-, methyl ester	$C_{31}H_{48}O_3$	468	-
58	23.781	Kauran-18-al, 17-(acetyloxyl)-,(4 β)-	$C_{22}H_{34}O_3$	346	-
59	23.967	α -Amyrin	$C_{30}H_{50}O$	426	2.49 %
60	24.112	Androstan-3-one, 17-hydroxy-2,4-dimethyl-,(2 α ,4 α ,5 α ,17 β)-	$C_{21}H_{34}O_2$	318	-
61	24.727	Methanol,[6,8,9-trimethyl-4-(propenyl)-3-oxabicyclo[3,3,1]non-6-en-1-yl]	$C_{15}H_{24}O_2$	236	-
62	25.432	Lupeol	$C_{30}H_{50}O$	426	3.76 %
63	25.997	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	$C_{20}H_{40}O$	296	-

64	27.293	Pregn-16-en-20-one, 3-hydroxy-,(3 β ,5 β)-	$C_{21}H_{32}O_2$	316	-
----	--------	---	-------------------	-----	---

L'extrait éthanolique de la partie aérienne de *C. suffruticosa subsp. suffruticosa* Vhal. est constitué majoritairement de l'acide α linoléique (24.20%), l'acide linoléique (23.58%), Stigmasterol (8.53 %), 2-Metyl-Z-4-tetradecene (6.62 %) et α -Bisabolol (1.70 %).

D'après notre recherche bibliographique jusqu'à ce jour aucune étude n'a été accomplie sur la composition chimique de l'extrait éthanolique de l'espèce *Calendula suffruticosa sp. suffruticosa* Vhal. Cependant d'autres espèces du même genre tels que *C. officinalis* et *C. arvensis* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques.

Les résultats que nous avons obtenus dans notre étude diffèrent de ceux de Faustino et ses collaborateurs (2017), qui ont déterminé pour la première fois la composition chimique par GC/MS, des extraits hexaniques de deux sous espèces de l'espèce *C. suffruticosa* : *C. suffruticosa subsp. lusitanica* et *C. suffruticosa subsp. Algarbiensis*, du Portugal. Ils ont mentionnés que les alcaloïdes pyrrolizidiniques 1,2-saturés dominent le profil chimique de l'espèce *C. suffruticosa subsp. lusitanica* avec un pourcentage (45,9%) ; tandis que l'extrait hexanique de l'espèce *C. suffruticosa subsp. algarbiensis*, est constitué majoritairement des alcaloïdes de pyrrolizidine (26,7%), des terpénoïdes (25,1%) et des dérivés d'alcool (19,5%).

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'extrait de notre plante est riche en acides gras saturés et insaturés, la teneur en lipides des graines de l'espèce *C. officinalis* variait entre 13,6 et 21,7 g / 100 g de graines. Nos résultats sont en accord avec ceux de Dulf et al., 2013 (in Al snafi, 2015).

Parmi les acides gras saturés détecté dans l'extrait étudié, on distingue : l'acide stéarique (4.93 %), l'acide palmitique (1.15%) et l'acide myristique. Les acides gras saturés chez les espèces du genre *Calendula* sont composés principalement de l'acide palmitique et des acides gras saturés à longue chaîne (Al snafi, 2015).

L'acide palmitique est un acide saturé en C16 particulièrement abondant chez *C. officinalis* (2,06 mg / g de plante sèche) et *C. suffruticosa subsp. lusitanica* (1,49 mg / g de plante sèche) (Faustino et al., 2017). Leurs effets négatifs sur la santé ont été récemment contestés et son effet favorable sur l'augmentation des taux sanguins de cholestérol HDL, sans modification significative du rapport cholestérol / HDL-cholestérol a été également rapporté (Agostoni et al., 2016 in Faustino et al., 2017).

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa subsp. suffruticosa* récolté de la région de l'Edough (Annaba), renferme aussi des acides gras

polyinsaturés tels que l'acide α -linoléique (Oméga 3) et l'acide linoléique (Oméga 6) comme étant des composés majoritaires avec un taux de 24.20 % et 23.58% respectivement.

Ce résultat est en accord avec ce qui a été rapporté par Faustino et *al.*, (2017), où ils ont également identifié l'acide α -linoléique comme composant majoritaire avec un taux de (0,78 mg / g de plante sèche) dans l'extrait hexanique du *C.arvensis* récolté du Portugal.

Ces deux acides gras polyinsaturés ont été identifiés chez les autres espèces du genre *Calendula* (Faustino et *al.*, 2017). Ils ont été également cités comme étant deux acides gras dominants dans les lipides totaux de l'espèce *C.officinalis* avec un taux de 51,4% et 57,6% respectivement ((Dulf et *al.*, 2013 in Al-Snafi, 2015) et 1,97 et 2,20 mg / g de matière sèche (Faustino et *al.*, 2017). Les acides linoléiques a été également mentionnés chez l'espèce *C. suffruticosa subsp. lusitanica* (1,04 et 1,33 mg / g de matière sèche), tandis que la concentration la plus faible a été trouvée chez *C. suffruticosa subsp. algarbiensis* (0,29 et 0,51 mg / g de matière sèche) (Faustino et *al.*, 2017).

Ces deux acides gras, l'acide linoléique (oméga 6) et l'acide alpha-linolénique (oméga 3) sont connus par leurs large spectre des activités biologiques. En effet l'acide linoléique (oméga 6) est le précurseur de la synthèse des prostaglandines E2, des tromboxanes et des leucotriènes responsables des réactions inflammatoires, de l'agrégation et de la vasoconstriction, tandis que l'acide alpha-linolénique (oméga 3) amorce la synthèse des prostaglandines E3 qui jouent un rôle dans les réactions anti-inflammatoires, anti-agrégantes et dans la vasodilatation (Luyindu, 2013). De plus, la consommation d'acide α -linoléique est associée à la diminution du cholestérol et donc à la diminution des maladies cardiovasculaires (Lanzmann-Petithory, 2001 in Faustino et *al.*, 2017).

Dans une autre étude réalisée par Badami et Morris en 1965 sur les lipides de l'extrait d'éther de pétrole de *C. officinalis*, les acides gras de Monols, esters de sterol, 3-monoesters, 3- de l'acide laurique, myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique et l'acide linoléique ont été obtenus dans les fleurs.

Abdul jalill (2014), a également mis en évidence l'existence de l'acide linoléique et l'acide stéarique dans l'extrait méthanolique de la tige et de la feuille de *C.officinalis* avec un pourcentage de 27.56 et 6.41 % respectivement.

L'analyse chromatographique, montre la présence des terpénoïdes en quantités importantes dans l'extrait éthanolique de *C suffruticosa subsp suffruticosa*. Ces composés représentent la classe des composés phytochimiques la plus diversifié du point de vue structurale.

Nous avons identifiés trois sous-classes des terpénoïdes : les sesquiterpènes ou les sesquiterpènes alcools comme l' α Bisabolol (1.70%), Globulol (0.24%) et Ledol (0.17 %), les tri-terpènes tels que : Lupeol (3.76 %) et α -Amyrin (2.49%), les phytostérols tels que : le Stégmastérol (8.53 %), le β -sitostérol (3.50 %) et le campasterol (0.10 %).

Nos résultats concordent avec les résultats des autres travaux, où, certains terpénoïdes tels que α Bisabolol, Globulol, Ledol et Phytol ont été détectés dans l'huile essentielle et l'huile volatile des fleurs et des parties aériennes de *C. officinalis* et *C. arvensis* (Paolini et al., 2010 ; Petrovic et al., 2006 ; Gazim et al., 2008).

Ces résultats sont aussi en accord avec d'autres travaux scientifiques rapportés sur quatre autres espèces du même genre (Faustino et al., 2017). Ils ont montré la présence de l' α -amyrine et le phytol dans les extraits de trois espèces : *C. arvensis*, *C. suffruticosa subsp lusitanica* et *C. suffruticosa subsp. algarbiensis* à l'exception de *C. officinalis*.

Ces deux terpénoïdes (l' α - amyrine et le phytol) possèdent des activités antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Vázquez et al., 2012). L' α -Amyrine présente également des effets anti-hyperglycémiant et hypo-lipidémiques (Santos et al., 2012 in Faustino et al., 2017).

Lupeol est un triterpène penta-cyclique présent dans les extraits hexaniques des deux sous-espèces *C. suffruticosa subsp lusitanica* et *C. suffruticosa subsp. algarbiensis*, et aussi présent dans l'extrait d'éther de pétrole des fleurs de *C. officinalis* (Wilkomerski et Pentacyclic, 1985 ; Zittwel-Eglseer et al., 1985 in Khalid et Teixeira da silva, 2012 ; Faustino et al., 2017). Il est connu par ses puissantes propriétés anti-inflammatoires (Bone, 2003 ; Wiart, 2007).

L' α -bisabolol est utilisé depuis longtemps en cosmétique, médecine et aromathérapie pour ses activités antalgique nociceptive et anti-inflammatoire, plus au niveau viscéral que cutané (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013).

Plusieurs chercheurs ont mis en évidence la présence de phytostérols dans les extraits d'autres espèces de genre *Calendula*, Ils comprennent le sitostérol dans l'extrait d'éther de pétrole des fleurs de *C. officinalis* (Adler et al., 1975) et le stigmastérol dans l'extrait d'éther de pétrole des fleurs de *C. officinalis* et l'extrait hexanique de *C. suffruticosa subsp. lusitanica* (Adler et al., 1975 ; Faustino et al., 2017). Ces stéroïdes sont des composés qui ont un squelette cyclopentane per-hydro-phenanthène. Ils possèdent des propriétés hypocholestérolémiantes et un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires, et aussi des activités anti-athérosclérotiques, anti-inflammatoires, anti-oxydantes de même un effet

anti-tumoral contre certains types de cancer (Sabater-jara et Pedreno, 2013 ; Garacia-Llatas et Rodriguez-Estrada, 2011 ; Delgado-Zamarreno et *al.*, 2009 ; Woyengo et *al.*, 2009 in Alvarez, 2014).

Quelque composés aliphatiques comme : Tricosane, Heptacosane, Octacosane et Nonacosane sont trouvés dans l'extrait étudié en faibles quantités ou à l'état de traces. L'heptacosane a été identifié comme l'alcane le plus abondant dans les extraits des deux sous-espèces de *C. suffruticosa* : *C. suffruticosa subsp. lusitanica* et *C. suffruticosa subsp. algarbiensis* (Faustino et *al.*, 2017).

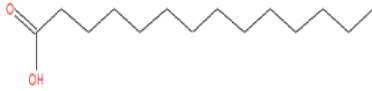
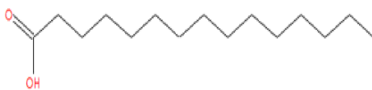


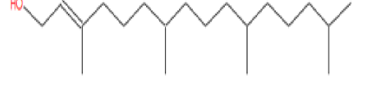
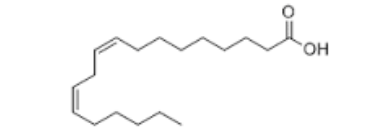
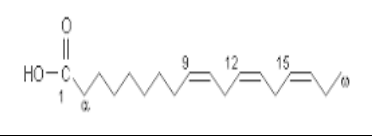
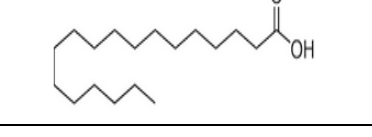
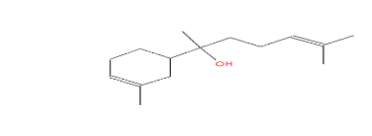
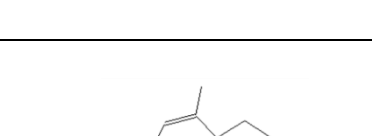
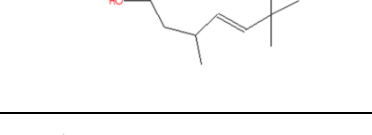
Les résultats obtenus au cours de notre étude, montrent une différence qualitative et quantitative dans la composition phytochimique de l'extrait éthanolique de notre plante ; *Calendula suffruticosa subsp. suffruticosa* Vhal. par rapport aux extraits des autres espèces et sous espèces du même genre. Cette variabilité peut être expliquée par des facteurs externes tels que l'origine de la plante, le climat et la disponibilité en nutriments du sol qui influencent de façon considérable les teneurs en substances secondaires des végétaux (Anonyme, 2013).

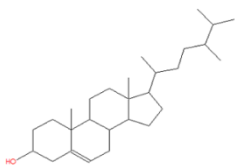
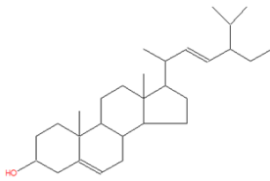
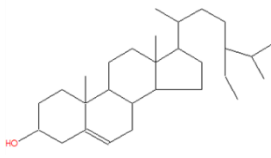
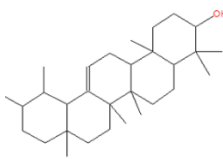
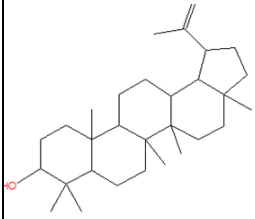
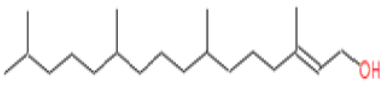
La quantité et la composition en métabolites secondaires des plantes varient également en fonction du stade phénologique (l'âge), l'état physiologique (alternance jour/nuit) et les différents organes de la plante. La méthode d'extraction et le solvant utilisé dans l'extraction jouent également un rôle primordial dans cette variabilité.

La plupart des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de l'espèce *C. suffruticosa sp. suffruticosa* Vhal. sont connus par leurs multiples activités pharmacologiques et sont donc responsables de toutes les propriétés médicinales de cette espèce.

Le tableau 12 présente les structures chimiques ainsi que les activités biologiques de quelques composés identifiés dans l'extrait éthanolique de la plante étudiée.

Tableau 12 : Activités biologiques de quelques composés phytochimiques identifiés dans l'extrait éthanolique des parties aériennes de *C. suffruticosa sp suffruticosa* Vhal.

No	Nom de composé	La structure chimique	La nature de composé	Activité biologique
1	Acide myristique		Acide gras saturé	Antioxydant, cancer-préventive, Nématoïde, Cosmétique
2	Acide penta-décanoïque		Acide gras saturé	Antioxydant
3	Acide palmitique		Acide gras saturé	Antioxydant, hypocholestérolémique, Nématoïde, Pesticide.
4	Acid linoléniq ue, méthyl ester		Acide gras poly-insaturé	Insectifuge, pesticide.
5	Phytol		Di-terpène	Antimicrobien, Anti-inflammatoire, anticancéreux diurétique
6	Acide linoléique		Acide gras poly-insaturé	Anti-inflammatoire, hypocholestérolémique, Cancer préventive, hépatoprotective, nématoïde insecticide, antihistaminique, anti-eczémique,
7	Acid α -linoléniq ue		Acides gras poly-insaturé	Anti-inflammatoire.
8	Acide stéariq ue		Acide gras saturé	Inhibiteur de alpha-5-réductase, hypocholestérolémiant, lubrifiant
9	α -Bisabolol		Alcool sesquiterpène monocyclique	Anti-inflammatoire, antimicrobien, antinociceptif, cicatrisant, antibactérien, fongicide, cosmétique.
10	Humulane-1,6-dien-3-ol			Anti-malarial, antiplasmodial.
11	Vitamine E (α -tocophérol)		vitamine	Analgésique, antidiabétique, anti-inflammatoire, antioxydant, antitumoral, anticancer, hépatoprotective,

				hypocholestérolémie, anti-ulcérogénique, Vasodilatateur, antispasmodique
12	Campestérol		Stérol	Antioxydant, hypo- cholestérolémique
13	Stigmastérol		Stérol	Anti-inflammatoire, anti-nociceptive, antioxydant, antivirale, hypocholestérolémi- que, Cancer- préventive, sédative, anti-hépatotoxique
14	β -sitostérol		Stérol	Antibactérien, anticancéreux, anti- inflammatoire, antioxydant, anti – tumorale, fébrifuge, hépatoprotective, hypoglycémique
15	α -Amyrin		Alcool- sesquiterpénique	Analgésique anti-inflammatoire, anti-nociceptive, anti-tumorale, gastro-protective, hépatoprotective
16	Lupeol		Alcool tri- terpénique	Anti-inflammatoire, antioxydant, anti- hyper-glycémique, antiviral, hypotensive, pesticide
17	3, 7, 11,15-Tetraméthyl-2- hexadécen-1-ol		Alcool terpénique	Antimicrobien anti-inflammatoire

Source de l'activité biologique la base des données : *Dr Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases*.

5.2. Composition chimique de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. par GC/MS :

La figure 31 rapporte le profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'espèce *Fumaria capreolata* L. récoltée de la région de l'Edough (Annaba).

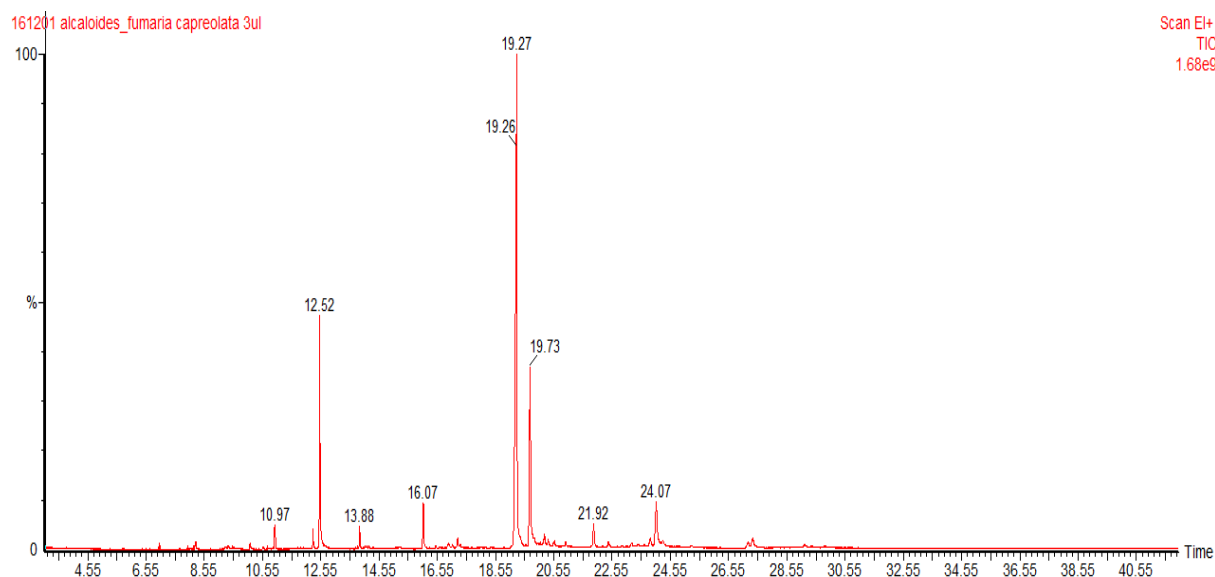


Figure 31 : Profil chromatographique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Fumaria capreolata* L.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'espèce *Fumaria capreolata* L., par la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à spectrométrie de masse sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Composition chimique de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'espèce
Fumaria capreolata L.

No	Le temps de rétention	Nom du composé	La formule moléculaire	La masse moléculaire	Pourcentage (%)
1	9.281	Acide palmitique	$C_{16}H_{32}O_2$	256	-
2	10.401	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	296	0.18
3	10.781	Acide linoléique	$C_{18}H_{32}O_2$	280	12.58
4	12.287	Dodecanamide	$C_{12}H_{25}NO$	199	
5	12.307	9,12,15- Octadecatrienal	$C_{18}H_{30}O$	262	-
6	12.477	Adipic acid , bis(2-ethylhexyl) ester	$C_{22}H_{42}O_4$	370	-
7	13.758	Phtalic acid, mono-(2 ethyl hexyl) ester	$C_{16}H_{22}O_4$	278	0.2
8	13.848	Butanamide	C_4H_9NO	87	-
9	16.073	13-Docosenamide, (z)	$C_{22}H_{43}NO$	337	-
10	16.494	Ethanol, 2-(1-methylethoxyl)	$C_{10}H_{16}O_2$	168	-
11	17.149	Methyl 2 hydroxyde canoate	$C_{11}H_{22}O_3$	202	-
12	17.204	Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	380	-
13	17.289	10-Nonadecanol	$C_{19}H_{40}O$	284	-
14	19.275	Protopine	$C_{20}H_{19}NO_5$	353	53.03
15	21.921	Parfumine	$C_{20}H_{19}NO_5$	353	10.08
16	22.296	Isopropyl-5 methyl cyclohexyl3(-1-(chlorophenyl)-3-oxobutyl-coumarin	$C_{30}H_{33}ClO_6$	524	01.76
17	23.906	Oxalic acid,bis (isobutyl) ester	$C_{10}H_{18}O_4$	202	-
18	24.071	Phenol 3,5 bis (1,1-dimethylethyl)	$C_{14}H_{22}O$	206	-

L'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. comprend 18 composés, dont quatre sont majoritaires : le Protopine (53.03 %), le Parfumine (10.08 %), l'acide linoléique (12.58 %) et l'Isopropyl-5 methyl cyclohexyl3(-1-(chlorophenyl)-3-oxobutyl-coumarin (01.76 %).

Nos résultats sont en accord avec plusieurs investigations phytochimiques réalisées sur des espèces Européennes, Asiatiques et Africaines du genre *Fumaria*, où différents types d'alcaloïdes isoquinoléiques en particulier le protopine ont été isolés. Des alcaloïdes spiro-benzyl-isoquinolines tels que le parfumine ont été également isolés (Preininger, 1986 ; Sousek et al., 1999 ; Bentley, 2000 ; Suau et al., 2002 ; Maiza-benabdesselam et al., 2007).

Ces résultats montrent aussi que l'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'espèce *F. capreolata* L. récolté de la péninsule de l'Edough (Annaba, Algérie) est nettement moins riche du point de vue quantitatif et qualitatif en alcaloïdes par rapport aux extraits d'autres espèces étudiés.

Les activités biologiques des espèces du genre *Fumaria* sont principalement associées à la présence des alcaloïdes de type isoquinoléiques (Suau et al., 2002).

Le Protopine est un alcaloïde isoquinoléique largement répandue dans les espèces du genre *Fumaria*. Il a été démontré que le protopine présente un certain nombre d'activités pharmacologiques telles que la réduction du flux de calcium intracellulaire et l'inhibition de l'acide arachidonique et l'agrégation plaquettaire induite par le facteur d'activation des plaques en diminuant le calcium cytosolique chez le lapin (Shen et al., 1999 in Sung Bae et al., 2011). Il inhibe également la synthèse de thromoxane A2 et le processus inflammatoire via la voie COX (Saeed et al., 1997 in Sung Bae et al., 2011), il possède aussi des activités antibactériennes (Cosar et al., 1981 in Sung Bae et al., 2011) ainsi que des activités antihistaminiques et anticholinergiques (Ustunes et al., 1988 in Sung Bae et al., 2011).

Tableau 14 : Les composés majoritaires des extraits éthanoliques de *Fumaria capreolata* L. et *Calendula suffruticosa* Vhal.

Le souci « <i>C. suffruticosa</i> Vhal. »			La fumeterre « <i>F. capreolata</i> L. »	
N	Nom du composé	(%)	Nom du composé	(%)
01	Acide α -linoléique	24.20	Protopine	53.03
02	Acide linoléique	23.58	Parfumine	10.08
03	Stigmastérol	8.53	Acide linoléique	12.58
04	2-Metyl-Z-4-tetradecene	6.62	Isopropyl-5 methyl cyclohexyl3(-1-(chlorophenyl) -3- oxobutyl-coumarin	01.76
05	α -Bisabolol	1.70	Phtalic acid, mono-(2 ethyl hexyl) ester	0.2

6. Fractionnement de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. et isolement des composés :

Après l'extraction de 36 g de la poudre de la partie aérienne de *F. capreolata* L avec l'éthanol nous avons obtenus 2.4 g d'un extrait brut, et l'extraction liquide/ liquide de ce dernier par différents types de solvants et sur plusieurs étapes, nous a permis d'obtenir trois phases : une phase organique (Phase A) de poids de 235.5 mg, une phase des alcaloïdes totaux (Phase B) de poids de l'ordre de 275 mg et une phase aqueuse basique (Phase C) de poids de 17.4 mg.

Cette partie de notre travail se focalise sur la purification et l'isolement des composés contenus dans l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L.

6.1. Purification de la phase organique (Phase A) :

La phase organique où la phase A (235.5 mg) provenant de l'extraction liquide/liquide de l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L., a subi une chromatographie sur une colonne de gel de silice préparée dans le dichlorométhane. Les fractions obtenues ont été regroupées, évaporées et pesées. Puis, 12 fractions ont été recueillies (Tab. 15).

Tableau 15 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la phase organique (Phase A).

Fractions	Nom de la fraction	Système d'élution	Poids de la fraction (mg)	observation
(1-3)	A1	CH ₂ Cl ₂ 100%	18.11	Mélange de composés en très faible quantité.
(4)	A2	CH ₂ Cl ₂ 100%	19.32	Un seul composé.
(5-14)	A3	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (99 / 1)	12.22	Mélange complexe
(5-16)	A4	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	27.84	Mélange complexe
(17-19)	A5	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	22.99	Mélange inséparable
(20-21)	A6	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	3.16	Mélange séparable

(22)	A7	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (60 / 40)	1.53	Mélange séparable
(23)	A8	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (60 / 40)	3.64	Mélange séparable
(24-25)	A9	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (60 / 40)	2.82	Traînée ou traces
(26)	A10	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (60 / 40)	7.31	Traînée ou traces
(27-35)	A11	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (60 / 40)	1.92	Traînée ou traces

La plus part des fractions recueillies à partir de la phase organique A (A2, A3, A4, A5, A6, A8, A10), ont été analysées par résonance magnétique nucléaire (RMN ¹H) afin de déterminer la structure des principaux composés présents.

L'analyse des spectres RMN-¹H des fractions étudiés montre que :

- La fraction A2 de la phase organique et qui se présente sous forme d'une poudre blanche, est un alcool gras.
- La fraction A4 : qui se présente sous forme d'un solide de couleur vert-noirâtre est un mélange de plusieurs composés.
La fraction A5 : est un acide gras polyinsaturé oméga-6, l'acide linoléique.
- La fraction A6 : est un acide gras saturé, l'acide palmitique.
- La fraction A10 : est un mélange de plusieurs composés.

6.2. Purification de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B) :

L'extrait des alcaloïdes totaux (la phase B) a été également fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice, l'élution a été réalisée par un gradient de solvants organiques composé du dichlorométhane et du méthanol. Les fractions obtenues ont été analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) et la détermination des structures est basée sur l'interprétation des spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN ¹H et ¹³C).

Au final, 13 fractions ont été obtenues, dont la plus pure est la fraction FB3 (Tab. 16).

Tableau 16 : Séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B).

Fractions	Nom de la fraction	Système d'élution	Poids de la fraction (mg)	observation
(1-18)	FB1	CH ₂ Cl ₂ 100%	22.8	Mélange de composés en très faible quantité.
(19-24)	FB2	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (99 / 1)	14.13	Mélange de composés en très faible quantité.
(25-35)	FB3	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	31.1	Mélange séparable
(36-39)	FB4	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	4.37	Mélange séparable
(40-51)	FB5	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95 / 5)	11.69	Mélange séparable
(52-57)	FB6	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95 / 5)	7.12	Mélange séparable
(58-62)	FB7	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95 / 5)	15.24	Mélange séparable
(63-74)	FB8	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (93 / 7)	10.30	Mélange séparable
(75-78)	FB9	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 / 10)	19.75	Mélange séparable
(79)	FB10	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 / 10)	11.37	Mélange séparable

(80)	FB11	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 / 10)	12.66	Mélange séparable
(81)	FB12	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 / 10)	5.83	Mélange séparable
(82)	FB13	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 / 10)	9.59	Un composé pur

La fraction (FB3) qui semble être la plus pure a été nommée FA, cette dernière a été fractionnée et purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant comme phase mobile, un mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle. Neuf sous fractions ont été obtenues et la sous fraction qui se distingue la plus pure à 254 nm est A6 (Tab. 17).

Tableau 17 : Séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction A (FB3 (25-35) de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B).

Fractions	Nom de la fraction	Système d'élution	Poids de la fraction (mg)	observation
(1-2)	A1	Hexane/AcEt (60 /40)	2.24	Mélange de composés en très faible quantité.
(3)	A2	Hexane/AcEt (60 /40)	2.75	Mélange de composés en très faible quantité.
(4-5)	A3	Hexane/AcEt (60 /40)	2.43	Mélange de composés en très faible quantité.
(6)	A4	Hexane/AcEt (40 /60)	1.64	Mélange de composés en très faible quantité.
(7-15)	A5	Hexane/AcEt (20 /80)	8.39	Mélange séparable
(16-17)	A6	AcEt (100 %)	8.02	Un seul composé
(18)	A7	AcEt (100 %)	2.33	Un seul composé

(19)	A8	AcEt (100 %)	0.59	Mélange séparable
(20-25)	A9	AcEt (100 %)	2.37	Mélange séparable

Enfin, une seule molécule a été isolée de cette fraction (8 mg), cette dernière a été analysée par RMN ¹H et ¹³C dans le chloroforme deutéré. L'analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS) nous a permis de confirmer la masse du composé obtenu.

La fraction FB5 issue du fractionnement de la phase des alcaloïdes totaux (Phase A), montre après révélation au Mounir et à la lumière UV (254 nm, 365 nm) de la CCM, une tache de couleur orangé bien visible correspondant à un composé majoritaire.

D'après les résultats de l'identification structurale par RMN des différentes fractions de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B), nous constatons que cette fraction renferme une molécule correspond à un alcaloïde isoquinoline. En effet, cette fraction a été soumise à plusieurs étapes de purification par chromatographie sur colonne en utilisant deux solvants (l'hexane et l'acétate d'éthyle), et identification structurale par RMN ¹H des sous fractions qui semblent les plus pures (Tab. 18).

Tableau 18 : Séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction B (FB5 (40-51) de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B)).

Fractions	Nom de la fraction	Système d'éluion	Poids de la fraction (mg)	observation
(1-3)	B1	Hexane/AcEt (60 /40)	2.64	Mélange de composés en très faible quantité.
(4-6)	B2	Hexane/AcEt (60 /40)	1.09	Mélange de composés en très faible quantité.
(7-9)	B3	Hexane/AcEt (60 /40)	1.03	Mélange de composés en très faible quantité.
(10-11)	B4	Hexane/AcEt (40 /60)	0.86	Mélange séparable

(12-14)	B5	Hexane/AcEt (20 /80)	1.11	Un seul composé (Mounir -)
(15-19)	B6	AcEt (100 %)	1.85	Un seul composé (Mounir +)
(20-32)	B7	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (96 / 40)	2.63	Un seul composé.
(33-38)	B8	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 / 10)	2.32	Mélange séparable

A la fin de ces étapes, un seul composé pur a été obtenu à partir de la fraction FB5.

Les fractions restantes qui sont issus de la purification de la phase des alcaloïdes totaux, présentent une similitude entre les plaques CCM (un mélange de composés séparables). Elles ont été rassemblées pour constituer une seule fraction (la fraction D). Cette dernière a subi un fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice et une analyse structurale par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-¹H) des sous fractions obtenues.

Tableau 19 : Séparation par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction D (de la fraction FB 7 jusqu'à la fraction FB13) de la phase des alcaloïdes totaux (Phase B).

Fractions	Nom de la fraction	Système d'éluion	Poids de la fraction (mg)	observation
(1-3)	D1	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	05.61	Mélange de composés en très faible quantité.
(4)	D2	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	03.59	Mélange de composés en très faible quantité.
(5-6)	D3	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	02.6	Mélange de composés en très faible quantité.
(7-10)	D4	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	17.33	Mélange séparable

(11-12)	D5	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	09.27	Un seul composé (Mounir +)
(13-14)	D6	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	06.08	Un seul composé (Mounir +)
(15-16)	D7	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	05.05	Mélange séparable
(17-19)	D8	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	09.64	Mélange séparable
(20-21)	D9	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	03.06	Mélange séparable
(22-26)	D10	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	07.96	Mélange séparable
(27-31)	D11	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	06.95	Mélange séparable
(32-35)	D12	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	05.47	Mélange séparable
(36-44)	D13	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 / 2)	10.42	Un seul composé (Mounir +)
(45-66)	D14	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (96 / 2)	20.49	Mélange séparable
(67-68)	D15	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (96 / 4)	17.69	Mélange séparable
(69-74)	D16	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 / 10)	09.52	Mélange séparable
(75-81)	D17	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	02.79	Mélange séparable

		(90 / 10)		
(82)	D18	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 / 10)	traces	Mélange séparable

L'analyse des résultats des spectres RMN-¹H que nous avons obtenus, confirment que la fraction D de la phase des alcaloïdes totaux de l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. est un mélange de (2 ou 3) composés.

La phase mobile que nous avons utilisée dans la purification de la fraction D (dichlorométhane/méthanol + 2 gouttes de NH₃), nous a permis d'observer une séparation des deux molécules sur les plaques de chromatographie sur couche mince sous forme de deux tâches séparées sous U.V à 254 et 366 nm. Par contre, il s'est avéré impossible d'obtenir les molécules pures en utilisant la chromatographie sur colonne car leurs temps de rétention étaient trop proches.

7. Elucidation structurale des composés isolés de l'extrait éthanolique de *F. capreolata*:**7.1. Elucidation structurale des composés isolés de la phase organique :****7.1.1. La fraction A6 (20-21) :**

L'analyse du spectre RMN ^1H de la fraction (20-21), de la phase organique (Phase A) de l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. montre :

- Un signal triplet à $\delta_{\text{H}} = 0.86$ ppm correspondant au groupe méthyle CH_3 .
- Un signal large à $\delta_{\text{H}} = 1.25$ ppm correspondant à plusieurs groupements méthylènes (CH_2 -4 à CH_2 -15).
- Un signal quintuplet à $\delta_{\text{H}} = 1.61$ ppm correspondant à un groupement méthylène CH_2 -3.
- Un signal triplet à $\delta = 2.32$ ppm caractéristique du groupement méthylène CH_2 -2 adjacent au carbonyle.

Ces données spectroscopiques du RMN-1H de cette fraction comparées aux résultats de la littérature (Smadi, 2007), confirment que ce composé est un acide gras saturé : l'acide palmitique.



Figure 32 : Structure chimique de l'acide palmitique (composé C1).

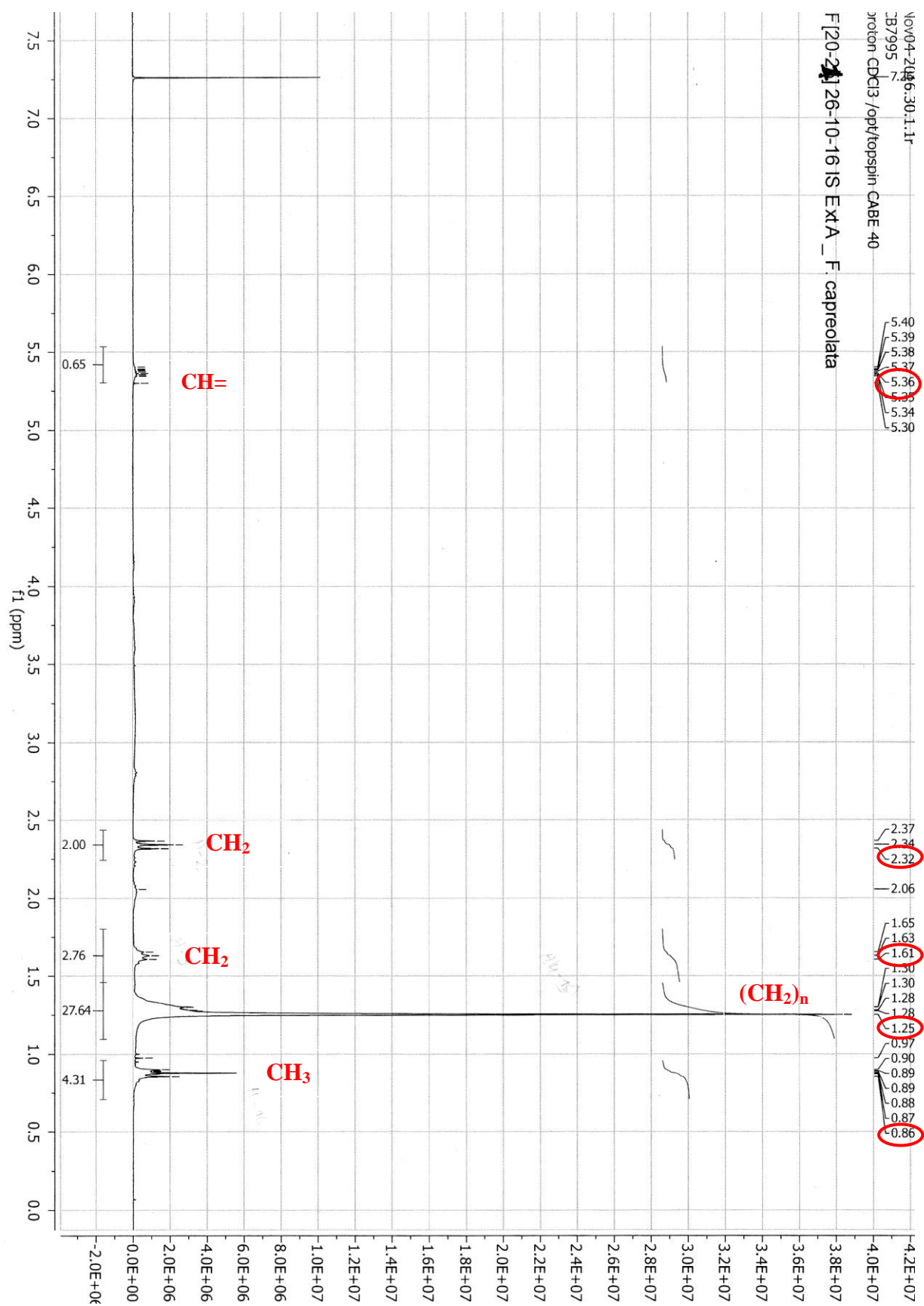


Figure 33 : Spectre RMN ¹H de la fraction (20-21), de la phase organique (Phase A).

7.1.2. La fraction A7 (17-19) :

L'analyse du spectre de la fraction (17-19) (Fig.35) présente les signaux suivants :

- Un signal triplet à $\delta_H = 0.86$ ppm d'intégration 3H correspondant au groupe méthyle CH_3 (C18).
- Un signal large à $\delta_H = 1.25$ ppm correspondant à plusieurs groupements méthylènes $(CH_2)_n$.
- Un signal quintiplet $\delta_H = 2.81$ ppm d'intégration 2H correspondant au proton H11.
- Un signal quintiplet à $\delta_H = 2.05$ ppm correspondant aux protons (H_2 , H_8 et H_{14}).
- Un signal multiplet à $\delta_H = 5.36$ ppm caractéristique des protons oléfiniques (C_9 , C_{10} , C_{12} et C_{13}).

Les données de ce spectre sont caractéristiques d'un acide gras polyinsaturé oméga-6 : l'acide linoléique.

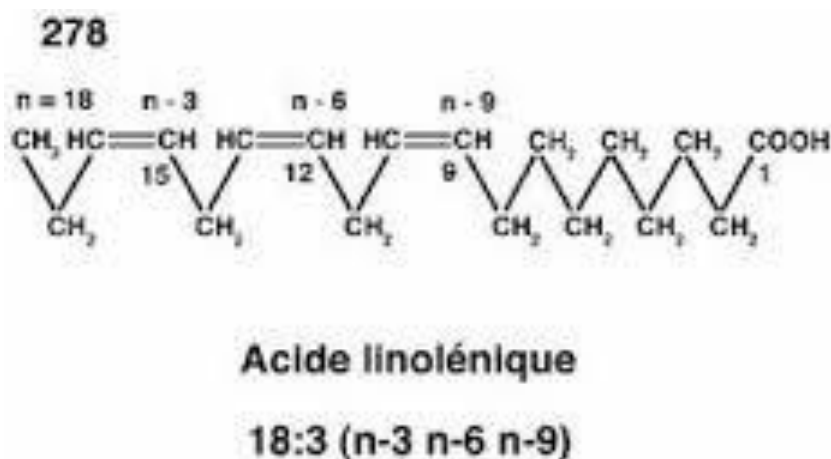


Figure 34 : Structure chimique de l'acide linoléique (composé C2).

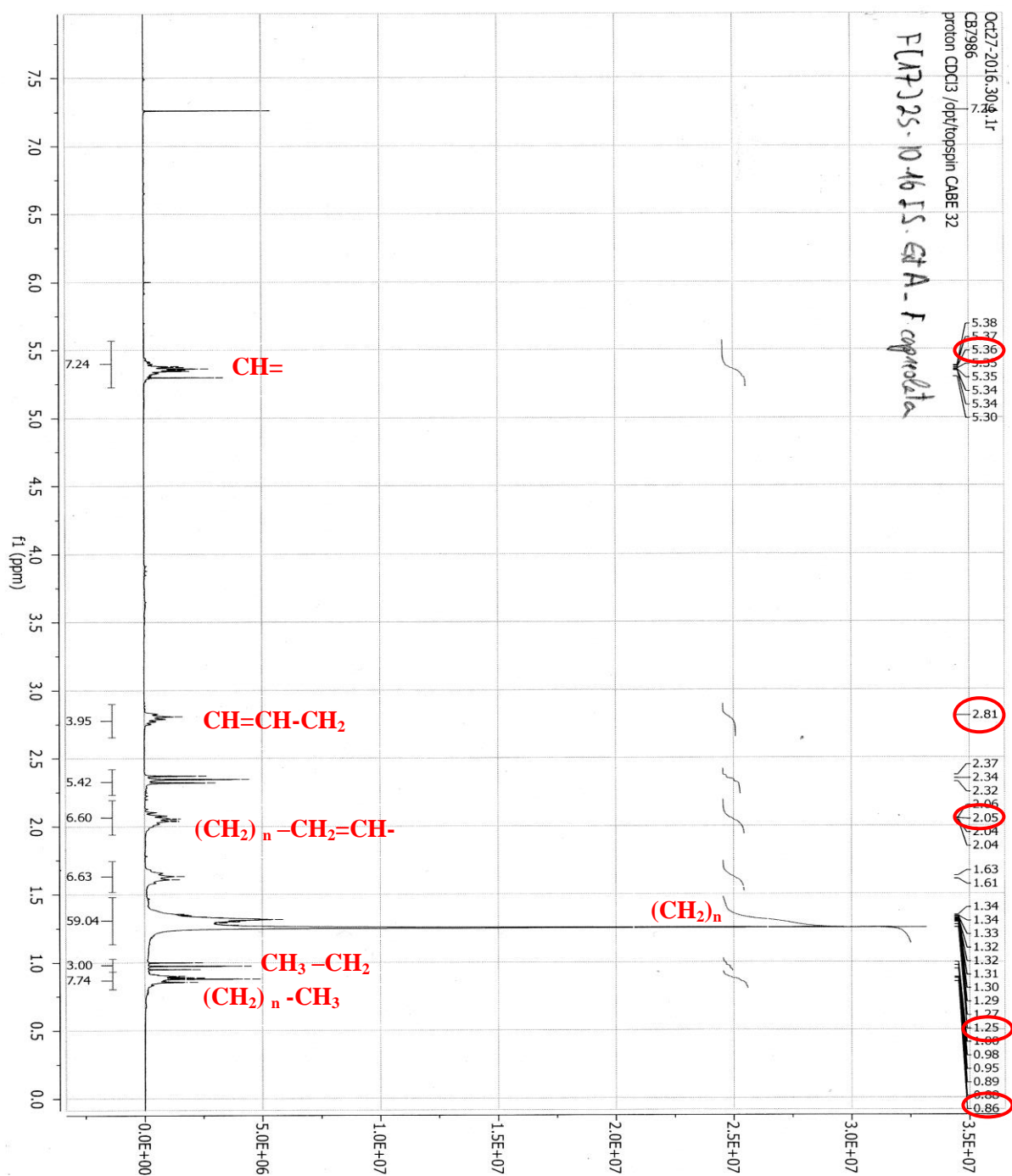


Figure 35 : Spectre RMN ¹H de la fraction (17-19), de la phase organique (Phase A).

7.2. Elucidation structurale des composés isolés de la phase des alcaloïdes totaux :

7.2.1. La fraction A6 :

Le composé C3 de la fraction A6 se présente sous la forme d'un solide de couleur vert noirâtre soluble dans le dichlorométhane. Ce composé réagit avec le réactif de Monir en affichant une seule tache de couleur orangé.

Le tableau 20 présente les données du spectre ^1H -RMN de la fraction A6, obtenue par fractionnement de la phase des alcaloïdes totaux (fraction A) de l'extrait éthanolique de l'espèce *F. capreolata* L.

Tableau 20 : Données RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) du composé C3.

Atome H	δ Proton (ppm), signal	Intégration
1	6.28, s	2H
4	6.56, s	1H
5A	2.85, m	1H
5B	2.87, m	1H
6A	3.53, m	1H
6B	2.81, m	1H
7	2.35, s	3H
8A	-	-
8B	-	-
11	7.08, d	1H
12	6.88, d	1H
13A	3.47, d	1H
13B	3.29, d	1H
14	-	-
R1	-	-
R2	3.82, s	3H

R3	6.14, s	2H
R4	-	-

L'analyse du spectre ^1H -RMN de la fraction A6, nous a permis d'observer :

- deux singulets à $\delta_{\text{H}} = 6.28$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6.56$ ppm. Ces deux signaux représentent deux protons aromatiques dont les constantes de couplage indiquent qu'ils forment un cycle aromatique, ces protons sont attribués aux H-1 et H-4.
- Dans la même zone, nous observons également deux doublets chacun intégrant pour 1H à $\delta_{\text{H}} = 7.08$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6.88$ ppm. Ces signaux présentent deux protons aromatiques d'un deuxième cycle aromatique.

Nous pouvons observer aussi :

- Un singulet d'intensité 3H à $\delta_{\text{H}} = 2.35$ ppm (H-7) correspondant aux protons du groupe N-methyl.
- Un singulet d'intensité 3H à $\delta_{\text{H}} = 3.82$ ppm (R2) correspondant aux protons du groupe O-methyl.
- Un autre singulet d'intensité 2H à $\delta_{\text{H}} = 6.14$ ppm correspondant aux protons du groupement méthylène-dioxy (O-CH₂-O).

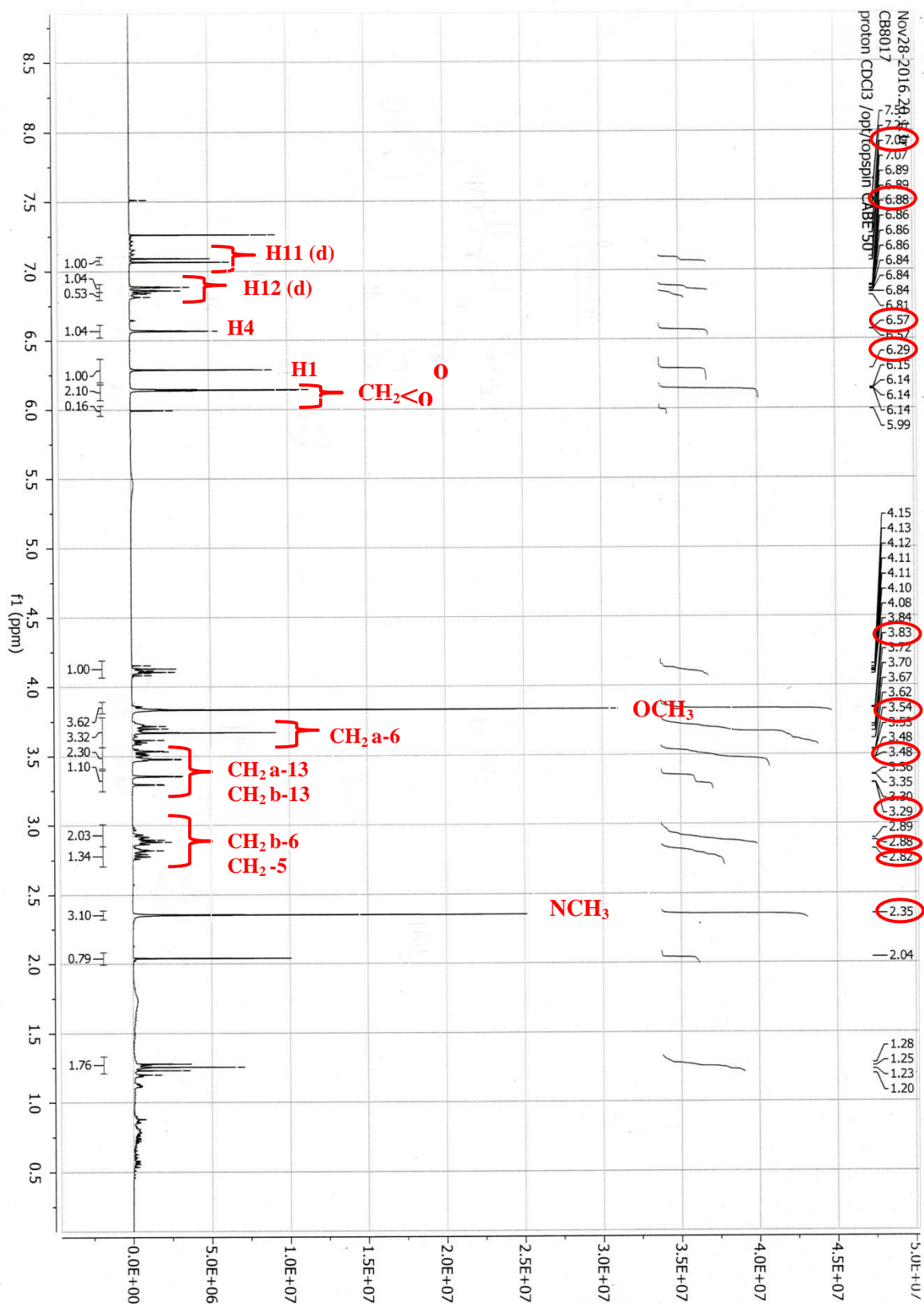


Figure 36 : Spectre RMN- ^1H de la fraction (A6), de la phase des alcaloïdes totaux.

Dans le spectre de RMN-¹³C de la fraction A6, nous avons identifié la présence de vingt signaux distincts (tableau 21).

Tableau 21 : Données RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) du composé C3.

Atome C	δ Proton (ppm), signal	Type C
1	110.68, d	-CH-
2	144.37, s	-CH-
3	145.52, s	-CH-
4	110.68, d	-C=C-
4A	126.27, s	-C=C-
5	28.80, t	-CH ₂ -
6	48.33, t	-CH-
7	39.26, q	N-CH ₃
8	205.40, s	C=O
8A	119.94, s	-C=C-
9	143.99, s	-C=C-
10	147.84, s	-C=C-
11	114.97, d	-CH-
12	118.14, d	-CH-
12A	143.83, s	-C=C-
13	41.20, t	-CH ₂ -
14	70.78, s	-C=C-
14A	130.59, s	-C=C-
R1	-	OH
R2	55.79, q	O-CH ₃
R3	103.01, t	O-CH ₂ -O
R4	-	

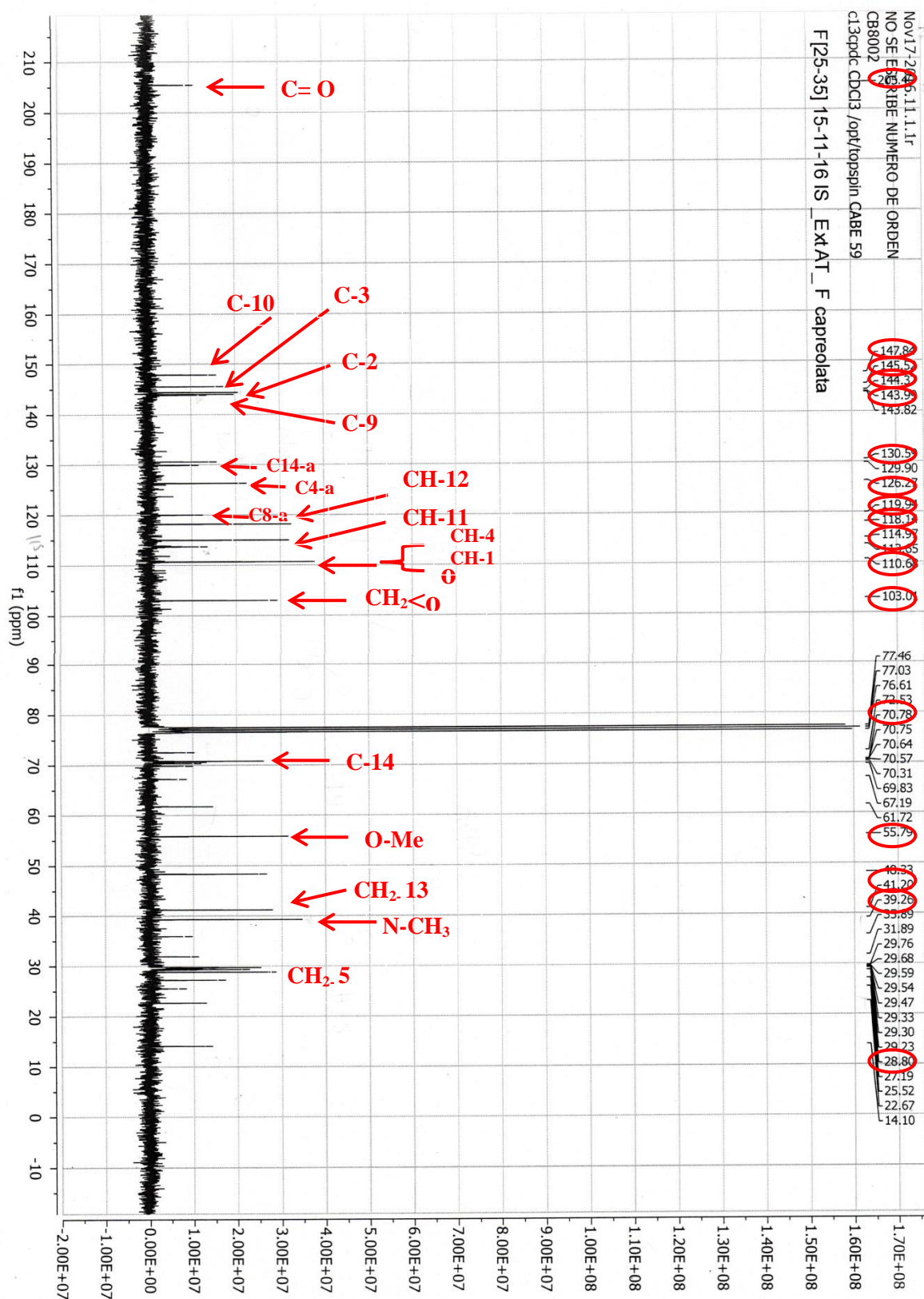


Figure 37 : Spectre RMN-¹³C de la fraction (A6), de la phase des alcaloïdes totaux.

Parmi les signaux identifiés nous avons remarqué la présence de deux carbones quaternaires dont un groupement N-methyl à $\delta_C = 39.26$ ppm (C7) et un groupement O-methyl à $\delta_C = 55.79$ ppm (R2). Six signaux de CH et un signal de CH_2 ont également observés, ainsi qu'un groupement carbonyle à $\delta_C = 205.40$ (C8). (Fig. 37).

L'ensemble des données des spectres RMN- 1H et RMN- ^{13}C de la fraction A6 comparées aux travaux de Chlebek et *al.*, 2016 ; Seger et *al.*, 2004 et Hussain et *al.* , 1981 réalisés sur les espèces *Fumaria officinalis* et *Fumaria parviflora*, ainsi que les résultats de l'analyse HPLC-MS de cette fraction (Annexe 01), nous a permis d'identifier cette molécule comme étant un alcaloïde spiro-isoquinoline : le Parfumine.

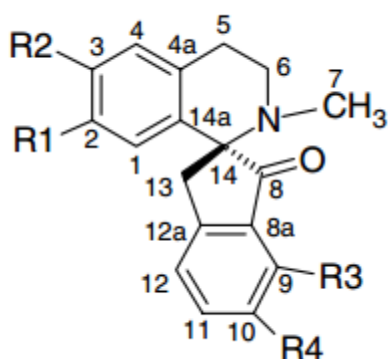


Figure 38 : Structure chimique du parfumine (composé C3).

7.2.2. La fraction FB5:

Le composé C4 de la fraction FB5 se présente sous forme d'un solide de couleur jaune-marron soluble dans le dichlorométhane. Il se révèle sous la lampe U.V. à 254 et 366 nm, ainsi que sous l'effet de réactif de Mounir montrant une couleur orangé.

Les déplacements chimiques en RMN-¹H de la fraction FB5 et les attributions des signaux observés sont présentés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Données RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) du composé C4.

Atome H	δ Proton (ppm), signal	Intégration	Interprétation
1	6.90, s	1H	CH
4	6.64, s	1H	CH
5A	2.53, brs	2H	CH ₂
5B	-	-	
6A	2.53, brs	2H	CH ₂
6B	-	-	
7	1.92, s	3H	NCH ₃
8A	3.70, brs	3H	
8B	-	-	
11	6.67, m	1H	CH
12	6.67, m	1H	CH
13A	3.73, brs	1H	CH
13B	-	-	
14	-	-	
R1	5.95, s	2H	O-CH ₂ -O
R2	-	-	
R3	5.92, s	2H	O-CH ₂ -O
R4	-	-	

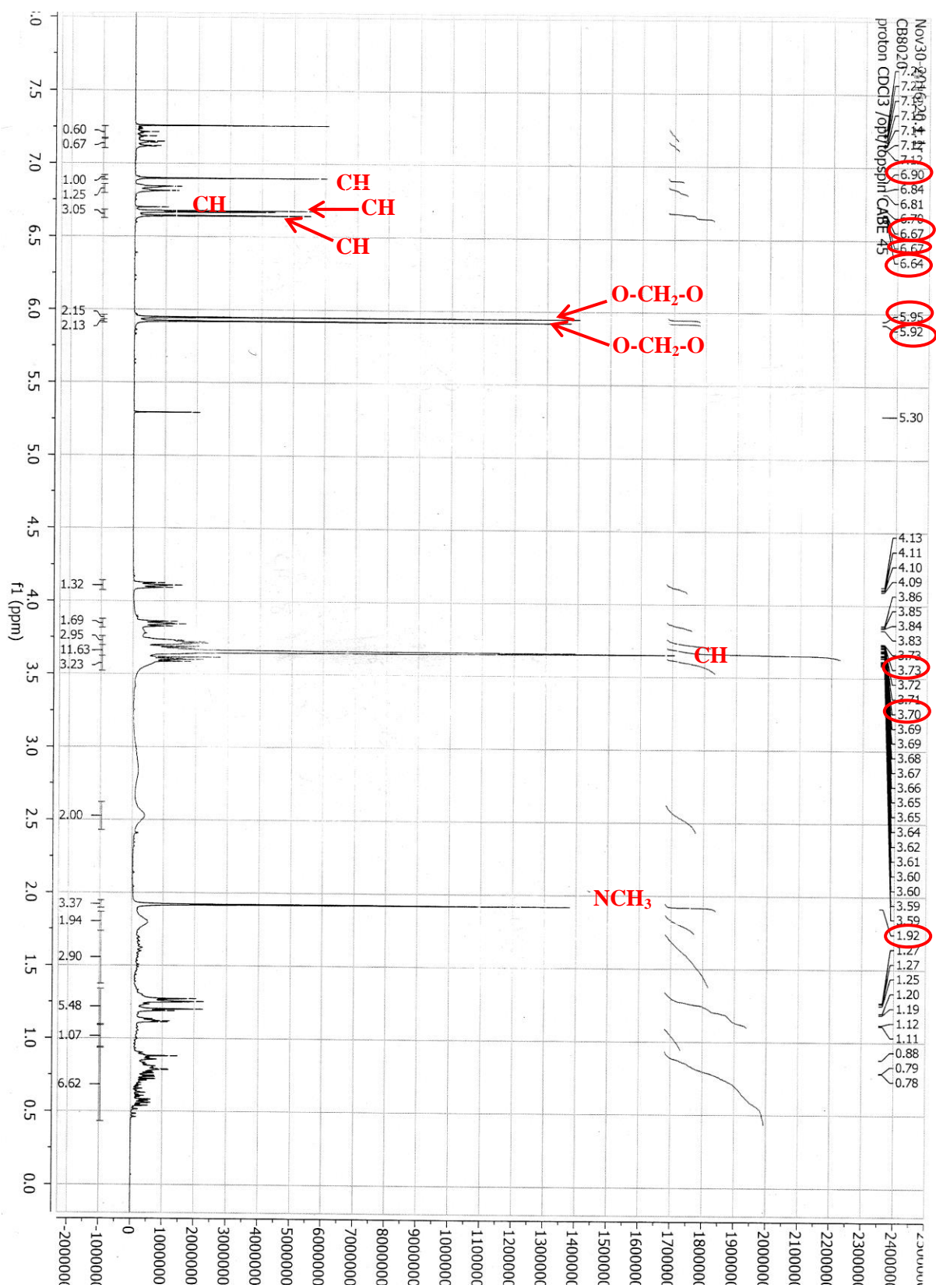


Figure 39 : Spectre RMN-¹H de la fraction FB5, Protopine.

L'examen du spectre RMN-¹H de la fraction FB5 (Fig. 39) de la phase des alcaloïdes totaux (phase B) de l'extrait éthanolique de l'espèce *Fumria capreolata* L. montre :

- Deux signaux singulets à ($\delta_H = 6.90$ ppm et $\delta_H = 6.64$ ppm), s'intégrant pour un proton chacun, correspondant respectivement aux protons H-1 et H-4.
- un singulier d'intégration 3 H à $\delta = 1.92$ ppm attribuable aux protons du groupe N-methyl.
- Deux signaux multiplet d'intégration 1 proton pour chacun, résonant à $\delta_H = 6.67$ ppm, correspondant aux protons H-11 et H-12.
- Enfin, deux signaux sous forme d'un singulet à $\delta_H = 5.92$ ppm et $\delta_H = 5.95$ ppm s'intégrant pour deux protons chacun, correspondant aux protons des groupements méthylène-dioxy (O-CH₂-O).

En comparant les résultats que nous avons obtenus dans notre étude avec ceux de Chlebek et *al.*, 2016 ; Sun et *al.*, 2014 et Seger et *al.*, 2004, nous pouvons identifier le composé C4 comme étant un alcaloïde isoquinoline : le protopine.

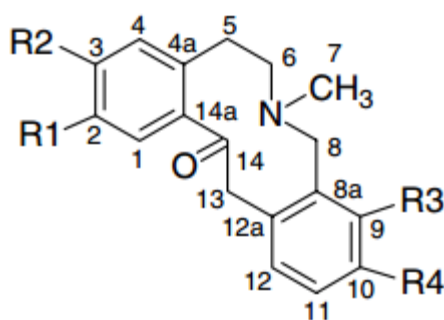


Figure 40 : Structure chimique du Protopine, (composé C4).

Au total, quatre composés ont été isolés à partir de l'extrait éthanolique de l'espèce *F. capreolata* L., récoltée de la péninsule de l'Edough (Annaba, Algérie). Deux acides gras ont été isolés de la phase organique (phase A) : un acide gras saturé, l'acide palmitique (C1) et un acide gras polyinsaturé oméga-6, l'acide linoléique (C2).

Deux autres composés ont été également isolés de la phase des alcaloïdes totaux (phase B) de l'extrait éthanolique dont un alcaloïde spiro-isoquinoline : le parfumine (C3) provenant de la fraction FA et un alcaloïde isoquinoline : le protopine (C4) provenant de la fraction FB.

La figure 41, présente un schéma explicatif des différentes étapes de fractionnement et d'isolement des alcaloïdes à partir de l'extrait éthanolique de l'espèce *F. capreolata* L. récoltée de la région de l'Edough (Annaba, Algérie).

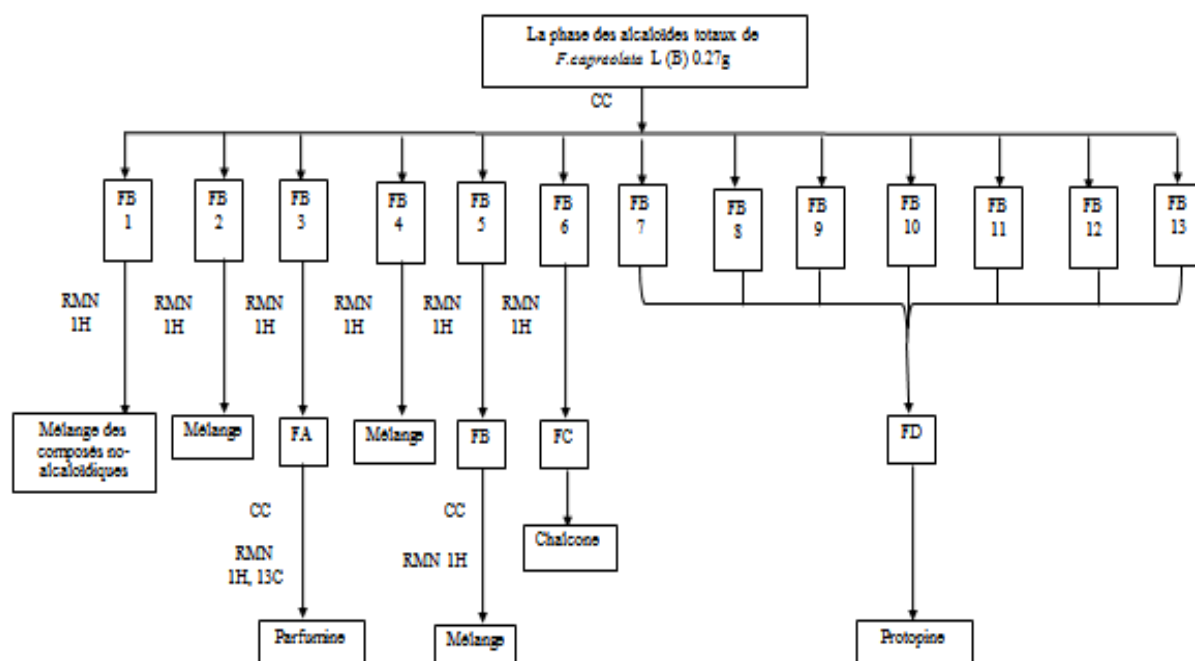


Figure 41 : Les différentes étapes de fractionnement et d'isolement des alcaloïdes de l'extrait éthanolique de l'espèce *F. capreolata* L.

8. Activités pharmacologiques de *Calendula suffruticosa* Vhal et *Fumaria capreolata* L:

8.1. Activités pharmacologiques *in vitro* :

8.1.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* :

L'activité anti-oxydante des extraits bruts éthanoliques des deux plantes médicinales du Nord-est d'Algérie, *Calendula suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L. a été évaluée par trois méthodes distinctes:

- le piégeage du radical libre DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl).
- la réduction du fer ou FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*).
- l'activité anti-oxydante par la méthode de décoloration du bêta carotène.

L'acide ascorbique, le BHA (butyl-hydroxy-anisole) et le BHT (butyl-hydroxy-toluène) sont connus pour leurs propriétés anti-oxydantes et sont utilisés comme contrôles positifs.

8.1.1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

L'activité anti-radicalaire de nos extraits a été évaluée par la méthode spectrométrique au DPPH.

La molécule de DPPH est un radical libre de couleur violet foncé, caractérisée par une bande d'absorption comprise entre 515-520 nm. Le dosage piégeage du radical libre DPPH est basé sur la réduction de ce dernier lorsqu'il est mélangé avec un antioxydant tel que les polyphénols, ce qui conduit à une perte de sa couleur violette qui vire au jaune pâle et à une réduction de son absorption à 520 nm (Bolois, 1958 ; Molyneux, 2004 *in* Watson, 2014).

La figure 42 illustre l'efficacité des contrôles positifs utilisés (acide ascorbique, BHA et BHT) à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (%) en fonction des différentes concentrations.

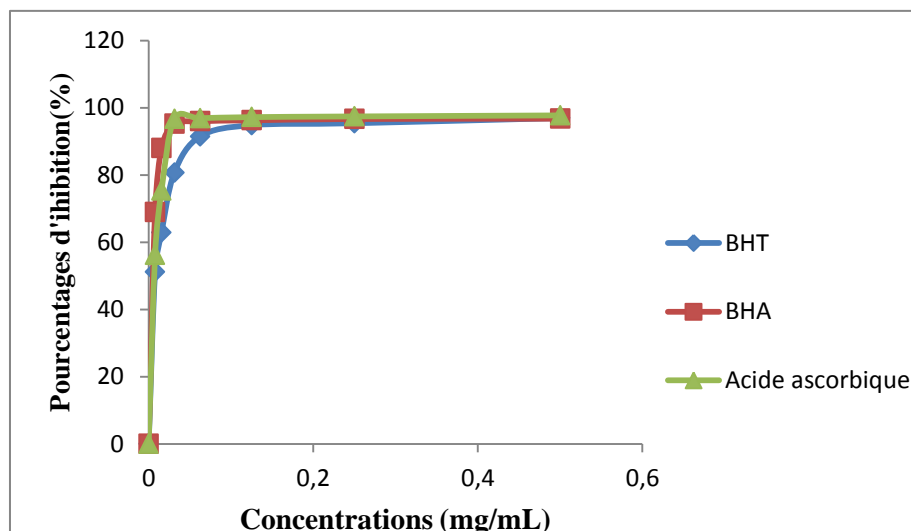


Figure 42 : Activité anti-radicalaire des contrôles positifs (BHT, BHA et acide ascorbique)
(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Pour les contrôles positifs utilisés, les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. Ceci est traduit par la forte activité anti-oxydante des standards qui ont enregistré des pourcentages d'inhibition élevés, de l'ordre de 97.72 ± 0.02 % pour l'acide ascorbique, 96.92 ± 0.04 % pour le BHT et 96.74 ± 0.05 % pour le BHA.

Les figures 43 et 44 rapportent les pourcentages d'inhibition obtenus des extraits éthanoliques de *C. suffruticosa* Vhal. et *F. capreolata* L., comparé à celui des contrôles positifs utilisés (BHA, BHT et l'acide ascorbique) en fonction des différentes concentrations utilisées, vis-à-vis du piégeage du radical libre DPPH.

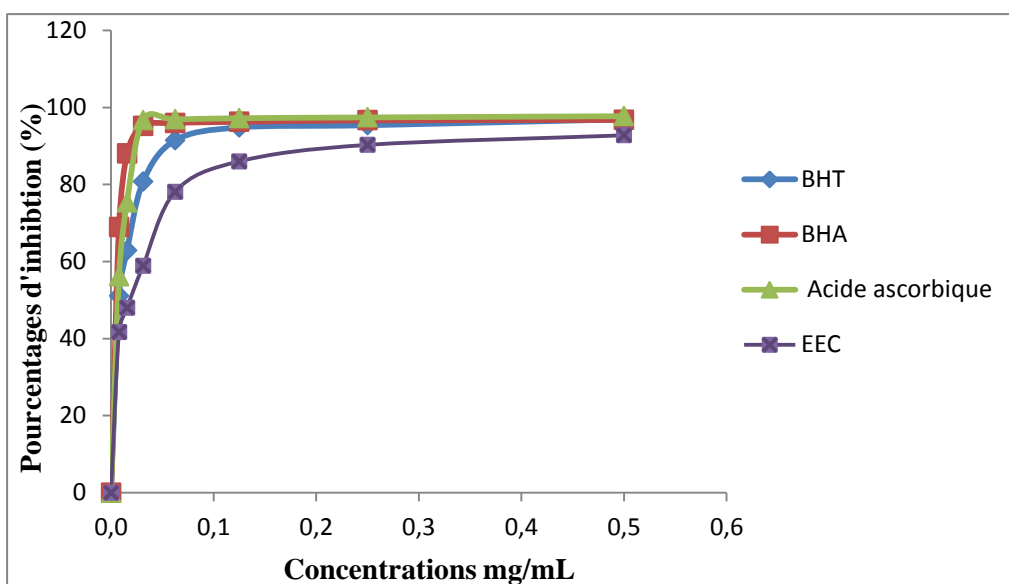


Figure 43: Activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal.

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

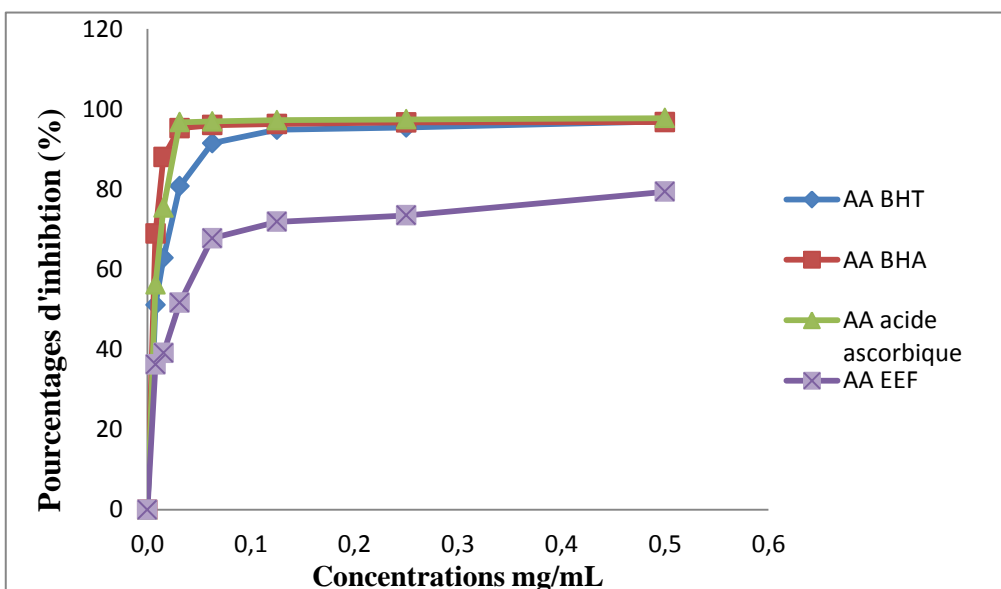


Figure 44 : Activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L.

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Les figures 43 et 44 montrent que les pourcentages d'inhibition sont importants à différentes concentrations ; ce qui indique la présence des composés pouvant réduire le radical DPPH.

D'après les résultats obtenus, on remarque une augmentation de l'activité anti-radicalaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits testés. A la concentration 0,5 mg/ml l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *C. suffruticosa* Vhal. a montré une forte activité anti-radicalaire avec un pourcentage de réduction du DPPH de 92.07 ± 0.13 %. L'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. affiche également une importante activité anti-radicalaire avec un pouvoir du piégeage du radical DPPH élevé (72.35 ± 0.27 %) à la concentration 0.5 mg/ml.

Les résultats indiqués dans le tableau 23 présentent les concentrations des extraits qui piègent 50% du radical DPPH (IC50). Cette dernière est inversement liée à la capacité anti-oxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50% ; plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité anti-oxydante d'un composé est élevé (Pokorny et al., 2001 in Djahra, 2014).

Tableau 23 : IC50 trouvées pour les extraits des deux plantes étudiée.

Extraits	IC50 exprimées en mg/ml
Extrait éthanolique de <i>C.suffruticosa</i>	0.017
Extrait éthanolique de <i>F.capreolata</i>	0.030
BHT	0.0078
BHA	0.0058
Acide ascorbique	0.0071

D'après les résultats figurant dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que les trois contrôles positifs utilisés possèdent une activité anti-radicalaire puissante et supérieure à celle des extraits des plantes étudiées. En effet le BHA est le plus actif avec une IC50=0.0058 mg/ml, ensuite l'acide ascorbique puis le BHT (0.0071 mg/ml et 0.0078 mg/ml).

Si nous comparons les IC50 des deux extraits testés, nous remarquons que l'extrait éthanolique du *C. suffruticosa* Vhal. a montré une activité anti-radicalaire très élevé avec une IC50 = 0.017 mg/ ml, suivi de l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. qui a affiché une valeur de la IC50 encore plus élevée (0.030 mg/ml).

D'après les résultats présentés dans le tableau 23, nous avons classé les différents extraits par ordre de réactivité décroissante :

Extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal. > extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. > BHT > acide ascorbique > BHA.

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable d'antioxydants naturels. D'ailleurs le nombre de travaux réalisés sur les antioxydants d'origine végétal reflète incontestablement, leur importance dans plusieurs domaines, médicale ou alimentaire.

Les propriétés anti-radicalaires des produits naturels sont souvent liées à leur aptitude à perpétrer les radicaux stables (Rice-Evans et Packer, 2003).

Il est à noter que plusieurs études décrivant l'activité anti-oxydante des Astéracées par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. De même que de nombreux essais ont été rapportés sur l'espèce *C. officinalis* en particulier. Toutes ces études confirment que cette activité augmente avec la concentration de l'extrait testé.

L'activité anti-oxydante de l'extrait éthanolique de l'espèce *C.suffruticosa* Vhal. que nous avons évalué dans notre travail, s'est avérée plus importante par rapport à d'autres résultats mentionnés. Máriássyová (2006), a noté un pourcentage de réduction de DPPH par l'extrait éthanolique des pétales de l'espèce *C.officinalis* de 58.19%. Ce résultat est nettement inférieur au pourcentage de réduction que nous avons obtenue dans notre étude sur l'espèce *C. suffruticosa* Vhal. (92.07 ± 0.05 %).

Egalement, l'extrait hydro-alcoolique du souci possède une forte activité et présente une valeur d'inhibition (IC50) de radical libre DPPH de 65.19 µg/ml. Cette valeur reste tout de même inférieure à celle de l'hydroxy-toluène butylé (BHT) qui est de 107.04 µg/ml Farahpour, (2014) et Kaur et al, (2016) ont également montré que l'effet antioxydant de l'extrait testé de cette espèce était comparable à celui de l'agent standard (vitamine C), et la valeur IC50 a été estimée à 1,47 µg/ml.

Les travaux de Rigane et ses Coll., en 2013, révèlent que les extraits hydro-méthanoliques des différentes parties ont probablement un effet plus fort à piéger les radicaux libres que le contrôle positif (BHT). L'effet de piégeage des extraits et de standard sur le radical DPPH exprimés en valeurs IC50 était de l'ordre suivant: les fleurs (0,35 mg.ml⁻¹), les feuilles (0,57 mg.ml⁻¹) et le BHT (8,11 mg.ml⁻¹).

D'après ces données, il semble qu'il y ait une corrélation entre le contenu de la plante en polyphénols totaux et en flavonoïdes et l'activité anti-oxydante.

Une autre étude accomplie par Bernatoniene et *al.*, (2011) a montré le rôle important des caroténoïdes, des polyphénols et des flavonoïdes dans la réduction des radical libre (DPPH) de la pommade hydrophilique de l'extrait de *C. officinalis*.

Dans une autre étude, l'extrait éthanolique des fleurs de *Calendula officinalis* a été évalué pour son potentiel antioxydant *in vitro* et *in vivo*. L'extrait de *Calendula officinalis* a montré un effet dose-dépendant de piégeage de radical DPPH et l'IC50 s'est révélé être 100mg / ml (Preethi et *al.*, 2006). L'extrait butanolique de *Calendula* illustre aussi une activité de piégeage de radical libre *in vitro* d'une manière dose –dépendante (Leach, 2008).

D'après la composition phytochimique de l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal., nous pouvons déduire que la forte activité anti-oxydante que nous avons enregistrée au cours de cette étude est probablement due à sa richesse en métabolites secondaires qui possèdent un effet antioxydant tels que l' α tocophérol, campestérol, stigmastérol, β -sitostérol, Lupeol, α -Bisabolol et l'acide α linoléique.

Concernant l'espèce *Fumaria capreolata* L., de nombreuses recherches décrivent l'activité anti-oxydante par le piégeage du radical libre DPPH des espèces du genre *Fumaria*.

Bribi et *al.*, (2013) ont évalué l'activité anti-oxydante de l'extrait des alcaloïdes totaux de la même espèce *Fumaria capreolata* L., par la méthode de piégeage de radical DPPH dans un intervalle de concentrations compris entre 0 et 800 μ g/ml. L'effet anti-radicalaire fort de l'extrait testé a été estimé à $68.31 \pm 0.35\%$ à la concentration 100 μ g/ml. Et les valeurs de la IC50 repérées pour l'extrait testé et le BHA étaient de l'ordre de 28, 87 μ g/ml et 8, 21 μ g / ml. Ce résultat est nettement supérieur à celui que nous avons obtenu dans notre étude, où l'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'espèce *Fumaria capreolata* L. récoltée de la région de l'Edough (la ville d'Annaba), semble avoir une activité anti-radicalaire avec un pouvoir du piégeage du radical DPPH de l'ordre de $72.35 \pm 0.05 \%$ à la concentration 0,5 mg/ml.

Dans le même contexte, Maiza Benabdesselam et ses collaborateurs en 2007, ont étudié l'activité anti-oxydante des extraits alcaloïdiques des deux espèces *Fumaria capreolata* L. et *Fumaria bastardii* natives d'Algérie. L'effet inhibiteur élevé du radical libre DPPH a été exercé par l'extrait des alcaloïdes totaux de l'espèce *F. bastardii* avec un pourcentage de 86% suivi par l'extrait des alcaloïdes totaux de l'espèce *F. capreolata* L. avec un pourcentage d'inhibition de 45, 6%, seulement à la concentration 50 μ g/ml. Plusieurs autres travaux ont démontré l'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de *F.indica* par cette même méthode, et à chaque fois l'extrait a montré un pouvoir inhibiteur significatif de l'ordre de

61.8% (Fazal et al., 2011 in Gupta et al., 2012). Et avec une IC50 de 11 mg/ml, selon Pandey et al., (2014).

Dans les travaux de Orhan et ses collaborateurs (2010), l'activité anti-oxydante de plusieurs types d'extraits de quatre espèces du genre *Fumaria* : *F. cilicica*, *F. densiflora*, *F. kralikii* et *F. parviflora* a été étudiée par plusieurs méthodes. Les résultats obtenus montrent que les extraits testés possèdent une activité significative de piégeage de radical DPPH aux concentrations 250, 500 et 1000 µg/ml. La fraction d'acétate d'éthyle et de dichlorométhane de l'espèce *F. cilicica* présente la plus forte activité avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 76.16 ± 0.12 % et 51.86% respectivement, à la concentration 1000 µg/ml.

Ces résultats, rejoignent ceux de Ivan et al., (2014) qui ont trouvé que l'extrait d'acétate d'éthyle de l'espèce *F. vaillantii* possède l'activité anti-oxydante la plus élevée par rapport au reste des extraits testés, avec un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de 83,41%. Ces auteurs ont rapporté que cette activité est probablement due à la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes (Ivan et al., 2014 in Srivastava et Choudhary, 2014).

Cette propriété anti-oxydante de l'espèce *F. capreolata* L. est peut être due au protopine, qui est un alcaloïde isoquinoléine présent dans l'extrait éthanolique de cette plante comme un composé majeur. Ce dernier est doué de plusieurs activités biologiques.

Les espèces de ce genre contiennent aussi un certain nombre d'acides gras avec un effet antioxydant, tels que : l'acide linoléique, l'acide oléique, l'acide palmitique et l'acide myristique (Habibi Tirtash et al., 2011). Ces derniers ont été détectés dans l'extrait étudié de notre plante.

Nous pouvons conclure que, les deux plantes que nous avons étudiées ainsi que différents autres espèces du même genre, étaient nettement différentes en ce qui concerne leur composition phytochimiques, notamment les composés phénoliques et les flavonoïdes. De ce fait elles diffèrent également par leurs activités anti-oxydantes. Cependant nous avons notés que les propriétés anti-oxydantes des deux espèces de notre étude, étaient en corrélation avec la teneur totale en composés phénoliques et en flavonoïdes.

8.1.1.2. Test du blanchissement du β -carotène (*β -carotene bleaching method*) :

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été également testé par la méthode de décoloration du β -carotène.

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, et des hydro peroxydes diène conjugués (Kaur et Kapoor, 2002). Ce test est basé sur le fait que ces radicaux libérés vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé qui perd ses doubles liaisons entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est mesuré spectrophotométriquement à une longueur d'onde $\lambda = 490$ nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Yang *et al.*, 2008 in Djemai Zoughlache, 2009).

La figure 45 montre le pourcentage d'inhibition du blanchissement du β -carotène, exercée par les extraits éthanoliques des deux plantes étudiées et l'antioxydant de référence (BHA), après une durée de 120 min d'incubation.

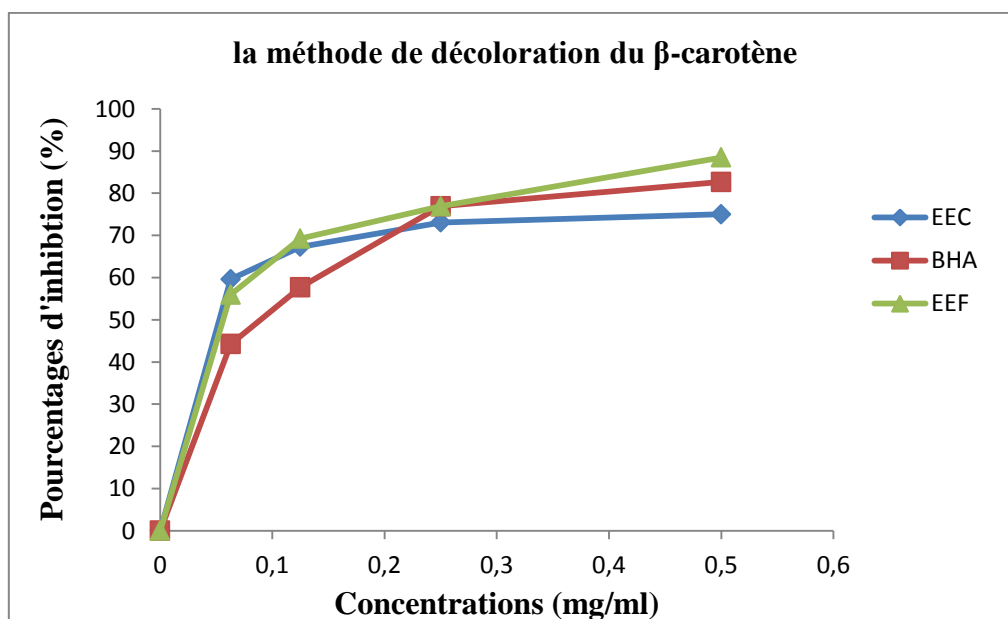


Figure 45 : Pouvoir antioxydant des extraits éthanoliques de *C. suffruticosa* Vhal. et *F. capreolata* L. testé par la méthode de la décoloration du β -carotène.

D'après nos résultats, nous remarquons clairement que les extraits éthanoliques des deux plantes étudiées et le BHA exercent un puissant effet inhibiteur de l'oxydation du β - carotène, après 120 minutes d'incubation.

L'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. montre la plus grande activité inhibitrice de l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène avec un pourcentage de $88.46 \pm 1,02$ % à la concentration 0.5 mg/ml, suivie par le BHA avec un pourcentage de 82.69 ± 0.03 %. Nous remarquons aussi que l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa* Vhal. présente un fort pouvoir d'inhibition de $75 \pm 1,02$ % proche de celui de BHA.

Dans une étude similaire, l'extrait aqueux des fleurs de *C.officinalis* à la concentration de 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a inhibé la peroxydation lipidique de l'acide linoléique avec un taux de 74.6%. Ce résultat est proche de ce que nous avons obtenus dans notre étude pour l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *C. suffruticosa* Vhal. Cette activité est plus importante que celle du même extrait aux concentrations 25 et 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ et l' α -tocophérol (63%) qui a été utilisé comme un standard (Kassim ghaima et al., 2013).

Concernant l'extrait testé de l'espèce *F. capreolata* L., nous avons noté que ce dernier a exercé un pouvoir antioxydant plus fort que l'extrait de *C. suffruticosa* Vhal. et le BHA avec un pourcentage de 82.69 ± 0.03 %.

D'après la littérature, deux espèces du genre *Fumaria* native de l'Algérie ont été investiguées pour leur capacité à inhiber la peroxydation de l'acide linoléique. Maiza-Benabdesselam et al en 2007, ont en effet étudié l'activité anti-oxydante des extraits des alcaloïdes totaux de *F. capreolata* L. et *F. bastardii* L.

Les extraits alcaloïdiques des deux plantes ont exprimé une forte activité anti-oxydante, cependant, l'activité de l'extrait de *F. bastardii* était plus puissante que *F. capreolata* L.

A la concentration de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ les deux extraits testés ont montré un pourcentage de 65 et 67.8% d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, pour les espèces *F. capreolata* L. et *F. bastardii* respectivement.

D'autre part, à la même concentration l'antioxydant hydroxyanisole butylé (BHA), la quercétine, et la caféine possèdent un taux d'inhibition de 80, 56.2 et 64.3%, respectivement.

8.1.1.3. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Cette méthode a été décrite pour la première fois en 1996 par Benize et Strain. La méthode FRAP est une technique spectrophotométrique simple, peu coûteuse et robuste. Elle est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} (De la rosa et al., 2009).

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits éthanoliques de *F. capreolata* L., *C. suffruticosa* Vhal. et de l'acide ascorbique sont représentés dans la figure 46.

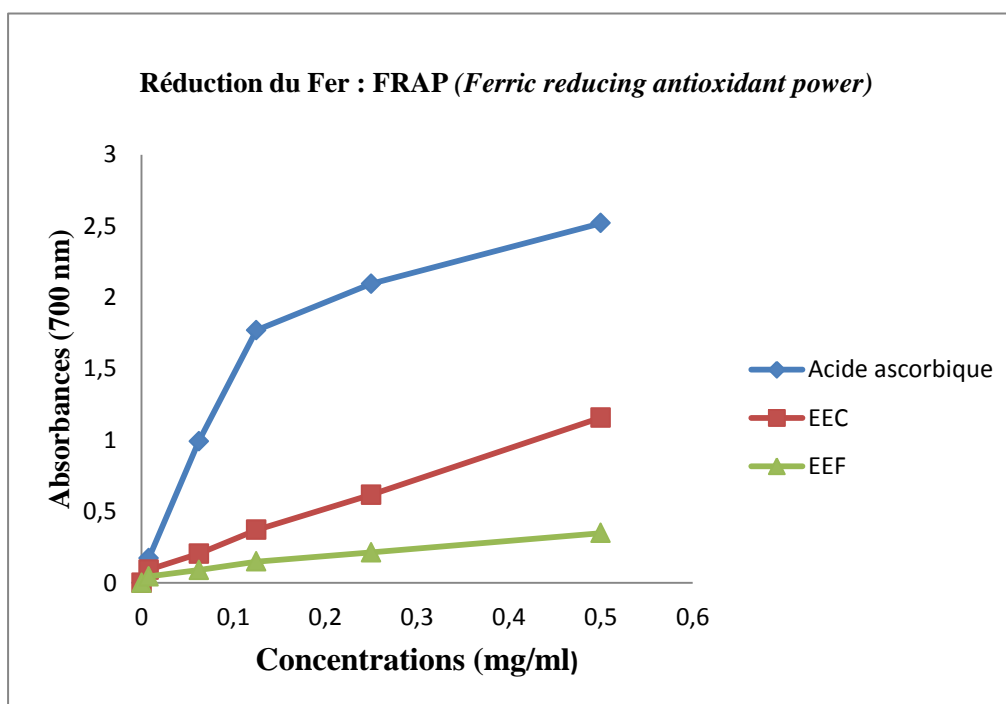


Figure 46 : Pouvoir réducteur des extraits éthanoliques des plantes étudiées et de l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP.

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'augmentation des absorbances du pouvoir réducteur du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées. Les extraits brutes des deux plantes étudiées présentent une activité anti-oxydante nettement inférieure à celle du contrôle positif utilisé (acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir de la concentration (0.5 mg/ml).

Les résultats obtenus dans la figure 46, montrent que la capacité à réduire le fer de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *C. suffruticosa* Vhal. est très élevée avec une densité optique maximale de 1.157 ± 0.0015 à une concentration de 0.5 mg/ml. Mais cette dernière est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique qui présente une DO de 2.52 ± 0.0052 mg/ml

à la concentration 0.1 mg/ml seulement. Tandis que l'extrait brut de *F. capreolata* L. a exprimé un pouvoir réducteur très faible avec des valeurs observées de densités optiques (DO) ne dépassent pas le 1 (DO = 0.349 ± 0.0062) à une concentration de 0.5 mg/ml.

Afin d'avoir une idée sur les extraits les plus actifs, la figure 47 montre une comparaison générale sous forme d'histogrammes des résultats obtenus pour les extraits des deux plantes étudiées et ceux de l'acide ascorbique.

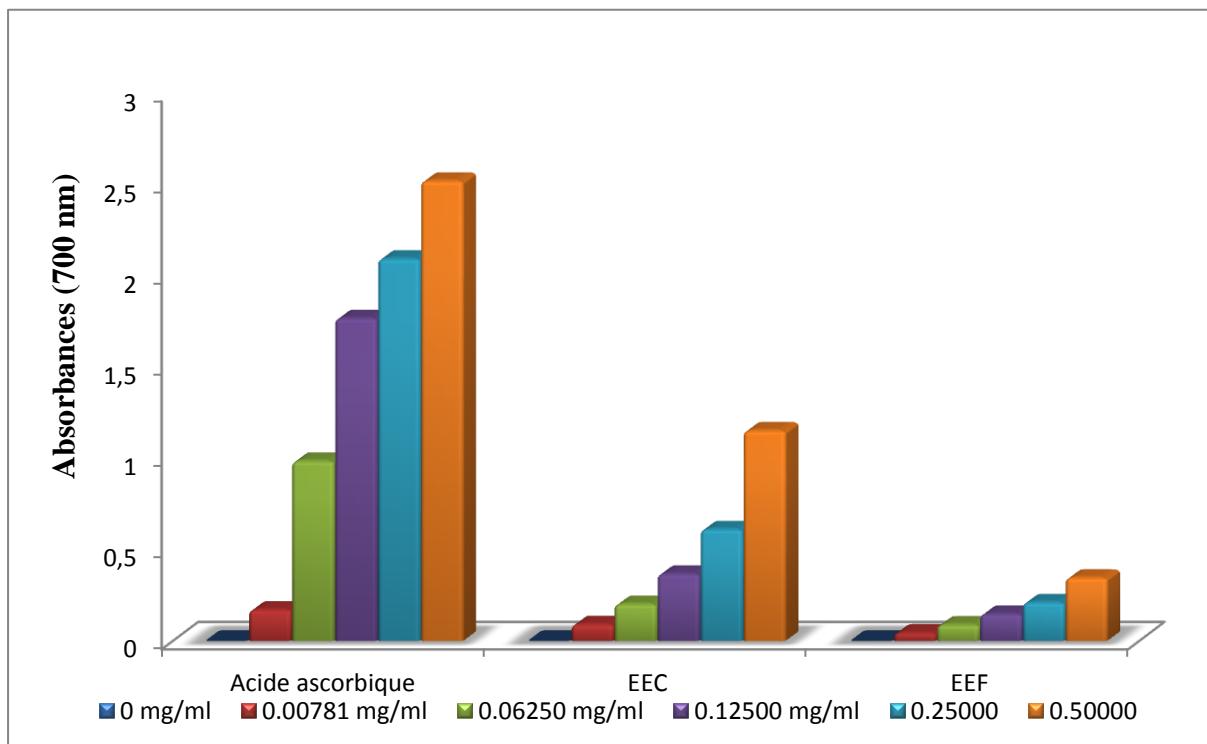


Figure 47 : Pouvoir réducteur des extraits éthanoliques de *C.suffruticosa* Vhal. et *F.capreolata* L.

D'après les graphes illustrés dans la figure 46, Nous pouvons observer nettement la faible capacité des extraits bruts de *C. suffruticosa* et *F. capreolata* à réduire le fer en comparant ces derniers avec le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique qui est de l'ordre de 2.52 ± 0.0052 .

Et donc Le classement de la puissance de réduction de fer des deux extraits peut être établi comme suit : Extrait éthanolique de la partie aérienne de *Calendula suffruticosa* Vhal. > Extrait éthanolique de la partie aérienne de *Fumaria capreolata* L. > Acide ascorbique.

L'étude de l'activité anti-oxydante des espèces du genre *Calendula* par la technique de réduction du fer (FRAP), qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes, a fait l'objet d'un nombre limité des travaux dans la littérature.

D'après nos résultats (FRAP), la capacité réductrice de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de la plante *C. suffruticosa* Vhal. récoltée de la région de l'Edough est plus élevée avec une densité optique de 1.157 ± 0.0015 à la concentration de 0.5 mg/ml.

Cette potentialité est en relation avec la nature des substances réductrices existantes dans l'extrait testé.

La capacité de la réduction d'un composé peut servir comme indicateur de son potentiel antioxydant. La présence de réducteurs (comme antioxydants) provoquent la conversion du complexe Fe^{3+} ferricyanure à la forme ferreuse Fe^{2+} . Bien que le fer soit essentiel pour le transport d'oxygène pour la respiration et l'activité des enzymes, il s'agit d'un métal réactif qui catalyse des dommages oxydatifs dans les tissus vivants et les cellules (Bourgou et al., 2008). Rigane et al., (2013), ont étudié l'activité anti-oxydante par l'essai de FRAP de l'extrait méthanolique des fleurs et des feuilles de l'espèce *Calendula officinalis* collecté de la région Béja en Tunisie. Les auteurs ont obtenu des valeurs de 28.37 ± 0.12 et 17.68 ± 0.02 mM de Trolox pour les fleurs et les feuilles respectivement.

Egalement Belabbes en (2014) dans son étude sur l'espèce *Calendula arvensis* de l'ouest algérien, a rapporté un pouvoir antioxydant intéressant de l'huile essentielle de cette espèce vérifié par le test de réduction du Fer. Où il a enregistré à la concentration de 90.7 $\mu\text{g/mL}$ un pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *C. arvensis* largement supérieur avec une valeur de $DO=1.698$.

En outre, l'activité réductrice de l'extrait éthanolique de la plante *Fumaria capreolata* L. issu également de la région de l'Edough était modérée et nettement inférieur à celle de l'acide ascorbique, avec une densité optique de 0.349 ± 0.03 à la concentration de 0.5 mg/ml.

Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Maiza-Benabdesselam et al., (2007) pour la méthode FRAP, ou les extraits des alcaloïdes totaux de *F. bastardii* et *F. capreolata* ont montré une faible activité pour la réduction du fer par rapport aux standards utilisés, selon l'ordre suivant : quercetine > BHA > l'acide gallique suivi par les extraits des alcaloïdes totaux de *F. bastardii* et *F. capreolata*. Dans une autre étude, la meilleure capacité réductrice de l'extrait des alcaloïdes totaux de *F. capreolata* a été obtenue à la concentration 800 $\mu\text{g/ml}$ avec une densité optique de l'ordre de 0.57 ± 0.005 (Bribi et al., 2013).

L'extrait éthanolique et les fractions de quatre plantes appartenant au genre *Fumaria* et provenant de la Turquie, ont été testé pour leur potentiel réducteur. L'ensemble des extraits testés ont exercé une faible capacité réductrice en comparant avec le contrôle positif utilisé.

L'activité réductrice la plus importante a été obtenue par l'extrait éthanolique de *Fumaria kralikii* avec une absorbance de 0.390 ± 0.04 à la concentration $1000\mu\text{g/ml}$ (Orhan et al., 2010).

D'une manière générale, l'activité réductrice est attribuée à la composition chimique des extraits testés. Cependant, elle peut être due à l'un des constituants majoritaires ou à d'autres constituants minoritaires ou également à une synergie entre eux.

8.2. Activités pharmacologiques *in vivo* :

8.2.1. Toxicité aiguë :

La dose létale ou la DL50 des extraits éthanoliques de *Fumaria capreolata* L. et *Calendula suffruticosa* Vhal. n'est pas connue dans la littérature consultée, ainsi la recherche d'une éventuelle toxicité des deux plantes est nécessaire.

La toxicité aiguë est définie comme l'effet nocif d'une substance chimique ou d'un médicament sur un organisme vivant. L'Organisation de la Coopération Economique et du Développement (OCED) définit la toxicité aiguë comme : « les effets indésirables qui se produisent dans un laps de temps court après l'administration (par voie orale) d'une dose unique d'une substance ou des doses multiples dans les 24 heures (Balazka et Hayes, 2007).

Dans notre travail l'essai est réalisé selon la méthode décrite par Rasekh et *al.*, (2008), sur des souris blanches de souche swiss mâles et femelles.

Cinq (05) doses de chaque extrait des deux plantes sont réservées.

L'administration orale de l'extrait éthanolique de la partie aérienne de l'espèce *C. suffruticosa* Vhal. à des doses croissantes allant de 100 mg/kg à 1000 mg/kg de poids corporel des souris, n'a induit aucun signe de toxicité aiguë, au cours de la période de l'expérimentation (14 jours d'observation) quelle que soit la dose administrée (Tab. 24).

Tableau 24 : Données de la toxicité aiguë de l'extrait éthanolique de l'espèce *C. suffruticosa* Vhal.

Lot	Nombre des souris (n)	Doses (mg/kg)	Nombres des morts	Pourcentages de morts (M %)
1	6	100	0	00
2	6	200	0	00
3	6	400	0	00
4	6	800	0	00
5	6	1000	0	00

En effet la DL50 par voie orale de l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal. est supérieure à 1000 mg/Kg de P.C.

De nombreuses études de toxicité aiguë réalisées sur l'espèce *Calendula officinalis* chez le rat et la souris confirment nos résultats.

Ces études indiquent que l'extrait alcoolique et hydro-alcoolique n'a pas causé la mort chez les animaux après administration à des doses orales allant jusqu'à 5g / kg. Ceci confirme que cette espèce (*C. officinalis*) est relativement non toxique (Leach, 2008 ; Silva et al., 2009 ; Agarto et al., 2011). Cependant l'étude de la toxicité sub-chronique de la même espèce (*C. officinalis*) à des doses de 50, 250 et 1000 mg / kg / jour, a montré que plusieurs éléments sanguins tels que : l'hémoglobine, les érythrocytes, les leucocytes et le temps de coagulation sanguine ont été significativement affectés chez les rats mâles et femelles après 90 jours ; et l'examen histo-pathologique des tissus a montré de légères anomalies dans le parenchyme hépatique.

L'extrait aqueux de cette plante (*C. officinalis*) a été également étudié pour sa toxicité aiguë, et aucun signe de toxicité n'a été observé chez les rats qui ont reçu une dose orale unique de 5000 mg / kg de poids corporel (Roopashree et al., 2009).

D'autre part les animaux traités avec l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. à la dose 100, 200, 400, 800 et 1000 mg/kg de p.c par voie orale, ont présenté une carte clinique dépourvue de symptômes de toxicité. Leur comportement ressemble à celui des animaux témoins jusqu'au 7^{ème} jour de l'expérience.

Durant la deuxième semaine de l'expérience, nous avons observé chez les souris traitées par l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. à la dose 800 mg/kg, une diminution de leurs mobilités et une augmentation de leurs temps de somnolence. Tous ces changements de comportement augmentaient avec la dose ; alors que les premiers décès sont survenus dans le dixième jour après le traitement chez les souris traités par l'extrait à la dose 1000 mg/kg (Tab. 24).

Tableau 25: Doses injectées et transformation en pourcentage du nombre de morts dans chaque lot de la toxicité aiguë de l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L.

Lot	Nombre des souris (n)	Doses (mg/kg)	Nombres des morts	Pourcentages de morts (M %)
1	6	100	0	0
2	6	200	0	0
3	6	400	0	0

4	6	800	0	0
5	6	1000	2	20

Les résultats montrent que la DL50 par voie orale de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. est donc supérieure à 1000 mg/Kg de P.C. (voir Tab. 24)

Singh et Kumar en 2011, ont rapportés que l'extrait éthanolique à 50% de *F. indica* n'induit aucun signe de toxicité et aucune mortalité à des doses de 1, 2, 5 et 5 g / kg administrés par voie orale chez les souris de souche albinos.

Bribi et *al.*, (2013), ont étudiés la toxicité aiguë de l'extrait des alcaloïdes totaux de l'espèce *Fumaria capreolata* L. récoltée dans la région de Bejaia. L'étude a été effectuée conformément aux lignes directrices de l'OECD 420 ou la dose d'essai limite utilisé est égale à 2000mg/kg.

Les souris à qui, on a administrés les alcaloïdes totaux de *F. capreolata* L. n'ont pas montré un comportement anormal, à l'exception de la sédation légère qui a été observée pendant les 4 heures initiales après l'administration de l'extrait. Durant cette étude, aucune mortalité liée à la substance d'essai n'a été observée à 2000mg/kg pendant 14 jours après le traitement avec les alcaloïdes totaux de *F. capreolata* L. et aucun changement attribuable au traitement n'a été observé dans le poids corporel (Bribi et *al.*, 2013).

Une variété d'alcaloïdes isoquinoléines toxiques a été détectés dans l'extrait éthanolique de notre plante (*F. capreolata* L.), y compris le portopine et le parfumine, ces composés ont une dégustation amère et ont des effets spasmolytiques sur les récepteurs GABA. Les effets primaires semblent être sur le système gastro-intestinal avec des signes de constipation suivis d'une salivation excessive, d'une urination fréquente et d'une diarrhée. Les animaux affectés sont déprimés et somnolents et peuvent développer des convulsions dans des cas graves (Knight, 2007). Ces symptômes confirment les signes que nous avons observés dans notre étude.

Le protopine, est un alcaloïde isoquinoléine isolé de *F. officinalis* provoque des excitations et des convulsions à grandes doses (Base de données complète sur les médicaments naturels, 2007 in Khare, 2008).

8.2.2. Activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de *C. suffruticosa* Vhal. et

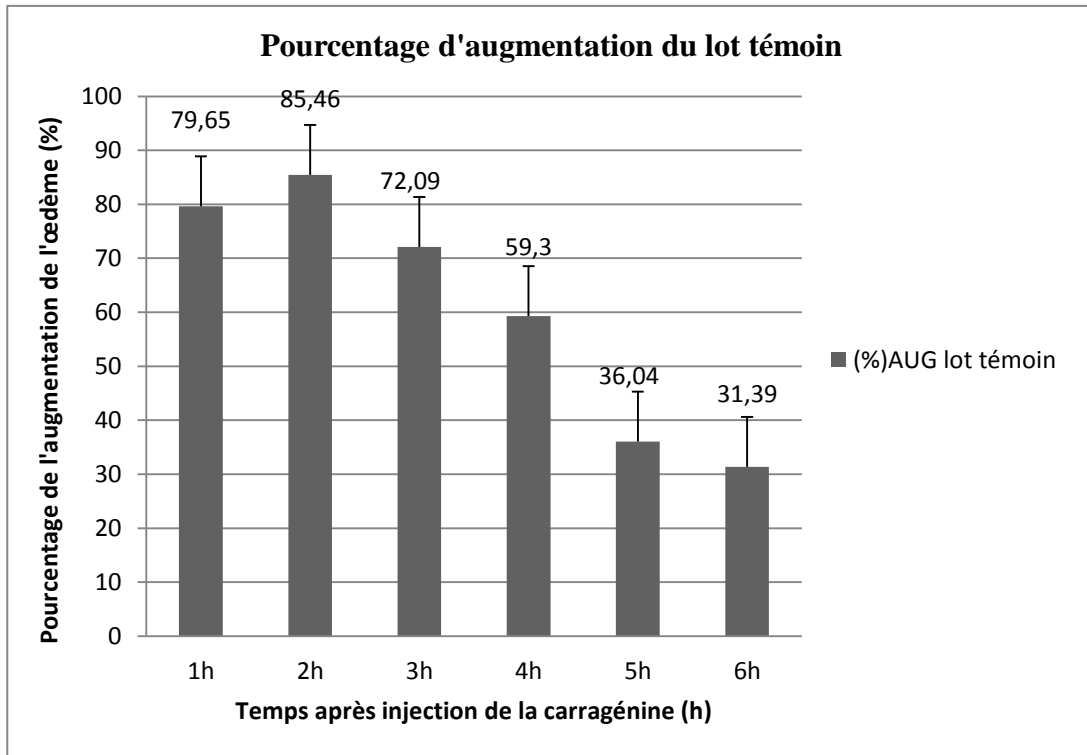
F. capreolata L. *in vivo* :

L'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques des parties aériennes de *Calendula suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L., récoltées de la péninsule de l'Edough (Seraidi, Nord-Est de la ville d'Annaba, Algérie) a été évaluée *in vivo* par la méthode de Winter et *al.* (1962), sur le modèle de la patte inflammatoire induit par la carragénine. Cette dernière est un muco-polysaccharide sulfaté provenant d'une Rhodophyceae (Di rosa, 1972 *in* Soro, 2015). Son injection provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire (Devulder et *al.*, 2002 ; Rousselet et *al.*, 2005 *in* Mansour, 2015). Le tableau 01 (Annexe 02) représente par groupe, par heure et par caractéristique les valeurs des paramètres statistiques à savoir, la moyenne (\bar{x}), l'écart-type (s) et les valeurs minimales (X_{\min}) et maximales (X_{\max}) relatives à l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits éthanoliques de *Calendula suffruticosa* Vhal et *Fumaria capreolata* L.

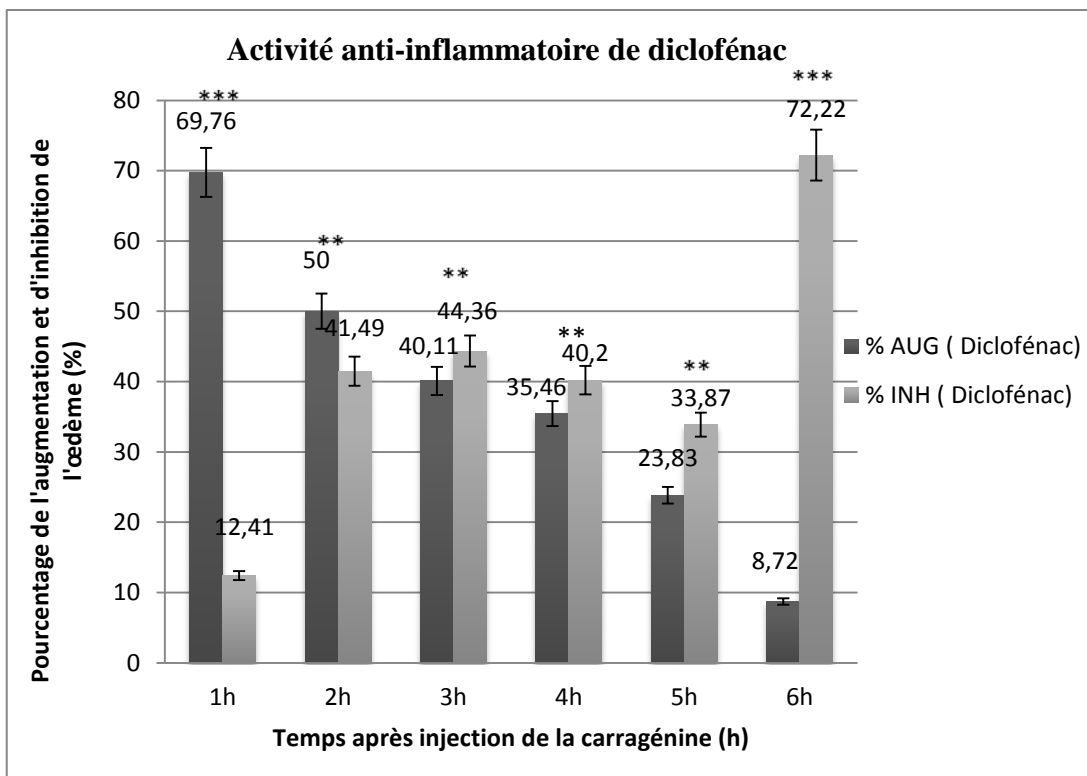
Les données obtenues dans cette étude, ont été analysés par le test d'analyse de la variance à un critère (ANOVA), afin de comparer les moyennes des quatre lots testés dans l'activité anti-inflammatoire de chaque extrait étudié. Dans ce test, nous considérons qu'il existe des différences importantes entre les moyennes des quatre lots lorsque la valeur de probabilité (p) est inférieure ou égal au risque $\alpha = 0,05$ ($p \leq \alpha = 0,05$); ou alors qu'il existe des différences significatives lorsque $p \leq \alpha = 0,01$ et des différences très significatives lorsque $p \leq \alpha = 0,001$ (Dagnelie, 2009).

L'analyse de la variance (ANOVA) de l'activité anti-inflammatoire, des deux doses testées de l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa* et le médicament de référence (diclofénac) en fonctions du temps sont synthétisés dans le tableau 02. (Annexe 03).

Les figures Fig. 48 (A) et (B) présentent les pourcentages d'augmentation et d'inhibition de l'œdème inflammatoire des souris des groupes témoin et référence.



(A)



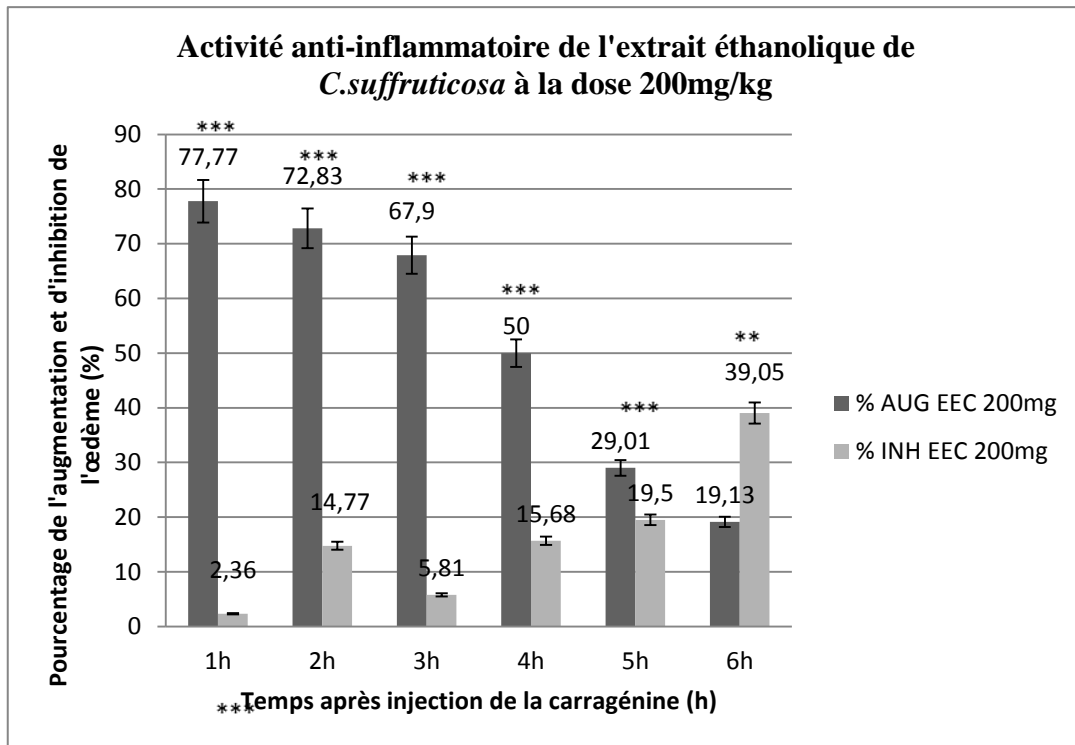
(B)

Figure 48: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des souris du lot témoin pendant 6h (A) ; Pourcentage de l'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot référence pendant 6h (B).

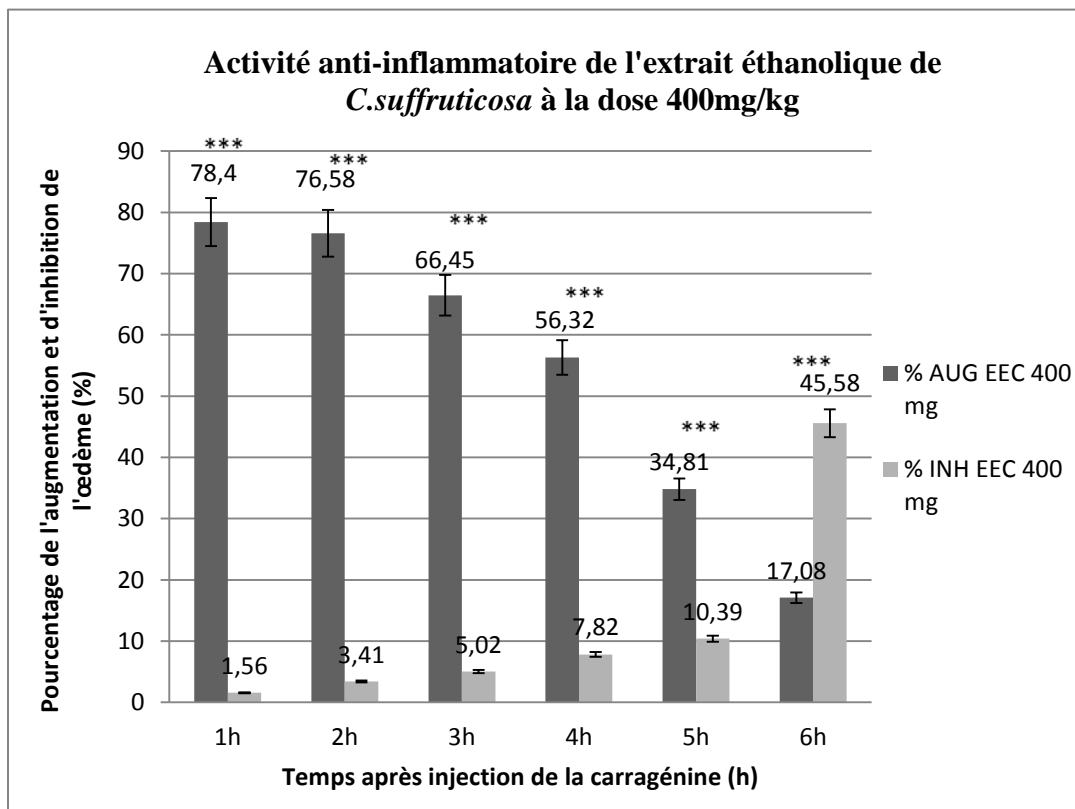
$p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=6)

D'après les résultats obtenus, nous observons qu'il n'y a aucune différence significative dans le volume de la patte des souris du groupe témoin, traités par le NaCl à la concentration 0.9 % pendant les six heures de l'expérimentation (79.65 ± 0.30 %, 72.09 ± 0.61 % et 31.39 ± 0.69 %) (Fig.48, A). Alors que, nous remarquons l'existence des différences très hautement significatives pour les souris du groupe traitées par le médicament de référence (le diclofénac à 50mg/kg), où le pourcentage d'inhibition du volume de la patte est très élevé particulièrement à la sixième heure de l'expérimentation où il atteint 72.22 ± 3.14 % en comparaison aux autres heures (première et troisième heure, respectivement) et aux souris du groupe témoin (Fig.48, B).

Les figures 49 (C) et (D), présentent les pourcentages d'augmentation de l'œdème inflammatoire après injection de la carragénine, et les pourcentages d'inhibition de cet œdème, dans les lots des souris traitées par les deux doses (200 et 400 mg/kg) de l'extrait éthanolique de l'espèce *Calendula suffruticosa* Vhal.



(C)



(D)

Figure 49: Pourcentage d'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot EEC200 pendant 6h (C) ; Pourcentage de l'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot EEC400 pendant 6h (D).
 $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=6)

Nous remarquons que l'administration des deux doses testées 200 mg/kg et 400 mg/kg de l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa* Vhal. a diminué de façon significative ($P \leq \alpha = 0,01$) l'œdème aigue de la patte de souris induit par la carragénine, Cet effet n'est visible qu'à partir de la troisième heure. Par contre il atteint un maximum d'activité à la sixième heure, où on obtient des pourcentages d'inhibition respectifs de $39.05 \pm 1.98 \%$ et $45.58 \pm 1.00 \%$ (Fig. 49 C et D).

Les données de l'activité anti-inflammatoire ont été analysées également par le test de Tukey, pour rechercher les groupes des lots homogènes par la variable temps (heure). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes soulignées qui correspondent à des moyennes ou à des groupes de moyennes, qui ne sont pas significativement différentes les unes des autres.

Le tableau 26 présente les résultats statistiques de la recherche des groupes de lots homogènes par le test de Tukey en fonctions du temps.

Tableau 26 : Groupes de moyennes des lots homogènes pour la variable temps : Résultats du test de Tukey.

Variable	Moyennes par lot et groupes de moyennes	Nombre de groupes de lots homogènes
0h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>1.4</u> <u>1.6</u> <u>1.6</u> <u>1.7</u>	1
1h	\bar{L}_4 \bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_1 <u>2.8</u> <u>2.9</u> <u>2.9</u> <u>3.1</u>	3
2h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>2.6</u> <u>2.8</u> <u>2.8</u> <u>3.2</u>	3
3h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>2.4</u> <u>2.6</u> <u>2.7</u> <u>3.0</u>	3
4h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>2.3</u> <u>2.4</u> <u>2.5</u> <u>2.7</u>	3
5h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>2.1</u> <u>2.1</u> <u>2.1</u> <u>2.3</u>	2
6h	\bar{L}_4 \bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_1 <u>1.8</u> <u>1.9</u> <u>1.9</u> <u>2.3</u>	2

Les résultats du test de Tukey, montrent qu'il existe un seul groupe de lots pour la première heure, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence entre chaque lot. Ceci est expliqué par l'absence des différences significatives entre les moyennes de diamètre des pattes des souris des quatre lots avant l'injection de la carragénine.

Une heure après et jusqu'à la quatrième heure nous remarquons l'existence de trois groupes de lots différents. Où les lots 2 et 4 (c'est-à-dire le lot des souris qui sont traitées par le médicament standard et le lot des souris traitées par l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal. à la dose 400 mg/kg) constituent un groupe homogène. Cette variabilité dans la répartition des lots est due à l'effet puissant de l'extrait testé à la dose 400 mg/kg, qui semble être identique à celui du médicament standard (diclofénac).

Alors qu'au bout de la cinquième heure il n'y a que deux groupes différents où les lots 4, 2 et 3 forment un seul groupe. Ceci est expliqué par l'activité inhibitrice de l'œdème inflammatoire de l'extrait de *C. suffruticosa* Vhal. aux doses 200 et 400 mg/kg semblable à celle du diclofénac (médicament standard) à la dose 50 mg/kg.

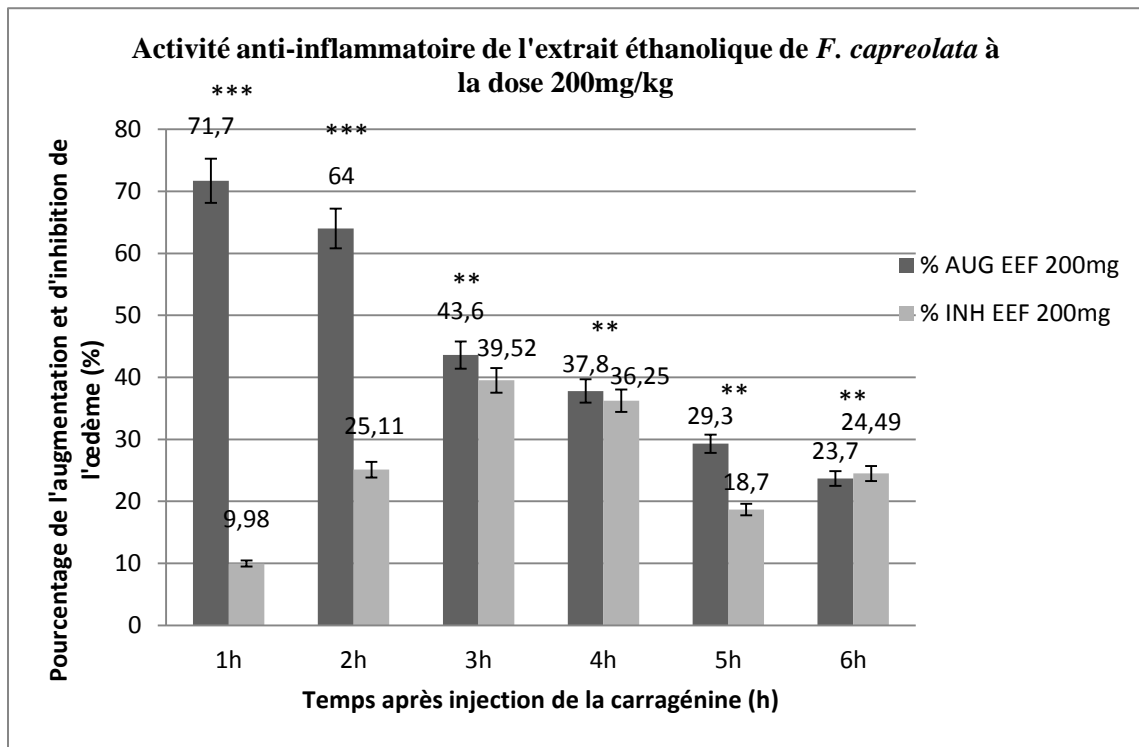
Tableau 27 : Comparaison des différents lots testés avec le lot témoin à l'aide du test de DUNNETT.

Variable	Les groupes de moyennes semblables à celles du lot Témoin. Résultat du test de Dunnett	Nombre de lots identiques au lot témoin
0h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>1.4</u> <u>1.6</u> <u>1.6</u> <u>1.7</u>	3 lots identiques au lot témoin
1h	\bar{L}_4 \bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_1 2.8 2.9 2.9 <u>3.1</u>	aucun lot identique au lot témoin
2h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 2.6 2.8 2.8 <u>3.2</u>	aucun lot identique au lot témoin
3h	\bar{L}_2 \bar{L}_4 \bar{L}_3 \bar{L}_1 2.4 2.6 2.7 <u>3.0</u>	aucun lot identique au lot témoin
4h	\bar{L}_2 \bar{L}_4 \bar{L}_3 \bar{L}_1 2.3 2.4 2.5 <u>2.7</u>	aucun lot identique au lot témoin
5h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 2.1 2.1 2.1 <u>2.3</u>	aucun lot identique au lot témoin
6h	\bar{L}_4 \bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_1 1.8 1.9 1.9 <u>2.3</u>	aucun lot identique au lot témoin

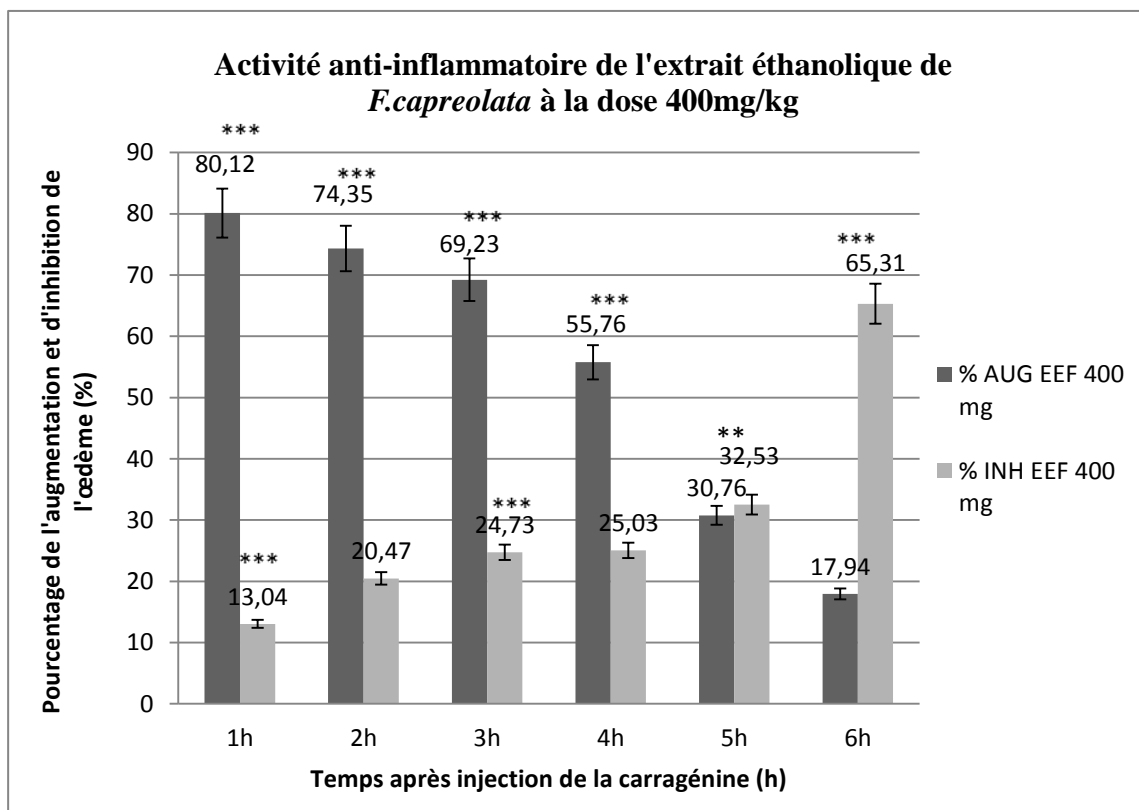
Les résultats du test de Dunnett de la comparaison des moyennes de chacun des lots avec ce de lot témoin, montre que pour l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal. aucun lot n'est identique au lot témoin (Tab.27).

Dans le même contexte, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de l'espèce *Fumaria capreolata* L. a été également évaluée par le même modèle d'inflammation aiguë induite par la carragénine. Les résultats obtenus durant l'expérimentation ont été traités par le test de la variance à un critère (Annexe 04, tableau 03).

Les figures 50 (E) et (F), présentent les pourcentages d'augmentation et d'inhibition obtenus durant l'étude de l'effet de l'extrait éthanolique de la plante *F. capreolata* L. sur l'inflammation aiguë induite par l'injection de la carragénine dans la patte arrière droite de la souris.



(E)



(F)

Figure 50 : Pourcentage d'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot EEF200 pendant 6h (E) ; Pourcentage de l'augmentation (%AUG) et d'inhibition (%INH) du volume de la patte des souris du lot EEF400 pendant 6h (F).

$p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=6)

Les deux figures 50 (E) et (F) montrent que, l'injection de la carragénine dans la patte arrière droite de chaque souris des deux lots a produit un œdème inflammatoire. Cette dernière a diminué de manière très significative en fonction du temps. A la fin de l'expérimentation on obtient un pourcentage d'augmentation très faible de l'ordre de $23.7 \pm 0.76\%$ et $17.94 \pm 1.22\%$. Cette diminution est traduite par l'effet inhibiteur de l'extrait testé.

En comparant les résultats de l'effet de cet extrait avec ceux du lot témoin et référence, on constate que le prétraitement des souris des deux lots EEF200 et EEF400 avec l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. à la dose 200 et 400 mg/kg respectivement a protégé de façon significative les souris des deux lots.

Les résultats présentés dans les figures 49, E et F, montre que l'effet inhibiteur de cet extrait se manifeste dès la première heure qui suit l'injection de la carragénine et augmente progressivement avec le temps jusqu'à la 6^{ème} heure où il atteint son maximum d'activité avec des pourcentages de $24.49 \pm 0.10\%$ et 65.31% pour les deux doses 200 et 400 mg/kg respectivement.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. reste encore inférieure à celle du diclofénac utilisé comme un médicament référence à la dose 50 mg/kg.

Les données de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. ont été également traitées avec le test de Tukey, afin de déterminer les groupes des lots homogènes (Tableau 28).

Tableau 28 : Groupes de moyennes des lots homogènes pour le variable temps : Résultats du test de Tukey. Activité anti-inflammatoire *Fumaria capreolata* L.

Variable	Moyennes par lot et groupes de moyennes	Nombre de groupes de lots homogènes
0h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>1.4</u> <u>1.6</u> <u>1.6</u> <u>1.7</u>	1
1h	\bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_3 \bar{L}_1 <u>2.7</u> <u>2.8</u> <u>2.9</u> <u>3.1</u>	3
2h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>2.6</u> <u>2.7</u> <u>2.7</u> <u>3.2</u>	3
3h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>2.4</u> <u>2.4</u> <u>2.6</u> <u>3.0</u>	3
4h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>2.3</u> <u>2.3</u> <u>2.4</u> <u>2.7</u>	3
5h	\bar{L}_4 \bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_1 <u>2.0</u> <u>2.1</u> <u>2.1</u> <u>2.3</u>	3
6h	\bar{L}_4 \bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_1 <u>1.8</u> <u>1.9</u> <u>2.0</u> <u>2.3</u>	2

A partir du tableau 28, nous notons au début de l'expérience l'existence d'un seul groupe de lots, c'est-à-dire qu'avant l'injection de la carragénine les moyennes de diamètre de la patte des souris des quatre lots ne sont pas significativement différentes les unes des autres.

A partir de la première et jusqu'à la cinquième heure, nous observons toujours l'existence de trois groupes de lots différentes, où le lot témoin forme un seul groupe et le lot des souris traitées par l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. à la dose 400 mg/kg (EEF 400) forme un autre lot. Alors que le lot référence et le deuxième lot des souris traitées avec l'extrait à la dose 200 mg/kg constituait un seul groupe de lots homogènes.

Durant la dernière heure nous remarquons la présence de deux groupes de lots seulement où les deux lots des souris traitées par l'extrait testé et le lot référence, forment un seul groupe et le lot des souris témoin forme un autre groupe.

Cette répartition des lots peut être expliquée par l'effet anti-inflammatoire de chaque solution utilisée dans cette étude, où nous pouvons constater que l'effet de l'extrait testé est semblable à celui du diclofénac, médicament référence.

Tableau 29 : Comparaison des différents lots testés avec le lot témoin (test de DUNNETT) :
 Activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L.

Variable	Les groupes de moyennes semblables à celles du lot témoin. (test de Dunnett)	Nombre de lots identiques au lot témoin
0h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 <u>1.4</u> <u>1.6</u> <u>1.6</u> <u>1.7</u>	3 lots identiques au lot témoin
1h	\bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_2 \bar{L}_1 2.7 2.8 2.9 <u>3.1</u>	aucun lot identique au lot témoin
2h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 2.6 2.7 2.7 <u>3.2</u>	aucun lot identique au lot témoin
3h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 2.4 2.4 2.6 <u>3.0</u>	aucun lot identique au lot témoin
4h	\bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_4 \bar{L}_1 2.4 2.4 2.6 <u>2.7</u>	aucun lot identique au lot témoin
5h	\bar{L}_4 \bar{L}_2 \bar{L}_3 \bar{L}_1 2.0 2.1 2.1 <u>2.3</u>	aucun lot identique au lot témoin
6h	\bar{L}_2 \bar{L}_4 \bar{L}_3 \bar{L}_1 1.8 1.9 2.0 <u>2.3</u>	aucun lot identique au lot témoin

Les résultats du Test de DUNNETT montrent que durant toute la période de l'expérience (6h), aucun lot des trois lots traités par l'extrait et le médicament de référence (diclofénac) n'est identique au lot témoin. Car le diamètre de l'œdème inflammatoire a diminué progressivement chez les souris des trois lots sous l'effet de l'extrait de *C. suffruticosa* Vhal. et du diclofénac, contrairement aux souris du lot témoin ou l'NaCl ne possède aucun effet anti-inflammatoire.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique des deux espèces *C. suffruticosa* Vhal. et *F. capreolata* L. provenant de la péninsule l'Edough (Seraidi-Annaba, Algérie) a été investigué par le modèle de la patte inflammatoire induite par la carragénine. Après l'injection de la carragénine et le traitement des lots par les différents traitements, nous avons observés au cours de 6 heures de l'expérimentation une inflammation aiguë caractérisée par les symptômes suivants : la rougeur, la chaleur, la douleur et le gonflement de la patte des souris (Figure 47, A).

Cette réponse inflammatoire est bi-phasique, durant la première phase (la première heure qui suit l'injection de la carragénine), nous avons noté une augmentation de la patte des souris de tous les lots. Cette augmentation est due à la libération de médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine qui entretiennent l'inflammation (Di Rosa, 1972 in Soro et al., 2015).

Ceci affirme que chez l'animal vivant, la carragénine dans une première phase provoque une inflammation engendrant un œdème inflammatoire.

Ce dernier se traduit cliniquement par une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, dont l'histamine (Rousselet et al., 2005 in Mansour, 2015). Le gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, est responsable de la douleur. (Rousselet et al., 2005 in Mansour, 2015).

Une deuxième phase (2h-6h), est caractérisée par une inhibition de l'évolution du diamètre de l'œdème de manière temps-dépendante, l'effet faible à stable de l'anti-inflammatoire de référence et des extraits étudiés (jusqu'à la 4^{ème} heure), est expliqué par la synthèse des prostaglandines (PGs), essentiellement la prostaglandine E2 (PGE2) (maximum à 2h) impliquée dans les processus de la douleur et de l'inflammation (Posadas et al., 2004 ; Nantel et al., 1999 in Chatter et al., 2011).

Le traitement des souris de lot référence par le diclofénac à la dose de 50 mg/kg, induit une inhibition significative de l'inflammation de 72.22 ± 3.14 % à la 6^{ème} heure (Figure 48 (B)). Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien, dérivé de l'acide anilino-phénylacétique C₁₄H₁₁NO₂ (Cohen et Jacquot, 2001 *in* Amamra, 2009). Il diminue les effets des prostaglandines (produit de l'organisme responsable de la douleur et de l'inflammation.) Il est recommandé dans les pathologies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite chronique et l'arthrose, ainsi que dans le traitement des douleurs aiguës musculo-squelettiques, il est souvent prescrit dans le traitement des maladies rhumatismales et utilisé comme analgésique (Katzung, 1998 ; Lechon *et al.*, 2003 ; Naisbitt *et al.*, 2007 *in* Amamra, 2009).

Les résultats de l'étude de l'activité anti-inflammatoire montrent que l'administration de l'extrait éthanolique de l'espèce *Calendula suffruticosa* Vhal. à la dose de 200 mg/kg par voie orale réduit, de façon significative l'augmentation du volume de la patte des souris. Elle est de 77.77 ± 0.38 %, de 67.9 ± 0.14 % et de 39.05 ± 2.06 % à la 1ère, 3ème et 6ème heure respectivement, après injection de la carragénine. Ces résultats sont significativement différents de ceux du contrôle physiologique (Fig. 48, C).

D'autre part à la dose de 400 mg/kg, l'extrait éthanolique de l'espèce *Calendula suffruticosa* Vhal. s'est révélé plus actif, plus précisément à la sixième heure, où il a induit une inhibition de l'œdème inflammatoire avec un pourcentage de 45.58 ± 1.00 (Fig. 49, D).

Dans une étude similaire réalisée par Preethi *et al* en 2009, l'administration orale de l'extrait éthanolique de *Calendula officinalis* à des doses de 250 et 500 mg / kg de poids corporel, provoque une inhibition significative de 50,6 et 65,9%, respectivement dans l'œdème de la patte du rat induite par la carraghénine ; et une inhibition avec un pourcentage de 42,9 % et 42,4% respectivement, dans l'inflammation induite par le dextrane.

Cependant, l'extrait éthanolique à 80% des fleurs semble faiblement actif (11% d'inhibition) à une concentration de 100 mg / kg de poids corporel administré par voie orale, une heure avant l'induction de l'œdème (Mascolo *et al.*, 1987 *in* Meenatchisundaram *et al.*, 2009). Dans une autre étude, l'administration intra-gastrique d'un extrait aqueux des fleurs de *C. officinalis* (100 mg / kg de poids corporel) a inhibé l'œdème de la patte induit par la carragénine chez les rats (Peyroux *et al.*, 1981 *in* Meenatchisundaram *et al.*, 2009).

De plus, dans un modèle d'inflammation chronique induite par le formol, l'administration de l'extrait éthanolique de *C. officinalis* à 250 et 500 mg / kg de poids corporel a produit une inhibition de 32,9 et 62,3% par rapport aux témoins.

Par usage externe, l'application topique de l'extrait éthanolique à 70% des fleurs de *C. officinalis* à des souris à une dose de 1,2 mg / oreille (correspondant à 4,16 mg médicament brut), réduit l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton (Fokina et al., 1991 in Meenatchisundaram et al., 2009). Egalement l'application externe d'un extrait de dioxyde de carbone de fleurs (300 mg / cm²) supprime l'œdème de l'oreille chez la souris induit également par l'huile de croton (Della et al., 1994 in Singh et al., 2011).

Preethi et ses coll en 2009, ont également étudiés *in vitro* l'effet de l'extrait de *C. officinalis* sur tumor necrosis factor dans une culture de macrophages traités par le lipo- polysaccharide (LPS) ; ils ont notés que la production TNF- α est significativement inhibée par l'extrait. En outre, des niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF- α et IFN- γ et de protéines de phase aiguë, la protéine C réactive (CRP) chez des souris produites par injection de LPS ont été également inhibées de manière significative par l'extrait (Preethi et al., 2009). Les résultats ont montré que la réponse anti-inflammatoire puissante de l'extrait de *C. officinalis* peut être médiée par l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires et Cox-2 et de la synthèse subséquente de la prostaglandine (Preethi et al., 2009).

Certains espèces de la famille des Astéracées sont une source utile d'anti-inflammatoires, tels que les lactones sesqui-terpéniques et les alcools tri-terpéniques. Ces derniers étant connus pour inhiber l'inflammation induite par 1,2-O-tetradecanyl phorbol-1-13 acetate (TPA) chez les souris aussi efficacement que l'indométacine commerciale, par inhibition de la phospholipase A2 (Wiart, 2007).

Akihisa et ses collaborateurs (1996), ont étudiés le contenu des fleurs de six plantes de la famille des Astéracées en alcools tri-terpéniques et leurs effets inhibiteur sur l'inflammation induite par TPA chez la souris. Onze alcools tri-terpéniques ont été isolés et identifiés comme suit: Helaniol, Taraxerol, Dammaradienol, β -Amyrine, Cycloartenol, Tirucalla-7,24-dienol, α -amyrine, Lupeol, 24-méthylecycloartanol, ψ -Taraxasterol et Taraxasterol. Et tous ces derniers ont montré une forte activité inhibitrice de l'inflammation induite par le TPA comparées à l'indométacine et à l'hydrocortisone (Akihisa et al., 1996 in Meenatchisundaram et al., 2009). La fraction tri-terpénique d'un extrait des fleurs de *C. officinalis* avait une activité anti-inflammatoire (1 mg / oreille) contre l'œdème de l'oreille induite par 12-O-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate chez la souris (Akihisa et al., 1996 in Meenatchisundaram et al., 2009).

Lupeol est un tri-terpène penta-cyclique, présent dans l'extrait éthanolique de la plante étudiée avec un pourcentage élevé de 3.76 %.

Plusieurs études ont montré que l'administration orale du lupeol a exercé une activité anti-inflammatoire significative à dose-dépendante dans les modèles d'inflammation aiguë et chronique.

Selon Singh et ses collègues en 1997, Lupeol a réduit l'augmentation du pied (une mesure de l'inflammation) et l'activité du complément dans un modèle expérimental d'arthrite (Singh et al., 1997 in Bone, 2003).

Le lupeol isolé de *Lycopersicon esculentum* (la famille des solanacées), à la dose de 50 mg / kg a réduit 39% l'œdème induit par injection plantaire d'adjuvant complet de Freund (CFA) chez les rongeurs. Il a été démontré aussi qu'à une dose de 2mg, ce lupane a inhibé l'activation de la phospho-inositide 3-Kinase (PI3K) et la phosphorylation subséquente de la protéine kinase B (AKT), l'activation de l'IKK, la phosphorylation et la dégradation de I κ B α dans des cellules de peau de souris CD-1 exposées à des attaques chimiques (Wiart, 2013).

Les phytostérols ont été signalés pour bloquer les enzymes inflammatoires, en modifiant les voies de prostaglandine de manière à protéger les plaquettes (Keservani, 2016).

Les résultats de l'analyse chromatographique de l'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal., récoltés de la région de l'Edough (Seraidi, Nord-Est de la ville d'Annaba, Algérie) montrent sa richesse en phytostérols tels que : Stigmasterol (8.53%), β -sitostérol (3.50%) et Campesterol (0.10%).

Le β -sitostérol isolé de l'espèce *Cyperus rotundus* (Cyperaceae) et des feuilles de *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae), a été étudié pour son effet anti-inflammatoire. Il possédait une puissante activité anti-inflammatoire contre l'œdème de l'inflammation induite par la carragénine et l'implantation de granulés de coton. Cette activité est similaire à celle de l'hydrocortisone et l'oxyphénbutazone lorsqu'ils étaient administrés voie intra-prétoirale (Gupta et al., 1980 ; Hema et al., 1987 in Perez, 2001).

Un grand nombre de composés chimiques de structures variées isolées à partir de plantes médicinales du genre *Calendula*, ont montré qu'elles possèdent une activité anti-inflammatoire. Parmi ces composés on trouve l' α bisabolol. Ce dernier est présent dans l'extrait de notre plante (*C.suffruticosa* Vhal.) avec un pourcentage de 1.70%. Il est largement utilisé en médecine, aromathérapie et en cosmétique pour leur activité anti-inflammatoire et anti-nociceptive. Il a réussi à diminuer l'hyper nociception inflammatoire induite par la carragénine. Certains résultats suggèrent que l'action anti-inflammatoire de l' α bisabolol se

fait par la réduction de la migration des leucocytes, les épanchements protéiques et la quantité de TNF- α au niveau de la cavité péritonéale lors de test à la carragénine (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013).

Egalement la présence de l' α - amyryne dans l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Calendula suffruticosa* Vhal. avec un pourcentage de 2.4 % est en partie responsable de cet effet anti-inflammatoire. Selon Harbone (1988), α - amyryne isolé des graines de *Cordia obliqua* Wild. (Boraginaceae) a montré une importante activité anti-inflammatoire.

Dans notre étude l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L., a été prouvé qu'il possède un effet significatif contre l'inflammation induite par la carragénine dans la patte de souris.

Le traitement oral des souris par cet extrait à la dose 200 et 400 mg/kg, a réduit de façon hautement significative le diamètre de l'œdème avec des pourcentages d'inhibition estimé à 24.49 % et 65.31% pour les deux doses respectivement. Ces pourcentages restent moins inférieurs à ceux noté avec le décolfénac (le médicament de référence) à la dose 50 mg/kg seulement (Fig.50, E et F).

Dans une étude similaire faite par Brihi et ses collaborateurs en 2016, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. récoltée de la ville de Bejaïa a été déterminée par le test d'inhibition de l'œdème causé par le xylène. L'extrait testé dans cette étude a démontré une inhibition significative de l'œdème dans ce modèle de l'inflammation aiguë, avec un pourcentage d'inhibition maximale de 38.71% et 59.09% pour les doses 250 et 500 mg/kg. Ces résultats sont inférieurs aux résultats obtenus dans notre étude sur la même espèce provenant de la péninsule de l'Edough (Seraidi).

Les chercheurs ont attribués l'effet anti-inflammatoire de cet extrait, a sa composition phytochimique riche en alcaloïdes et en polyphénols (Brihi et al., 2016).

Dans une autre étude réalisé sur une espèce du même genre, le traitement des rats avec différentes dilutions de l'extrait éthanolique de *F. indica* a montré une inhibition dose-dépendante du gonflement causé par la carragénine après trois heures avec des pourcentages de 13,6 à 42,2% par rapport au témoin négatif. Ces résultats sont nettement inférieurs aux résultats que nous avons obtenu dans notre étude pour l'espèce *F. capreolata* L., où nous avons noté un pourcentage d'inhibition de 39.52 % et 24.73 % pour les doses 200 et 400mg/kg à la troisième heure.

Sur le même modèle d'inflammation aiguë, l'extrait éthanolique de *F. vaillantii* a montré une inhibition significatif de l'œdème de la patte de rat induit par la carragénine au bout de 3 h.

cette activité inhibitrice est semblable à celle du médicament standard diclofénac à la dose 12,5 mg / kg.

8.2.3. Activité analgésique des extraits éthanoliques de *Fumaria capreolata* L. et

Calendula suffruticosa L. *in vivo* :

La propriété analgésique des extraits éthanoliques des deux plantes étudiés « *Calendula suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L.» a été évalué en utilisant la méthode de Koster et *al.*, 1951, qui explore la douleur périphérique. Nous avons utilisé ce test, en raison de sa simplicité, de sa sensibilité et de sa capacité à discerner des effets analgésiques de très faible intensité.

Le test de torsion est une méthode chimique utilisée pour induire une douleur d'origine périphérique par injection intrapéritonéale de principes irritants comme l'acide acétique chez la souris. L'activité analgésique du composé d'essai est déduite par la diminution de la fréquence des contorsions (Gawade, 2012).

L'injection d'acide acétique dans la cavité péritonéale favorise une augmentation des produits de cyclooxygénase et de la lipoxycgénase dans les fluides péritonéaux ainsi que la libération de nombreux autres médiateurs inflammatoires, y compris la bradykinine et la substance P, mais aussi les molécules pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et IL-8 (Raj, 1996 ; Ikeda et *al.*, 2001 in Bribi et *al.*, 2015). Ces derniers stimulent ensuite les terminaisons nerveuses de la douleur, et en résulte une sensation douloureuse qui se manifeste chez la souris par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, ces mouvements sont appelés crampes abdominales (Chen, 1993 in Nainwal et *al.*, 2011).

Le tableau 04 (Annexe 05), présente par lot et par caractéristique mesurée les résultats de la moyenne (\bar{x}), de l'écart type (s) et des valeurs minimales (X_{\min}) et maximales (X_{\max}) de l'activité analgésique des extraits éthanoliques de *Calendula suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L.

Le test d'analyse de la variance à un critère (ANOVA) a été utilisé pour comparer les moyennes entre les deux doses testés de chaque extrait dans l'activité analgésique. Nous considérons qu'il existe des différences importantes entre les moyens de quatre lots lorsque la valeur de probabilité (p) est inférieure ou égal au risque $\alpha = 0,05$ ($p \leq \alpha = 0,05$); Différences significatives lorsque $p \leq \alpha = 0,01$ et différences très significatives lorsque $p \leq \alpha = 0,001$ (Dagnelie, 2009). Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau 05. (Annexe 06)

L'effet de l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal. et l'acide acétylsalicylique (aspirine) sur l'inhibition des crampes abdominales induites par une injection de l'acide acétique (1%, ip) chez la souris sont présentés dans la figure 51.

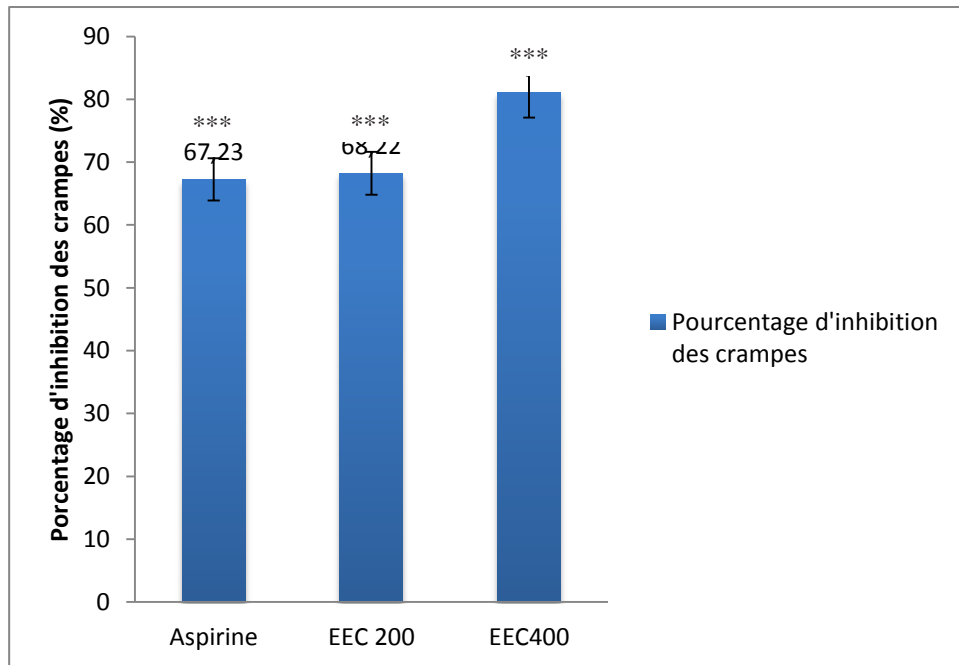


Figure 51 : Effet de l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa* Vhal. et le médicament de référence sur l'inhibition des crampes abdominales induites par une injection de l'acide acétique (1%, ip) chez la souris.

Après l'injection intra-péritonéale de l'acide acétique à 1%, nous notons que les souris de groupe témoin ayant reçu l'eau physiologique présentent une moyenne de 117.5 ± 3.5 des crampes au bout de 30 minutes (figure 50). Ces contractions abdominales sont liées à la sensibilisation des récepteurs nociceptifs aux substances endogènes libérés après l'injection intra-péritonéale de l'acide acétique.

D'autre part nous remarquons que les souris de groupe de référence, possèdent un pourcentage d'inhibition des crampes abdominales plus élevé avec un pourcentage de $67.23 \pm 0.24\%$.

Le test ANOVA, montrent que l'effet analgésique de l'extrait est dose-dépendante. À la dose de 200 mg/kg l'extrait éthanolique de *C.suffruticosa* Vhal. présente un effet analgésique significatif et identique à l'effet de l'acide acétylsalicylique à la dose de 100 mg/kg. Tandis que, l'extrait testé à la dose de 400 mg/kg a donné un résultat plus significatif que l'analgésique de référence administré à la dose de 100mg/kg avec un pourcentage d'inhibition des crampes de $81.13 \pm 1.09 \%$ (Fig. 50).

Tableau 30 : Groupes de moyennes des lots homogènes pour la variable nombre des crampes abdominales : Résultats du test de Tukey

Variable	Moyennes par lot et groupes de moyennes	Nombre de groupes de lots homogènes
Nombre des crampes	\bar{L}_4 \bar{L}_3 \bar{L}_2 \bar{L}_1 <u>22.2</u> <u>37.3</u> <u>38.5</u> <u>117.5</u>	2

D'après le test de Tukey (tableau 30), on constate qu'il n'existe que deux groupes lots différents où les lots 4,3 et 2 forment un seul groupe.

Tableau 31 : Comparaison des différents lots testés avec le lot témoin à l'aide du test de DUNNETT.

Variable	Les groupes de moyennes semblables à celle de lot Témoin. Résultat du test de Dunnett	Nombre de lots identiques au lot témoin
Nombre des crampes	\bar{L}_4 \bar{L}_3 \bar{L}_3 \bar{L}_1 22.2 37.3 38.5 <u>117.5</u>	aucun lot identique au lot témoin

D'après les résultats de test de Dunnett (tableau 31), on constate qu'il n'y a aucun lot parmi les lots testés qui donne des résultats identiques à ceux du lot témoin.

L'espèce apparentée *Calendula officinalis* est largement étudiée pour son activité analgésique par plusieurs chercheurs.

Elzorba et ses collaborateurs en 2016, ont également étudiés l'effet analgésique de l'extrait éthanolique des fleurs de l'espèce *C.officinalis*. Ils ont rapporté que l'extrait étudié possède des effets analgésiques (20% d'inhibition). Ces résultats sont nettement inférieurs aux résultats que nous avons obtenus dans notre étude sur l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *C. suffruticosa* Vhal. Nous avons, en effet obtenu un pourcentage d'inhibition des crampes de $81.13 \pm 1.09\%$.

En 2014, Mohammad Reza a étudié l'activité analgésique de *C. officinalis* par deux méthodes différentes : le test de torsion qui permet d'explorer la douleur périphérique et le test de la plaque chauffante, qui explore la transmission et la perception de la douleur centrale. Il a montré que les animaux traités par différentes dilutions de l'extrait hydro-alcoolique de *C.officinalis* possèdent un effet protecteur significatif contre la douleur induite par les deux méthodes. Cette activité de l'extrait hydroalcoolique a été expliquée par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines et les médiateurs du système sympathomimétique tels que PGE2 et PGF2a qui ont été libérés par l'administration intra péritonéale de l'acide acétique.

Les effets analgésiques de *Calendula officinalis* ont été également évalués dans le seuil de la douleur thermique chez les rats mâles. L'extrait testé de *C. officinalis* a considérablement augmenté la latence de la queue de la queue par rapport au groupe témoin ($P < 0,05$), ce qui indique que l'extrait a réduit le seuil de la douleur (Bruynzeel et al., 1992 in Al-Snafi, 2015).

Dans le même contexte, l'activité analgésique de l'extrait éthanolique de la deuxième plante (*Fumaria capreolata* L.) a été étudiée *in vivo* dans les mêmes conditions expérimentales.

La figure 52, présente les résultats de l'effet analgésique de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. vis-à-vis de la douleur chimique induite par l'acide acétique.

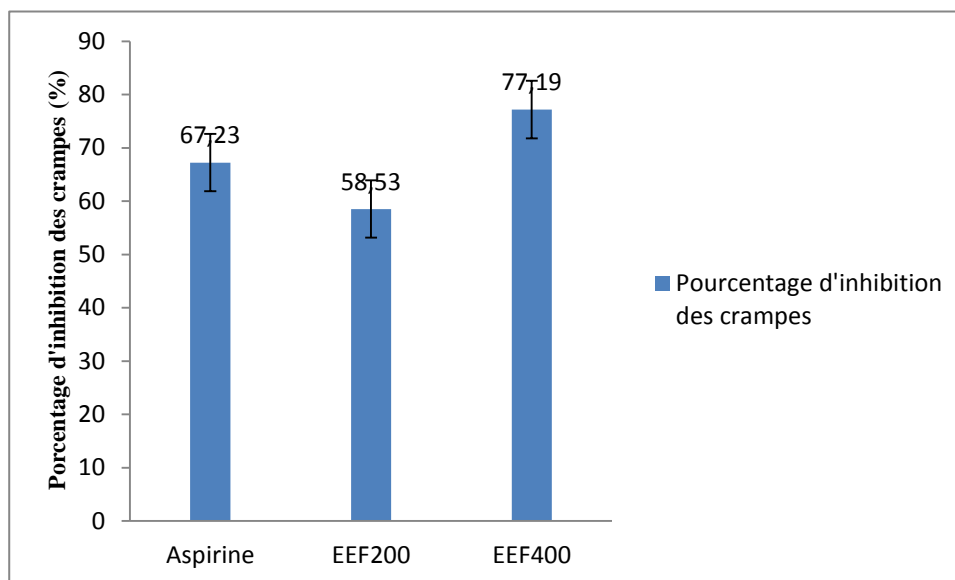


Figure 52 : Effet de l'extrait éthanolique de *F. capreolata* et du médicament de référence sur l'inhibition des crampes abdominales induites par une injection de l'acide acétique (1%, ip) chez la souris.

D'après le test ANOVA, nous constatons qu'il existe des différences hautement significatives entre les souris du lot témoins et les souris des autres lots traités avec les deux doses de l'extrait de la plante *Fumaria capreolata* L. et l'acide acétylsalicylique. L'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. à la dose 200mg/kg détient un effet analgésique important vis-à-vis à la douleur chimique avec un pourcentage de 58.53 ± 2.66 %. Ce pourcentage est inférieur à celui créé par le médicament standard (l'aspirine) qui est de 67.23 ± 0.24 à la dose 100 mg/kg.

L'effet analgésique de cet extrait se manifeste plus fortement à la dose 400 mg/kg, où on a enregistré un taux d'inhibition des crampes abdominales de l'ordre de 77.19 ± 1.68 %.

Cet effet est traduit par la richesse de l'extrait testé en composés à effets analgésiants.

Tableau 32 : Groupes de moyennes des lots homogènes pour la variable nombre des crampes abdominales : Résultats du test de Tukey pour l'activité analgésique de l'extrait éthanolique de *F.capreolata* L.

Variable	Moyennes par lot et groupes de moyennes	Nombre de groupes de lots homogènes
Nombre des crampes	\bar{L}_4 \bar{L}_3 \bar{L}_2 \bar{L}_1 <u>26.8</u> <u>48.7</u> <u>38.5</u> <u>117.5</u>	2

Ce test montre l'existence de deux groupes de lots différents, où le lot de souris traitées par l'eau physiologique, forme un groupe tandis que les trois autres groupes traités par l'aspirine et l'extrait éthanolique de *F.capreolata* L. forment un autre groupe. Ceci est expliqué par l'effet analgésique des traitements administrés.

Tableau 33 : Comparaison des différents lots testés avec le lot témoin (test de DUNNETT).

Variable	Les groupes de moyennes semblables à celle de lot Témoin. Résultat du test de Dunnett	Nombre de lots identiques au lot témoin
Nombre des crampes	\bar{L}_4 \bar{L}_3 \bar{L}_3 \bar{L}_1 26.8 48.7 38.5 <u>117.5</u>	aucun lot identique au lot témoin

Les résultats de test de Dunnett révèlent, qu'aucun lot parmi les lots testés par les deux doses de l'extrait et le l'analgésique de référence ne possède un effet identique aux souris du lot témoin traités par l'eau physiologique.

Nainwal et ses collaborateurs ont mis en évidence les propriétés analgésiques de l'extrait éthanolique des parties aériennes de *F. vaillantii*. L'administration orale de cet extrait aux doses 200 et 400 mg / kg a réduit le nombre de contorsions induits par l'acide acétique chez la souris ($P < 0,05$). Cette activité était comparable à celle de l'acide acétylsalicylique à la dose 200 mg / kg, p.o.) utilisé comme médicament de référence. Cette activité analgésique centrale et périphérique est principalement due aux différents constituants présents dans les différentes fractions de l'extrait éthanolique de l'espèce *F. vaillantii* (Nainwal et al., 2011).

Dans une étude récente, l'extrait des alcaloïdes totaux de la même espèce: *Fumaria capreolata* (Région de Bejaïa, Algérie), a été également étudié pour l'activité anti-analgésique chimiquement induite par l'acide acétique.

L'extrait d'alcaloïdes totaux a entraîné une inhibition significative de la réaction de retordement induite par l'acide acétique par rapport au groupe témoin, l'effet de l'extrait testé étant dépendant de la dose. Il a été rapporté qu'à la dose la plus élevée (500 mg / kg), l'extrait d'alcaloïdes totaux de *F. capreolata* L., possède une efficacité similaire à celle obtenue avec le diclofénac à la dose de 100 mg / kg (Bribi et al., 2015).

Bribi et ses collaborateurs en 2015, ont conclu que l'effet anti-nociceptif de l'extrait des alcaloïdes totaux de *Fumaria capreolata* L., est due à la présence des différents alcaloïdes isoquinoléines. Et certainement le protopine qu'est le plus actif sur le plan médical, car il est connu qu'il présente de nombreuses actions pharmacologiques.

Les résultats de la GC/MS montrent que le protopine est le composé majoritaire de notre extrait avec un pourcentage de 53.03 %. Le protopine est un alcaloïde isoquinoléine, il se trouve généralement dans la plus part des végétaux qui appartiennent à la famille Papavéracées, et spécifiquement dans les espèces du genre *Fumaria*.

Cet alcaloïde est très actif sur le plan médical, car il possède de nombreuses actions pharmacologiques.

Plusieurs chercheurs affirment que le protopine possède des propriétés analgésiques et curatives similaires à celles de la morphine (Guinaudeau et Shamma, 1982, Jusiak et al., 1986, 1987 1989 in Bajaj, 1995). Également, le protopine isolée de *Fumaria vaillantii* a montré une activité relaxante des muscles lisses chez des cobayes, des lapins et des rats albinos (Khare, 2008). Aussi le protopine isolé de *F. officinalis* possède une activité sédatrice à petites doses (Base de données compréhensive sur les médicaments naturels, 2007 in Khare, 2008).

Conclusion et perspectives

Les plantes sont étudiées depuis des millénaires pour leurs qualités thérapeutiques ou alimentaires, elles représentent un réservoir infini de substances naturelles qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et possédant un large éventail d'activités biologiques.

Cette étude a été réalisée sur deux plantes médicinales endémiques à la péninsule de l'Edough à Seraïdi, dans la wilaya d'Annaba : « *Calendula suffruticosa* Vhal. et *Fumaria capreolata* L. ».

La fumeterre ou *Fumaria capreolata* L. est largement utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne en cas de dysfonctionnement hépatobiliaire et pour le traitement des pathologies cutanées (Gilani et al., 2005). Les espèces du genre *Calendula* sont reconnues depuis des siècles pour leurs vertus médicinales, traditionnellement ils sont utilisés dans le traitement de diverses tumeurs de la peau, des lésions dermatologiques, des ulcères, des gonflements et des troubles du système nerveux (Arora et al., 2013).

L'objectif essentiel assigné par ce travail englobe dans un premier temps, l'étude phytochimique et l'identification des composés qui caractérisent l'extrait de la partie aérienne de chaque plante étudiée. Dans un deuxième temps, nous nous sommes proposées d'évaluer l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits des deux plantes en utilisant trois méthodes différentes, nous avons enfin recherché l'effet anti-inflammatoire et analgésique que peuvent détenir ces extraits *in vivo*.

L'étude histologique des feuilles et des tiges des deux plantes étudiées, nous a permis d'identifier les différents tissus et de localiser les structures responsables de la production et du stockage des principes actifs. Nous avons constaté la présence de trichomes glandulaires (poils sécréteurs) dans la feuille et la tige de *Calendula suffruticosa* subsp. *suffruticosa* Vhal. structure spécifiques à la famille des Astéracées.

Les tests phytochimiques réalisés sur l'infusé, le macéré et la poudre de *Fumaria capreolata* L. et *Calendula suffruticosa* Vhal., ont mis en évidence la présence des composés polyphénoliques (flavonoïdes, tanins), d'alcaloïdes, de terpènes et stéroïdes et de saponosides.

A l'issue du screening phytochimique, une extraction solide-liquide de la partie aérienne des deux plantes étudiées a été réalisée en utilisant l'éthanol comme un solvant.

L'analyse quantitative par spectrophotométrie nous a permis de déceler les teneurs en polyphénols totaux en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu, et en flavonoïdes par le

trichlorure d'aluminium. D'après Les résultats obtenus nous constatons que les deux espèces sont riches en ces composés, et que l'espèce *C. suffruticosa* Vhal. possède des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes plus élevées que celles de l'espèce *F. capreolata* L. Cette variation est certainement due à plusieurs paramètres tels que : les conditions opératoires de l'extraction, la variété et le stade végétatif de la plante et surtout les conditions environnementales (type de sol, climat).

Par la suite, nous avons axé notre étude sur l'identification des principes actifs des extraits éthanoliques des deux plantes par CPG/MS, HPLC/MS et RMN.

La composition chimique de l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* Vhal. a été établie pour la première fois en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Soixante-quatre composés ont été identifiés, dont six sont majoritaires : l'acide α linoléique (24.20%), l'acide linoléique (23.58%), Stigmasterol (8.53 %), 2-Metyl-Z-4-tetradecene (6.62 %) et α -Bisabolol (1.70 %).

La composition chimique de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* L. a été également caractérisé par GC/MS, le protopine étant le composé majoritaire avec un pourcentage de 53.03 % suivi de l'acide linoléique avec un pourcentage de 12.58 % et le parfumine avec un pourcentage de 10.08 %.

Le fractionnement de l'extrait éthanolique de l'espèce *F. capreolata* L. récoltée dans la région de l'Edough (Annaba, Algérie) et l'analyse des fractions obtenues par la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a abouti à l'isolement et la purification de quatre composés, dont deux acides gras qui ont été isolés de la phase organique : un acide gras saturé : l'acide palmitique et un acide gras polyinsaturé oméga-6 : l'acide linoléique. Deux alcaloïdes ont été également isolés de cet extrait, l'un est un alcaloïde spiro-isoquinoline : le parfumine et l'autre un alcaloïde isoquinoline : le protopine.

Les potentialités antioxydants des extraits éthanoliques de *C. suffruticosa* Vhal. et *F. capreolata* L. ont été évaluées par divers mécanismes : le piégeage des radicaux libres par la méthode du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur (FRAP) et le pouvoir protecteur du β -carotène contre l'oxydation par les produits de peroxydation lipidique. Les résultats obtenus *in vitro* ont révélé une importante activité anti-oxydante de ces plantes via les méthodes utilisées.

Conclusion générale et perspectives

Un puissant pouvoir anti-radicalaire du DPPH similaire à celui de l'acide ascorbique, BHT et BHA a été exercé par l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *C. suffruticosa* Vhal.

La valeur IC50 la plus faible a été enregistrée pour l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. (0.030 mg/ml).

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés a été représenté par les absorbances suivantes : 1.157 ± 0.0015 et 0.349 ± 0.03 respectivement à la concentration 0.5 mg/ml pour les extraits éthanoliques du souci et de la fumeterre.

En outre, pour le test de la décoloration du β -carotène, l'extrait éthanolique de *F. capreolata* L. a indiqué une forte activité inhibitrice de l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène avec un pourcentage de $88.46 \pm 1,02$ %, à la concentration 0.5mg/ml, suivie par le BHA avec un pourcentage de 82.69 ± 0.03 %. L'extrait éthanolique de *C. suffruticosa* Vhal. s'est également montré doué d'un fort pouvoir d'inhibition de $75 \pm 1,02$ %.

L'étude toxicologique des extraits nous a permis de constater que la DL50 de ces plantes est supérieur à 1000 mg/Kg de P.C.

L'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques des deux plantes a été évaluée *in vivo* par le test de l'œdème inflammatoire induit par la carragénine chez la souris. Le diclofénac a été utilisé comme un médicament de référence. Les extraits administrés par voie orale à la dose 200 et 400 mg /kg, possèdent une activité inhibitrice significative de l'œdème inflammatoire (test d'ANOVA).

Nous avons également testé l'activité analgésique des extraits sur un modèle de la douleur induite par l'acide acétique, où l'acide acétylsalicylique a été utilisé comme un médicament standard. Les résultats obtenues montrent l'effet puissant de l'extrait testé *vis à vis* de la douleur chimique, à la dose de 400 mg/kg, ces extraits possèdent une activité analgésique supérieure à celle de l'acide acétylsalicylique à la dose de 100 mg/kg, avec une différence hautement significative au groupe témoin.

Ces résultats confirment les propriétés pharmacologiques de *Calendula suffruticosa* Vhal. et *F. capreolata* L., qui sont principalement dues à la composition phytochimique des extraits étudiés.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude mériterait d'être poursuivie afin de répondre à des questions essentielles pour leur exploitation industrielle à savoir :

- élargir le panel des activités anti-oxydantes *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : anti-tumoral et anticancéreux.
- Il serait également intéressant, de tester les différentes familles ou molécules isolées, *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles biologiques, afin de découvrir et proposer une application thérapeutique des molécules actives isolées.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

1. **Abdul jalil R.D.H. 2014.** GC-MS analysis of *calendula officinalis* and cytotoxic effects of its flower crude extract on human epidermoid larynx carcinoma (hep-2). World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.V(4), pp. 237-275.
2. **Adler G., Kasprzyk Z. 1975.** Free sterols, steryl esters, glycosides, acetylated glycosides and water-soluble complexes in *Calendula officinalis*. Phytochemistry, pp. 627-631.
3. **Albulescu M., Alexa N. and Cojan C. 2004.** *Calendula officinalis* flowers, source of extracts with antioxidant activity. Annals of West University of Timisoara .Series Chemistry, pp. 169-176.
4. **Al Qasoumi S.I., Al Dosari M.S. 2009.** Evaluation of the hepatoprotective effect of *Fumaria parviflora* and *Momordica balsamina* from Saudi folk medicine against experimentally induced liver injury in rats. Research journal of medicinal plant. V (3), pp.9-15.
5. **Al-Shaibani I.R.M., Phulan M. S. and Shiekh M. 2009.** Anthelmintic Activity of *Fumaria parviflora* (Fumariaceae) against Gastrointestinal Nematodes of Sheep. International journal of agriculture & biology, pp. 431-436.
6. **Al-Snafi A.E. 2015.** The chemical constituents and pharmacological effects of *calendula officinalis* - a review. Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research. V (5), pp. 172-185.
7. **Alvarez M.A. 2014.** Plant Biotechnology for Health: From Secondary Metabolites to Molecular Farming. Springer. p161.
8. **Arora D., Rani A. and Sharma A. 2013.** A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. Pharmacognosy Reviews, 7 (4), pp. 179-187
9. **Azzaz N. A., Hassan E.A. and El emarey F.A. 2007.** Physiological, anatomical, and biochemical studies on pot marigold (*Calendula officinalis* L.) plants. African Crop Science Conference Proceedings Vol (8), pp.1727-1738.

B

10. **Badami R.C. and Morris L. J.1965.** The oxygenated fatty acid of *Calendula* seeds oil. The Journal of the American Oil Chemist's Society , pp. 1119-1121.
11. **Bahorun T., Grinier B., Troitin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., Vasseur J., Gazin M., Gazin C. and Pinkas M. 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic

extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. V (46), pp.1086-1089.

12. **Beffa, M.T.D., 2012.** Fiori di campo. Osservare, conoscere e riconoscere tutte le specie più note di fioriselvatici. De Agostini. p320.
13. **Belabbes R. 2014.** Enquête ethnobotanique, caractérisation chimique et activités biologiques des volatils de deux plantes médicinales de l'ouest Algérien : *Calendula arvensis L* et *Carthamus sp L*. Thèse de Master, Université Abou Bekr belkaïd Tlemcen, Algérie.
14. **Benhammou N., Atik-Bekkara F. and Kadifkova Panovska T. 2007.** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus L* and *Pistacia atlantica Desf.* *Adv Food Sci.* pp. 155-161.
15. **Beniston N. and BENISTON W. 1984.** Fleurs d'Algérie. Entreprise Nationale du Livre. p.359.
16. **Bentley K.W. 2000.** β -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. The Royal Society of Chemistry, pp. 247–268.
17. **Bernatoniene J., Masteikova R., Davalgiene J., Peciura R., Gauryliene R., Bernatoniene R., Majiene D., Lazauskas R., Civinskiene G., Velziene S., Muselik J. and Chalupova Z. 2011.** Topical application of *Calendula officinalis (L.)*: Formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*. V(5), pp. 868-877.
18. **Bissa S., Bohra A. 2001.** Antibacterial potential of pot marigold. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* V(3), pp. 51-54.
19. **Bojnanský V., Bojanský V. and Fargasova A. 2007.** Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora: The Carpathian Mountains Region. Springer Science & Business Media, p.1084.
20. **Bone K. 2003.** A Clinical Guide to Blending Liquid Herbs: Herbal Formulations for the Individual Patient. Churchill Livingstone. p 532.
21. **Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H. and Marzouk B. 2008.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa L.* shoots and roots. *C. R. Biologies*, pp. 48-55.
22. **Boumaza M., 2012.** Edough mystique et fabuleux pay de ouichaoua .edi : phenix color-annaba.p142.

23. **Boussahel S. 2011.** Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif. Thèse de Magister. Université Ferhat Abbas, Sétif. P 102.
24. **Boizot N., Charpentier J.P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des Techniques de l'Inra*.pp.79-82.
25. Bowes B.G., Mauseth J.D. 2012. Structure des plantes. Editions Quae, p. 288.
26. **Burrows G., TYRL R. 2012.**Toxic Plants of North America. JohnWiley&Sons, p.390.
27. **Bribi N., Bouguezza Y. and Maiza B.F. 2013.** Evaluation of erythrocytes toxicity and antioxidant activity of alkaloids of *Fumaria capreolata*. International Journal of Pharma and Bio Sciences. V(2). pp. 770 – 776.
28. **Bribi N., Algieri F., Rodriguez-Nogales A., Garrido-Mesa J., Vezza T., Maiza F., Utrilla M.P., Rodriguez-Cabezas M.E. and Galvez J. 2015.** Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Total Alkaloid Extract from *Fumaria capreolata*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. pp.1-7.
29. **Bribi N., Belmouhoub M. and Maiza F.2016.** Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract of *Fumaria capreolata*. Phytothérapie. pp.1-6.
30. **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants.Intercept Limited. P1119.
31. **Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales (4e ed.). Lavoisier. P1292.
32. Bryon, 2012

C

33. **Ćetković G.S., Đilas S.M., Čanadanović-Brunet J.M. and Tumbas V. 2003.** Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis L.*) extracts. APTEFF. V(34), pp. 93–102.
34. **Chakraborty G.S., 2010.** Phytochemical screening of *Calendula officinalis Linn* leaf extract by TLC. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, V(1), pp .131-134.
35. **Chatter Riahi R., Tarhouni S. and Kharrat R. 2011.** Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranée. Archs. Inst. Pasteur Tunis, pp.1-4.

- 36. Chlebek J., Novák Z., Kassemová D., Šafratová M., Kostelník J., Malý L., Ločárek M., Opletal L., Hošťálková A., Hrabínová M., Kuneš J., Novotná P., Urbanová M., Nováková L., Macáková K., Hulcová D., Solich P., Martín C.P., Jun D. and Cahlíková L. 2016.** Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and Their Biological Activities Related to *Alzheimer's* Disease. *Chemistry champ and Biodiversity banner*, V13 (1), pp. 91-99.
- 37. Clapham A., Tutin T. and Moore D. 1990.** Flora of the British Isles. CUP Archive, p20.
- 38. Collier H.D.J., Dinnin L.C., Johnson C.A. and Schneider C. 1968.** The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother*, pp. 295-310.
- 39. Congo M., 2012.** Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae). Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 42p.
- 40. Couplan F. 2012.** Les plantes et leurs noms: Histoires insolites. Editions Quae, p.223.

D

- 41. Dagnelie P. 2009.** Statistiques descriptives et bases de l'inférence statistique. Bruxelles-université. DE BOECK et LARCIER, p. 511.
- 42. Djahra A.B. 2014.** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de Doctorat. Université Badji- Mokhtar Annaba. pp 54-55.
- 43. Djemai Zoughlache S. 2009.** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. Thèse de Magister. Université -El Hadj Lakhder –Batna. p 60.
- 44. De la rosa L A., Alvarez P.E. and Gonzalez G.A. 2009.** Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability. John Wiley and Sons, p.380.
- 45. Dragsted A., Lang B. 1957.** Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. *Annales pharmaceutiques Française*, p.11.
- 46. Duraffourd Ch., Lapraz J.C. 2002.** Traité de phytothérapie Clinique: endobiogénine et médecine. Elsevier Masson. p 827.

E

- 47. Efstratiou E., Hussain A., Nigam P. and Moore J. 2012.** Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, pp. 173-176.

48. Elzorba H., El Banna H., Derbala D. 2016. Some Pharmacological & Toxicological Activities of *Calendula officinalis* Linn Flower 70% Ethanolic Extract. Animal and Veterinary Sciences. V(4), pp. 26-31.

F

49. Fafal T., Önür M. 2007. Determination of protopine in *Fumaria densiflora* Dc. By Tlc-densitometric and spectrophotometric method. Ankara Ecz. Fak. Derg., V(4), pp.223 – 235.

50. Farahpour M.R. 2014. Antioxidant activity, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of pot marigold hydroalcoholic extract on experimental animals. International Journal of PharmTech Research. V (6), pp. 1640-1646.

51. Fathiazad F., Hamedeyazdan S., Khosropanah M.K. and Khaki A. 2013. Hypoglycemic Activity of *Fumaria parviflora* in streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Advanced Pharmaceutical Bulletin, pp. 207-210.

52. Faustino VM ., Seca AM L., Silveira P ., Silva A M S and Pinto DCG.2017. Gas chromatography–mass spectrometry profile of four *Calendula* L. taxa: A comparative analysis. Industrial Crops and Products, V (104), pp. 91-98.

G

53. Gazim Z.C., Rezende C.M., Fraga S.R., Filho B.P., Nakamura C.V. and Cortez D.A. 2008. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, V (44), pp 391-395.

54. Gawade SH.P. 2012. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. J Pharmacol Pharmacother. V (4), p 348.

55. Ghazi F., Sahraoui S. 2005. Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantbouchet et Hamraia. Mémoire d'Ingénieur. Institute national d'agronomie. Alger, p. 81.

56. Gilani AH., Bashir S., Janbaz KH. and Khan A. 2005. Pharmacological basis for the use of *Fumaria indica* in constipation and diarrhea. J ournal Ethnopharmacol. V(3), pp.585-589.

57. Gupta P., Sharma N. and Rao C.H.V. 2012. A review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Fumaria indica* (Fumitory). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, pp. 665-669.

58. Gupta P. CH., Rao CH.V.2012. Morpho-anatomical and physicochemical studies of *Fumaria indica* (Hauskn.) Pugsley. Asian Pacific Journal Trop Biomed. pp.830-834.

H

59. Habibi Tirtash F., Keshavarzi M. and Fazeli F. 2011. Antioxidant components of *Fumaria* species. World academy of sciences, Engineering and Technology. V (74), pp. 238-241.

60. Hamel T. 2013. Contribution à l'étude de l'endémisme chez les végétaux vasculaires dans la peninsula de l'Edough (Nors-Est algérien). Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba.

61. Hamel T., Sadou S., Seridi R., Boukhdar S. and Boulemtafes A. 2018. Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la péninsule de l'Edough (Nord-est algérien). Ethnopharmacologia, n°59, pp. 75-81.

62. Hani A., Djarbri L., and Mania J.1997. Etude des caractéristiques physico-chimiques du massif cristallophyllien de Séraïdi (nord-est Algérie). Hard Rock Hydrosystemis (Proceedings of Rabat Symposium S2, May 1997). AH IAHS Publ.no. 241, pp. 47-59.

63. Harborne J.B, 1998. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman et Hall Thomson Science (UK), 234p.

64. Heidari M. R., Mandgary A. and Enayati M. 2004. Antinociceptive effects and toxicity of *Fumaria parviflora lam.* in mice and rats. DARU V (12),pp. 136-140.

65. Hubert J. 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse, p174.

66. Hussein M., El-Tawil O., Yassin N. and Abdou KH. 2010. The Protective Effect of *Morus Alba* And *Calendula Officinalis* Plant Extracts on Carbon Tetrachloride- Induced Hepatotoxicity In Isolated Rat Hepatocytes. Journal of American Science V (10), pp. 762-773.

67. Hopkins W G. 2003. Physiologie végétale. De Boeck Supérieur. p 532.

I

68. Ivan G.I., Radka Z.V., Andrey S.M., Nadezhda T.P., Ina Y.A. and Panteley P.D. 2014. Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian *Fumaria* species. Int J Curr Microbiol App Sci, 3(2), pp 296-306.

J

69. Jain P., Pandey R. and Shukla S. SH. 2014. Inflammation: Natural Resources and its Applications. Springer, pp. 25-26.
70. Judd W., Campbell CH., Kellogg E. and Stevens P. 2002. Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. De Boeck Supérieur, pp. 488-489.
71. Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S. and Bauer F. 2006. The ant-oxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. Meat Science, 72. pp. 446-456.

K

72. Kaloustian J ., Hadji-Minaglou F. 2013. La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer Science & Business Media. p 226.
73. Kalvatchev Z., Walder R. and Garzaro D. 1997. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. Biomed & Pharmacother. Elsevier, pp 176-180.
74. Kassim G. K., Fouad R.S. and Faroun A.E. 2013. Antibiofilm, Antibacterial and Antioxidant activities of water extract of *Calendula officinalis* flowers. *International journal of Biological & Pharmaceutical Research* ,pp. 465-470.
75. Kaur J., Sidhu S. and Khan M.U. 2016. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* and *Mimosa pudica*. World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences. V(5), pp. 1388-1397.
76. Kaur C and Kapoor H.C. 2002. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables .*Food Sci.Technol*, V (37) pp.153-161.
77. Khalid K.H.A., Teixeira Da Silva J.A. 2012. Biology of *Calendula officinalis* linn : foccus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. Medicinal and Aromatic Plant Science an Biotechnology. V (6), pp. 12-27.
78. Khan A., Tak H., Nazir R., Alone B.A. and Parray J.A. 2014. *In Vitro* Anthelmintic and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of *Fumaria Indica*. Clinical Microbiology, pp.161-164.
79. Khare C.P. 2008. Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary. Springer Science & Business Media, pp. 274-275.
80. Keshavarzi M., Tirtash F.H., Ebrahimzadeh F. and Sheidaii M. 2011. Comparative anatomy of the *Fumaria* (*Papaveraceae*) species in Iran. PHYTOLOGIA BALCANICA. V (17), pp.79-87.

- 81. Koster R., Anderson M. and Beer E.J.1959.** Acetic acid for analgesic screening. Fed. Proc. 18, pp. 412-417.
- 82. Knight A. 2007.** A Guide to Poisonous House and Garden Plants. CRC Press, pp. 72.
- 83. Kirmizibekmeza H., Bassarello C., Piacente S. and Pizzab C. 2006.** Triterpene saponins from *Calendula arvensis*, pp. 1170 – 1173.
- 84. Kirmizibekmeza H., Bassarellob C., Piacenteb S., Pizzab C., Kumar N., Sharma J. and Sharma S. 2010.** Pharmacognostical and Phytochemical Investigation of *Calendula officinalis*. Journal of Advanced Scientific Research .*J. Adv. Sci. Res*, V(1). pp. 61-66.
- 85. Kumar N., Sharma J. and Sharma, S. 2010.** Pharmacognostical and Phytochemical Investigation of *Calendula Officinalis*. *J. Adv. Sci. Res* V(1), pp .61-66.

L

- 86. Lagnika L. 2005.** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de Doctorat, Université louis pasteur strasbourg. P. 280.
- 87. Laguerre M., López-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M. and Villeneuve P. 2007.** Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité anti-oxydante. Fondamental. V (14), pp. 278-292.
- 88. Leach M. J. 2008.** *Calendula officinalis* and wound healing: a systematic review. Wounds a compendium of clinical research and practice, V (20), pp. 236-243.
- 89. Leigh J.H. 2011.** Plants of Western New South Wales. Csiro Publishing.p.766.
- 90. LEPM. 2002.** LAROUSSE, Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. p 213.
- 91. Luywindu T.F.M. 2013.** Aliments et denrées alimentaires traditionnels du Bandundu en R.D. Congo: répertoire et composition en nutriments. L'Harmattan. p. 322.

M

- 92. Macheix J.J., Fleuriet A. and Allemand C.J.2005.** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques. p192.
- 93. Maiza-Benabdesselam F., Chibane M., Madani K., Max H. and Adach S. 2007.** Determination of isoquinoline alkaloids contents in two Algerian species of *Fumaria* (*Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardi*), *African Journal of Biotechnology*, V (6), pp. 2487-2492.

- 94. Maiza-Benabdesselam F., Khentache S., Bougoffa Kh., Chibane M., Adach S., Chapeleur Y., Max H. and Mattar D.L. 2007.** Antioxidant activities of alkaloid extracts of tow Algerian species of *Fumaria* : *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. *Records of Natural Products*. V (1), pp. 28-35.
- 95. Máriássyová M. 2016.** Antioxidant activity of some herbal extracts in rapeseed and sunflower oils. *Journal of Food and Nutrition Research*. V (45), pp. 104-109.
- 96. Markowicz Bastos D. H., Saldanha L.A., Catharino R.R., Sawaya A.C., Cunha I B., Carvalho P.O. and Eberlin M.N. 2007.** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts, V (12), pp. 423-432.
- 97. Masterova I., Grančaiová Z., Uhrínová S., Suchý V., Bik K. and Nagy M., 1991.** Flavonoids in flowers of *Calendula officinalis* L. *Chem Papers* 45 (1), pp. 105 108.
- 98. Meenatchisundaram S., Parameswari G., Subbraj T., Suganya T. and Michael, A. 2009.** Note on Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* L. *Ethnobotanical Leaflets* 13.pp. 51-54.
- 99. Mohammad R. F. 2014.** Antioxidant activity, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Pot marigold hydroalcoholic extract on experimental animals. *International Journal of PharmTech Research CODEN (USA)*. Vol (6), pp. 1640-1646.
- 100. Moghtader M., 2013.** *In vitro* antifungal effects of *Fumaria vaillantii* Loisel. essential oil on *Aspergillus flavus*, *Journal of Yeast and Fungal Research*, V(4), pp. 21-25.
- 101. Miller L.C., Tainter M. L. 1944.** Estimation of ED 50 and its error by means of logarithmic Probit paper, *Proc.Soc. Exp. Viol. Med*,pp. 261-264.
- 102. Muley B., Khadabadi S. and Banarase N. 2009.** Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): AReview. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*.V (8), pp. 455-465.

N

- 103. Naz I., Saifullah K.M., Ali S. and Khan M. 2013.** Antibacterial activity of secondary metabolites from *Fumaria parviflora* Lam. (Fumariaceae), *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. V (06), pp.29-36,
- 104. Nainwal P., Kalra K., Nanda D. and Singh, A. 2011.** Study Of Analgesic And Anti-Inflammatory Activities Of The Ethanolic Extract Arial Parts Of *Fumaria Vaillantii* Loisel, *Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research*. V (4), pp. 90-91.

105. Ngakegni-Limbili A.C. 2012. Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique, Université de Toulouse. p. 170.

Q

106. Orhan I., Sener B., Choudhary M.I. and Khalid A. 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* . pp. 57–60.

107. Orhan I., Sener B. and Musharraf S. 2010. Antioxidant and hepatoprotective activity appraisal of four selected *Fumaria* species and their total phenol and flavonoid quantities. *Experimental and Toxicologic Pathology*. pp. 1-5.

108. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*.pp. 413-419.

109. Ozsoy N., Can A., Yanardag R. and Akev A. 2008. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chem*. pp. 571-583.

P

110. Pandey G., G. Kumar G.R., Gupta Sh.S., Ojha S.K. and Rao Ch.V. 2014. Wound Repair and Anti-inflammatory Potential of *Fumaria indica* in Excision Wound-induced Rats. *British Journal of Pharmaceutical Research*. V (4), pp. 257-266.

111. Paolini J., Barboni T., Desjobert J.M., Djabou N., Muselli A. and Costa J.2010. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. pp. 865–874.

112. Paris M. et Hurabielle M. 1976. Abrégé de Matière Médicale, Pharmacognosie, Masson. Paris.p. 3875.

113. Pehlivan Karakaş F., Yildirim A. and Türker A. 2012. Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turk J Biol*. V (36), pp. 641-652.

114. Peter K. V. 2004. Handbook of Herbs and Spices, Volume 2. Woodhead Publishing, 360 p.

115. Petrovic L., Lepojevic Z., Sovilj V., Adamovic D. and Tesevic T. 2007. An investigation of CO₂ extraction of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J. Serb. Chem.* . pp. 407–413.

116. Polese J., 2007. Encyclopédie visuelle des plantes sauvages. Editions Artemis. p384.

- 117. Preethi K..C., Kuttan G. and Kuttan R. 2006.** Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers *in vitro* and *in vivo*. *Pharmaceutical Biology*. V(44), pp. 691–697.
- 118. Preethi K. C., Kuttan G. and Kuttan R. 2009.** Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn and its possible mechanism of action. *Indian journal of a experimental biology*. pp. 113-120.
- 119. Preininger V. 1986.** Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. In: Brossi A, ed., *The Alkaloids*, Vol. 29. New York, Academic Press, pp. 1–98.
- 120. Pintea A., Bele C., Andrei S. and Socaciu C. 2003.** HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis*, V(47), pp.37-40.
- 121. Prat R. 2007.** Expérimentation en biologie et physiologie végétales. Editions Quae, p. 296.

Q

- 122. Quezel P. Santa S. 1963.** La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed.Centre national de la recherche. Paris, p 565.

R

- 123. Rahimi R., Nikfar S., Larijani B. and Abdollahi M. 2005.** A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother*, V 59(7), pp. 365-73.
- 124. Rai M.K., Cordell G.A., Martinez J.L., Marinoff M. and Rastrelli L. 2012.** *Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs*. CRC Press. pp. 510-511.
- 125. Rashmi M., Goyal M. 2011.** Antimicrobial and phytochemical estimation of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. *International Journal of Innovations in Bio-Sciences*. V(1), pp. 1-10.
- 126. Rehman S., Abdul L., Shamim A. and Asad U.K. 2010.** Antibacterial activity of Shahtra (*Fumaia officinales* Linn) extracts against MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). *Unani Medicus- An International Journal*. V (1), pp. 57-61.
- 127. Ribereau G. P. 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, p. 254.
- 128. Rice-Evans C.A. Packer L. 2003.** *Flavonoids in Health and Disease*, Second Edition. CRC Press, p.504.

- 129. Rigane G., Ben Younes S., Ghazghazi H. and Ben Salem R. 2013.** Investigation in to the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. International Food Research Journal, V6),pp. 3001-3007.
- 130. Roopashree T.S ., Dang R., Rani S. and Narendra C. 2008.** Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. International Journal of Applied Research in Natural Products. V1(3), pp. 20-28.
- 131. Rose F. 1981.**The Wild flower key: a guide to plant identification in the field, with and without flowers: over 1400 species. Warne. p 480.
- 132. Ruckebusch Y. 1981.** Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animale. Ed. Maloine.Paris, p. 611.

S

- 133. Saadi H. 2013.** Les facteurs du dépérissement des subéraies de l'Edough (Séraïdi). Etude des ravageurs des feuilles et des glands du chêne-liège (*Quercus suber* L.). Thèse de Magister. Université Mohamed Cherif Messaadia, Souk – Ahras. pp 15-16.
- 134. Sausserde R., Kampuss K. 2014.** Composition of carotenoids in *Calendula (calendula officinalis l.)* flowers. foodbalt.
- 135. Sauvion N., Calatayud P A., Thiéry D and Marion- Poll F., 2013.** Interactions insectes- plantes. Editions Quae. p. 784.
- 136. Shaheen S., Mushtaq A., Haroon1 N., Khan F., Hussain A., Zafar, M., Ramzan1 S., Rabail A. and Khalid1 K., 2012.** Systematic and ethnopharmacognostic investigation of selected medicinal plants of family Asteraceae.African Journal of Pharmacy and Pharmacology. V (6), pp. 3184-3194.
- 137. Shakya A., Chatterjee S.S. and Kumar V. 2012.** Holistic psychopharmacology of *Fumaria indica*. Chinese Medicine. V(3), pp.182-199.
- 138. Sharma, O.P. 2009.** Plant taxonomy 2E.Tata McGraw-Hill Education. p564.
- 139. Shaheen S., Ahmad M., Haroon N., Khan F., Hussain R.A., Zafar M., Ramzan S., Ayub R. and Khalid Z. 2014.** Systematic and ethnopharmacognostic investigation of selected medicinal plants of family Asteraceae. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol (6), pp. 3184-3194.
- 140. Sanchez-Moreno C. 2002.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. V(8), pp.121-137.

141. **Seger Ch., Sturm S., Strasser E.M., Ellmerer E. and Stuppner H. 2004.** ^1H and ^{13}C NMR signal assignment of benzyloquinoline alkaloids from *Fumaria officinalis* L. (Papaveraceae). MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY. V (42), pp. 882–886.
142. **Singh M., Sahu P., Nagori K., Dewangan D., Kumar T., Alexander A., Badwaik H. and Tripathi D.K. 2011.** Organoleptic properties *in-vitro* and *in-vivo* pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn: An over review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. pp. 655-663.
143. **Smadi A. 2007.** Etude de l'extrait chloroformique d'Oudneya africana», Memoir de magister en chimie organique. Université El-Hadj Lakhdar Batna Algérie.
144. **Solfo R.R., 1973.** Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxus madagascariensis* Bail et ses variétés. Ed. O.R.S.T.O.M. p 96.
145. **Sousek J., Guedon D., Adam T., Bochorakova H., Taborska E., Valka I. and Šimanek V. 1999.** Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species. *Phytochemical Analysis*. V(10), pp. 6–11.
146. **Soro T.Y., Nene-Bi A. S., Zahoui O.S., Yapi A. and Traore, F. 2015.** Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *Journal of Animal & Plant Sciences*. V(24), pp. 3802-3813.
147. **Spichiger R., Savolainen V. and Figeat M. 2002.** Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. PPUR presses polytechniques. p 413.
148. **Suau R., Cabezudo B., Rico R., Najera F., and Lopez R.J.M. 2002.** Direct Determination of Alkaloid Contents in *Fumaria* Species by GC-MS. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS, V (13), pp.363–367.
149. **Sun R., Jiang H., Zhang W., Yang K., Wang C., Fan L., He Q., Feng J., Du S., Deng Z. and Geng Z. 2014.** Cytotoxicity of Aporphine, Protoberberine, and Protopine Alkaloids from *Dicranostigma leptopodium* (Maxim.) Fedde. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. V(2014), pp.1-6.
150. **Sung Bae D., Kim Y.H., Pan C.H., Nho C.W., Samdan J., Jamyansan Yansan J. and Lee J.K. 2011.** Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *BMB reports*. V (45), pp. 108-113.
151. **Stevens P.E. 2001 (onwards).** Angiosperm Phylogeny Website, version 11, Mai 2013.

152. Srivastava S., Choudhary G.P. 2014. Pharmacognostic and pharmacological study of *Fumaria vaillantii* Loisel: a review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. V: 3 (1), pp. 194-197.

153. Silva E.J.R., Gonçalves E.S., Aguiar F., Evêncio L.B., Lyra M.M.A., Coelho M.C.O.C., Fraga M.C.C.A. and Wanderley A.G. 2009. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. Phytotherapy Research. V (21), pp. 332-336.

T

154. Tardif J. 2003. Une visite au Jardin Roger-Van den Hende: un parcours de l'évolution des végétaux. Éditions MultiMondes.P161.

155. Toubal A., Toubal Q. 1998. Roche mère et végétation du massif de l'Edough : segment de la chaîne alpine de l'Algérie orientale. Ecologia mediterranea. V(29).pp.207-214.

156. Tiwari P., Jain R., Kumar K., Panik R. and Sahu P. 2011. An evaluation of antimicrobial activities of root extract of *calendula officinalis* lin. pharmacologyonline. pp. 886-892.

157. Tutin T., Heywood H. 1976. Flora Europaea: Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae).Cambridge University Press.p 534.

V

158. Vázquez L.H., Javier Palazon J. and Ocaña A.N.2012. The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyrins:A Review of Sources and Biological Activities. Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. V (3), Pp.488-502.

159. Venkateswara R.C., Verma A., Gupta P. and Vijayakumar M. 2007. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Fumaria indica* whole plant extract in experimental animals. *Acta Pharm.* pp .491-498.

160. Vigan M., 2012. Progrès en dermato-allergologie: Besançon 2012.John Libbey Eurotext. P368.

W

161. Wallace Hayes A. 2008. Principle and methods of toxicology. Ed Tayler & Francis, New York, p. 1134.

162. Wasu S.J., Muley B.P. 2009. Antioxidant Activity of *Fumaria officinalis* Linn and Its study on ethanol induced –immuno-supression. Research J. Pharm. and Tech. V(2), pp. 405-408.

- 163. Waston R.R. 2014.** Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. Academic Press. p 360.
- 164. Wiart C. 2007.** Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific. Springer Science & Business Media. pp 11-12.
- 165. Wiart C. 2013.** Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Cancer. Academic Press, p. 268-269.
- 166. Wilen R.W., Barl B. and Slinkard A.E. 2004.** Feasibility of Cultivation *Calendula* as a Dual Purpose Industrial Oil seed and Medicinal Crop. Future for Medicinal and Aromatic Plants. pp. 199-206.
- 167. Wilkomerski B. 1985.** Pentacyclic triterpene triols from *Calendula officinalis* flowers. Phytochemistry. pp. 3066-3067.
- 168. Wichtel M., Anton R. 2003.** Plantes thérapeutiques: traditions, pratiques officinale, science et thérapeutique. Lavoisier. pp. 101-103.
- 169. Winter C.A., Risley E.A. and Nuss G.W. 1962.** Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 111. pp. 544-547.
- 170. Wright C., 2001.** Mediterranean Vegetables: A Cook's ABC of Vegetables and Their Preparation in Spain, France, Italy, Greece, Turkey, the Middle East, and North Africa with More Than 200 Authentic Recipes for the Home Cook. Harvard Common Press. p388.

Y

- 171. Yang J., Guo J. and Yuan J. 2008.** In vitro antioxidant properties of rutin .*LWT*, 41:1060-1066

Z

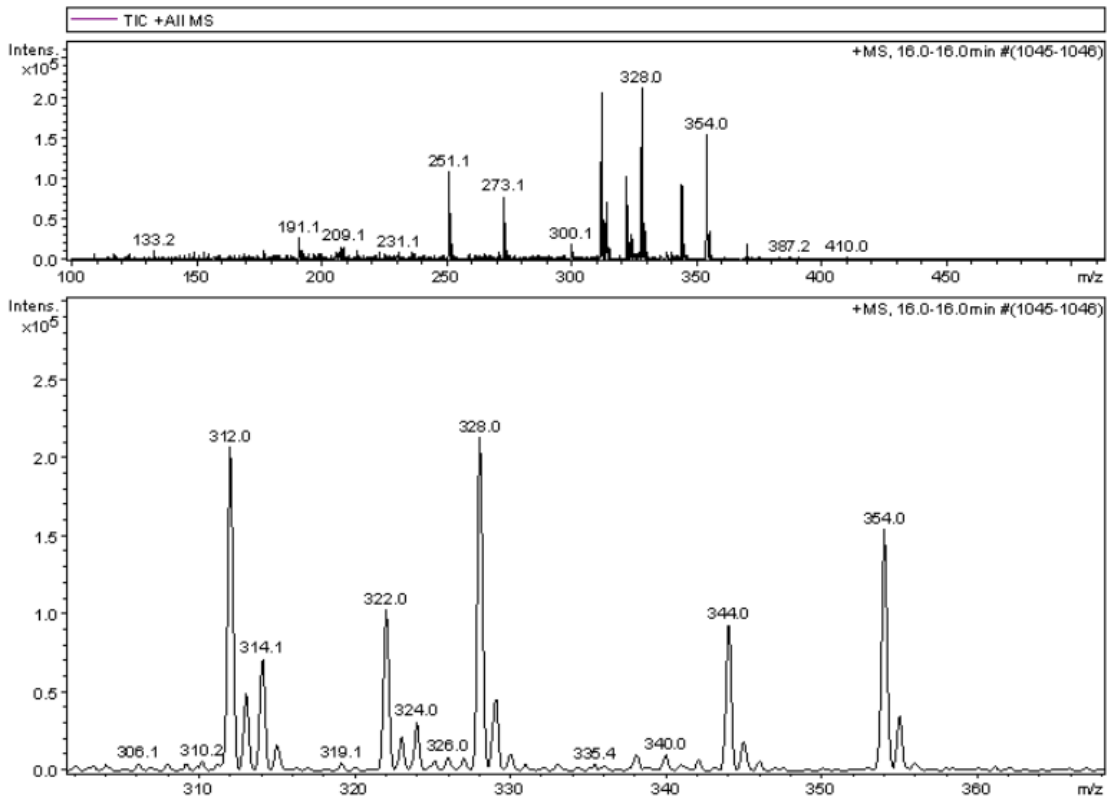
- 172. Zhao T. 2014.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de Plantes Aromatiques et Médicinales oubliées ou sous-utilisées de Midi-Pyrénées (France) et Chongqing (Chine). Thèse Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), Université de Toulouse.
- 173. Zitterl E., Sosa S., Jurenitsch J., Schubert Z., Della L.R., Tubaro A., Bertoldi M. and Franz C. 1997.** Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L). journal of ethnopharmacology, V(57).pp. 139-144.

Webographie:

1. <http://www.chups.jussieu.fr>
2. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Angiosperm Phylogeny Website.

ANNEXES

ANNEXE 01 : les résultats de l'analyse HPLC-MS de la fraction A6 de la phase des alcaloïdes totaux de *F. capreolata* L.

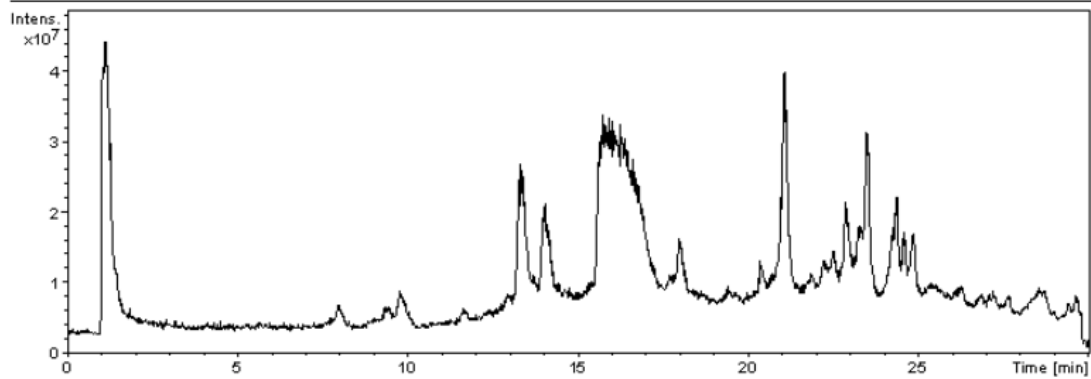


Analysis Info

Analysis Name D:\DATA\CORTES\NOV11-1.d
 Method HPLC-FRAG.m
 Sample Name F32-35
 Comment

Acquisition Date 11/11/2016 9:45:21 AM

Operator Operator
 Instrument esquire3000 plus



Annexe 02 :

Tableau 01 : Statistiques descriptives des données relatives à l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits éthanoliques de *Calendula suffruticosa* Vhal et *Fumaria capreolata* L.

Variables	groupes	n	Moyenne \bar{x}	Ecart type s	Minimum (X_{\min})	Maximum (X_{\max})
Avant l'expérience	Témoin	6	1.728	0.050	1.660	1.790
	Référence	6	1.437	0.676	0.060	1.770
	C200	6	1.628	0.049	1.570	1.640
	C400	6	1.585	0.045	1.530	1.640
	F200	6	1.640	0.131	1.440	1.800
	F400	6	1.568	0.022	1.530	1.590
Après 1h	Témoin	6	3.090	0.034	3.040	3.130
	Référence	6	2.928	0.088	2.830	3.040
	C200	6	2.888	0.030	2.840	2.930
	C400	6	2.821	0.054	2.770	2.910
	F200		2.733	0.197	2.360	2.880
	F400		2.766	0.052	2.700	2.840
Après 2h	Témoin	6	3.191	0.024	3.160	3.230
	Référence	6	2.586	0.091	2.460	2.730
	C200	6	2.801	0.060	2.700	2.860
	C400	6	2.796	0.086	2.690	2.920
	F200	6	2.691	0.043	2.650	2.760
	F400	6	2.708	0.041	2.640	2.760
Après 3h	Témoin	6	2.986	0.019	2.940	2.990
	Référence	6	2.411	0.082	2.260	2.490
	C200	6	2.723	0.042	2.670	2.790
	C400	6	2.631	0.071	2.550	2.750
	F200	6	2.356	0.021	2.330	2.390
	F400	6	2.643	0.035	2.600	2.690
Après 4h	Témoin	6	2.741	0.048	2.660	2.790
	Référence	6	2.335	0.020	2.310	2.360
	C200	6	2.470	0.090	2.430	2.490

	C400	6	2.431	0.021	2.300	2.520
	F200	6	2.261	0.017	2.240	2.290
	F400	6	2.435	0.027	2.400	2.480
Après 5h	Témoin	6	2.346	0.027	2.310	2.380
	Référence	6	2.130	0.055	2.080	2.190
	C200	6	2.130	0.035	2.080	2.180
	C400	6	2.093	0.196	1.700	2.230
	F200	6	2.121	0.025	2.090	2.160
	F400	6	2.048	0.024	2.020	2.090
Après 6h	Témoin	6	2.266	0.015	2.250	2.290
	Référence	6	1.873	0.058	1.810	1.960
	C200	6	1.933	0.156	1.650	2.080
	C400	6	1.850	0.049	1.790	1.920
	F200	6	2.03	0.031	1.990	2.070
	F400	6	1.843	0.015	1.830	1.870

Annexe 03 :

Tableau 02 : Effet de diclofénac et de l'extrait éthanolique de *Calendula suffruticosa* (partie aérienne) en fonction du temps sur l'œdème induit par la carragénine sur la patte de souris.

Traitement	Doses (mg/Kg de p.c)	Pourcentage d'inhibition de l'œdème induite par la carragénine.		
		1h	3h	6h
Témoin (NaCl à 0.9 %)	/	79.65±0.30 ns	72.09 ± 0.61 ns	31.39 ± 0.69 ns
Diclofénac	50	12.41± 0.79***	44.36 ± 4.42***	72.22 ±3.14***
Extrait éthanolique <i>C.suffruticosa</i>	200	02.36± 0.26**	05.81 ± 0.77***	39.05 ± 1.98***
Extrait éthanolique <i>C.suffruticosa</i>	400	01.56± 0.33**	07.82 ± 0.065***	45.58 ± 1.00***

Les valeurs représentent la moyenne (\pm SEM), (n = 6) pour chaque lot, ns= non significatif, Les astérisques *, **, *** indiquent une différence significative respectivement à $p < 0.05$, $P < 0.01$ et $p < 0.001$ par rapport au témoin.

Annexe 04 :

Tableau 03 : Effet de diclofénac et de l'extrait éthanolique de *Fumaria capreolata* (partie aérienne) en fonction du temps sur l'œdème induit par la carragénine sur la patte de souris.

Traitement	Doses (mg/Kg de p.c)	Pourcentage d'inhibition de l'œdème induite par la carragénine.		
		1h	3h	6h
Témoin (NaCl à 0.9 %)	/	79.65±0.30 ns	72.09 ± 0.61 ns	31.39 ± 0.69 ns
Diclofénac	50	12.41± 0.79***	44.36 ± 4.42***	72.22 ±3.14***
Extrait éthanolique <i>F.capreolata</i>	200	09.98± 0.30**	39.52 ± 0.77***	24.49 ± 0.10***
Extrait éthanolique <i>F.capreolata</i>	400	13.04± 0.05**	24.73 ± 0.065***	17.94± 1.22 ***

Les valeurs représentent la moyenne (\pm SEM), (n = 6) pour chaque lot, ns= non significatif, Les astérisques *, **, *** indiquent une différence significative respectivement à $p < 0.05$, $P < 0.01$ et $p < 0.001$ par rapport au témoin.

Annexe 05 :

Tableau 04 : les résultats de la moyenne (\bar{x}), de l'écart type (s) et des valeurs minimales (X_{\min}) et maximales (X_{\max}) de l'activité analgésique des extraits éthanoliques de *Calendula suffruticosa* et *Fumaria capreolata*.

Variables	groupes	n	Moyenne \bar{x}	Ecart type s	Minimum (X_{\min})	Maximum (X_{\max})
<i>Calendula suffruticosa</i>	Témoin	6	117.5	38.5	52.0	154.0
	Référence	6	38.5	20.66	22.00	75.00
	C200	6	37.33	12.68	24.00	58.00
	C400	6	22.17	7.33	15.00	35.00
<i>Fumaria capreolata</i>	Témoin	6	117.5	38.5	52.0	154.0
	Référence	6	38.5	20.66	22.00	75.00
	F200	6	48.72	30.02	26.00	60.00
	F400	6	21.8	15.21	13.00	28.40

Production Scientifique

Production Scientifique

Publication Internationale

1. **Sofiane Ismahene, Seridi Ratiba, Cortes Martinez Diego Miguel and Cabedo Nuria. 2018.** Phytochemical Composition and Evaluation of the Antioxidant Activity of the Ethanolic Extract of *Calendula suffruticosa* subsp. *suffruticosa* Vahl. *Pharmacognosy Journal*, 2018,10,1,64-70. DOI: 10.5530/p.j. 2018.1.13.

Communications Internationales:

1. **SOFIANE Ismahene and SERIDI Ratiba , 2017.** Phytochemical Study and Extraction of Total Flavonoids in Aerial Parts of *Calendula suffruticosa*, North East Algeria. The International Conference on Environmental Science and Development (ICESD), du 3-4 Out 2017, Olso, Norway.
2. **OUCHTATI Sara, SASSOUI Dallal, SOFIANE Ismahene et SERIDI Ratiba 2015.** Screening chimique et extraction des principes actifs de *Citrullus colocynthis* L. de la région de Boussaâda, Sud-Est d'Algérie. Colloque International sur la valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales de la Méditerranée. (CIPAMM 2015), Le 11 et 12 novembre 2015. Blida. Algérie.
3. **SOFIANE Ismahene, OUCHTATI Sara et SERIDI Ratiba, 2015.** Screening phytochimique, Extraction et Etude de la variation des teneurs en alcaloïdes totaux dans les parties aériennes d'une plante médicinale : *Fumaria capreolata* L du Nord-est d'Algérie. Les 3^{èmes} Journées Internationales de Chimie Organique du 6 au 7 décembre 2015 à Annaba, Algérie.
4. **SOFIANE Ismahene, OUCHTATI Sara et SERIDI Ratiba, 2014.** Anatomie et phytochimie d'une plante médicinale, *Fumaria, capreolata* L., du nord est d'Algérie. II ème Congrès international de l'AT- BVBR du 21 au 23 Mars 2014, Tabarka, Tunisie.
5. **SASSOUI D., SERIDI R. and SOFIANE I. 2013.** Ethnobotanical, physiological, histological study and evaluation of the contents of Omega-3 of *Portulaca oleracea* of the area of Djelfa (Algeria). 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) September 1 - 5, 2013 in Munster, Germany.

Phytochemical Composition and Evaluation of the Antioxidant Activity of the Ethanolic Extract of *Calendula suffruticosa subsp. suffruticosa Vahl*

Sofiane Ismahene^{1*}, Seridi Ratiba¹, Cortes Martinez Diego Miguel², Cabedo Nuria²

Sofiane Ismahene^{1*}, Seridi Ratiba¹, Cortes Martinez Diego Miguel², Cabedo Nuria²

¹Laboratory of Plant Biology and Environnement «Médicinal Plants» Axis, Faculty of Sciences University Badji Mokhtar- Annaba. BP 12, 23000 Annaba, ALGERIA.

²Laboratory of Pharmacognosy Av. Vicente Andrés Estelle s / n 46100 Burjassot, Valencia, SPAIN.

Correspondence

Sofiane Ismahene

Cité 11/12/1960 Bt "G", Bloc 4 N 508 Annaba, ALGERIA.

Phone no: 2130698103764

E-mail: sofiane-ismahene@hotmail.fr

History

- Submission Date: 03-08-2017;
- Review completed: 31-08-2017;
- Accepted Date: 02-11-2017

DOI : 10.5530/pj.2018.1.13

Article Available online

<http://www.phcogj.com/v10/i1>

Copyright

© 2018 Phcog.Net. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Aim: *Calendula suffruticosa ssp. suffruticosa Vahl*, Medicinal and Aromatic plant, spontaneous and widespread in the Mediterranean region and in the Northeast of Algeria, is widely used by the local population for its medicinal properties. **Methods:** The chemical composition of the ethanolic extract of *Calendula suffruticosa* was established for the first time using GC / MS. The antioxidant activity of the ethanolic extract was evaluated *in vitro* by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) test, the FRAP assay and β -carotene bleaching assay. **Results:** sixty-four compounds are identified by GC/MS analysis, six are predominant: α -linoleic acid (24.20%), linoleic acid (23.58%), Stigmasterol (8.53%), 2-Metyl-Z-4-tetradecene (6.62%) And α -Bisabolol (1.70%). The free radical scavenging by DPPH method indicated that the ethanolic extract of *C. suffruticosa* showed a very high antioxidant activity with an $IC_{50} = 0.017 \pm 1.00$ mg / ml. This extract also showed an ability to reduce very high iron with a maximum optical density of 1.157 at a concentration of 0.5 mg / ml and an antioxidant activity compared to the β -carotene / linoleic acid test of order of $75 \pm 1.02\%$. **Conclusion:** These results show for the first time the richness of phytochemicals and the strong antioxidant activity of the species *Calendula suffruticosa* endemic to north-east of Algeria.

Key words: *Calendula suffruticosa*, GC / MS, Phytochemical composition, Antioxidant activity, DPPH, FRAP.

INTRODUCTION

Calendula is a genus of about 12 to 20 species originating from Macaronesia and the Mediterranean.¹ They are popular medicinal herbs well known throughout the world because of their vast areas of biological activities such as antimicrobial, anti-oxidant, anti-mutagenic, hepatoprotective, healing and anti-inflammatory.

The species *Calendula suffruticosa Vahl*, is a perennial and viscous herbaceous plant, belonging to the family Asteraceae and reaching about 40 cm in height; the stem is upright.² It is usually wooded at some distance above the base, simple or little branched.³ The leaves are of a pale green color and lanceolate, slightly wavy and toothed. The flowers are united in capitules exceeding 2 cm in diameter and of yellow or orange color, the peripheral flowers are tied and united in two rows, while those in the center are tubular and toothed; the fruit is an achene often curved and equipped with peaks.²

The genus name of the "*Calendula*" dates back to the Middle Ages, it comes from the Latin "*Calendar*": The calends being in the Roman calendar on the first day of the month, probably with a sense analogous to calendar, metrological indicator because of its long period of flowering because the heads open and close with the

appearance of the sun.⁴ While *suffruticosa*, derived from the Latin "frutex" means bush which brings this woody species closer to the sub-shrubs.²

Numerous phytochemical investigations carried out on *Calendula* species such as *C. officinalis* and *C. arvensis* show that they constitute an enormous reservoir of potentially active natural molecules, the majority of which are essential oils,^{1,2,3,4,5} Flavonoids,^{6,7,8,9} the saponosides,¹⁰ Carotenoids,^{11,12,13} Organic acids, saccharides, sterols and lipids.⁹

While the species *Calendula suffruticosa subsp. suffruticosa Vahl*. has not been the subject of any phytochemical or pharmacological studies to our knowledge.

Due to the economic value of species of the genus *Calendula* as medicinal plants and their uses in cosmetics, pharmaceutical preparations and food industry, and the limited number of phytochemical and pharmacological studies of these species in Algeria.

In this study, we are interested in studying for the first time the chemical composition of the ethanolic extract of the endemic *Calendula suffruticosa subsp. suffruticosa Vahl* species in northeastern Algeria, and

Cite this article: Sofiane I, Seridi R, Cortes DM, Cabedo N. Phytochemical Composition and Evaluation of the Antioxidant Activity of the Ethanolic Extract of *Calendula suffruticosa subsp. suffruticosa Vahl*. Pharmacogn J. 2018;10(1):64-70.

the evaluation of the antioxidant activity of this species by three different methods. It should be noted that to date, no studies on the chemical composition and biological activity of *Calendula suffruticosa* subsp. *suffruticosa* Vahl. has been made.

SUBJECTS AND METHODS

Chemical reagents

Ethanol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxycarboxylic acid (BHT), butylated hydroxy anisole (BHA), Linoleic acid, aluminum chloride ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and quercetin are from Sigma-Aldrich (USA). Ascorbic acid and gallic acid are from BIOCHEM Chemo pharma (Monteral, Quebec).

Iron (III) chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and Potassium permanganate (KMnO_4) are from PROLABO Chemical.

Plant material

The samples of *Calendula suffruticosa* were collected in full bloom and fruiting in March 2015 in the Edough region "Cap de Fer" (20 km north-east of the town of Annaba, Algeria).

The botanical identification of the species was made according to Quezel and Santa, (1962-1963)¹⁴ and validated by Doctor HAMEL. T, Teacher-Researcher in Plant Physiology, Department of Biology, Annaba University, Algeria.

Preparation of the ethanolic extract of *Calendula suffruticosa* Vahl

The extraction was carried out according to the method of Rigane *et al.* (2013)⁸ to which we added some modifications.

Different organs of *C. suffruticosa*, previously cleaned and ground, are macerated in 90% ethanol with agitation for 24h at room temperature. The ethanol extract is recovered after filtration of the mixture using a filter paper, the ethanol is removed from the filtrate by evaporation under reduced pressure in a rotary evaporator.

The extract obtained is characterized by a dark green color (blackish green), which is the crude extract. It is then stored in an amber flask at 4°C. until the analysis time.

GC / MS analysis

The constituents of the ethanol extract were identified by GC / MS at the Mass Spectrometry laboratory of the Institute of Chemical Technology (ITQ) of Valencia (Spain).

The analysis was performed by a gas chromatograph of the type Chimadzu coupled to mass spectrometer. The capillary column was of type QP 2010 S of 25 m length and the diameter of 0.25 mm. The flow rate of the carrier gas (helium) was 1 ml / min. 3 µl of the extract was injected using the split less mode. The column temperature was maintained at 90°C for 10 min and then increased to 20°C per min up to 220°C and finally 4°C per min up to 300°C for 20 min. The ionization mode was by electron impact and the scanning range was between 40 and 620 (m / z). The Mass spectra were obtained at 0-2-min intervals.

Identification of the compounds of the ethanol extract was carried out using the data base of the National Institute of Standards and Technology (NIST) and the Wiley spectra data base.

Antioxidant activity

The antioxidant activity *in vitro* of the ethanolic extract of *C. suffruticosa* was carried out according to three methods: scavenging of the free radical DPPH, the beta-carotene bleaching test and the reduction of iron.

Free radical scavenging DPPH

The free radical scavenging activity was measured using the stable free radical DPPH which is one of the main tests used to explore the use

of herbal extracts as antioxidants, the experimental protocol followed is according to Benhammou *et al.* (2007).¹⁵

Briefly, DPPH is solubilized in methanol to have a solution of 0.3 mM. 1 ml of methanol and 1 ml of the extract (at different concentrations 1 mg / ml in methanol) are introduced into tubes and 2 ml of the methanol solution are added to the DPPH.

After stirring by a vortex, the tubes are placed in the dark at room temperature for 30 min. The reading is performed by measuring the absorbance at 517 nm.

The negative control is composed of 1 ml of the DPPH methanol solution and 2.5 ml of methanol. BHT, BHA and ascorbic acid were used as synthetic antioxidants of reference.

The capacity of the antioxidant to scavenge the free radical is estimated as a percentage of discoloration of the DPPH in solution in methanol.

The percentage of antioxidant activity was determined according to the following equation:

$$\% \text{ Antioxidant activity} = (\text{Abs control} - \text{Abs sample} / \text{Abs control}) \times 100$$

The results are the average of two separate measurements \pm standard deviation

- Calculation of IC_{50}

IC_{50} or 50% inhibitory concentration is the concentration of the test sample needed to reduce 50% of the DPPH free radical.

Ferric reducing antioxidant power: FRAP assay

The reduction activity is determined according to the method of OYAIZU (1986),¹⁶ based on the chemical reduction reaction of the iron (III) present in the complex $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in Iron (II). The absorbance is determined at 700 nm.

The ethanolic extract diluted (1 ml) at different concentrations was mixed with 2.5 ml of the phosphate buffer solution (0.2M, pH 6.6) and 2.5 ml of potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) at 1 %. All incubated at 50° C for 20 min. Then, 2.5ml of trichloroacetic acid (TCA) at 10% was added to the mixture to stop the reaction, Then the tubes are centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Distilled water (2.5 ml) and ferric chloride (FeCl_3) (500 µl to 0.1%) were added to 2.5 ml of the supernatant. The absorbance was measured at 700 nm against a blank using a spectrophotometer.

Ascorbic acid was used as positive control at the same selected concentrations and in the same operating conditions as the samples.

B-carotene bleaching method

The experimental protocol followed is that of Ozsoy *et al.* (2008).¹⁷ To prepare the β -carotene emulsion, 2 mg of that are dissolved in 10 ml of chloroform, then 1 ml of This Solution Is mixed with 20 mg of purified linoleic acid and 200 mg of Tween 40. Then, the chloroform is evaporated under reduced pressure by a rotary evaporator at 40°C. and the residue obtained is taken up in 50 ml of oxygenated ultra-pure water.

Tubes containing 5 ml of this emulsion are prepared, for which 200 µl of extract and antioxidant (BHA) at different concentrations are added.

The mixture is well stirred and the absorbance is measured at 470 nm immediately at t_0 against a blank that contains the emulsion without the β -carotene. The covered tubes are incubated at 50°C and the absorbance is reading after 120 min.

A negative control is realized in parallel, comprising 5 ml of the emulsion of β -carotene and 200.µm. l of ethanol.

The results obtained are expressed in terms of percentage inhibition of the decoloration of β -carotene using the following formula: % **Inhibition** = $[1 - (A_0 - A_t / A_0^0 - A_t^0)] \times 100$

A_0 : Absorbance of the sample at t_0 .

A_t : Absorbance of the sample after 120 min of incubation.

A_0^0 : Absorbance of the negative control at t0.

A_1^0 : Absorbance of the negative control after 120 min of incubation.

RESULTS

GC / MS analysis

The phytochemicals compounds of the ethanolic extract of the species *Calendula suffruticosa*, harvested in the Edough region of Annaba Province (Algeria) were identified by GC / MS for the first time Figure 1.

From the data collected from the chromatographs and spectra of mass spectrometry and after treatment of the results, we could identify 64 chemical compounds in the ethanolic extract of the aerial part of the species *Calendula suffruticosa*.

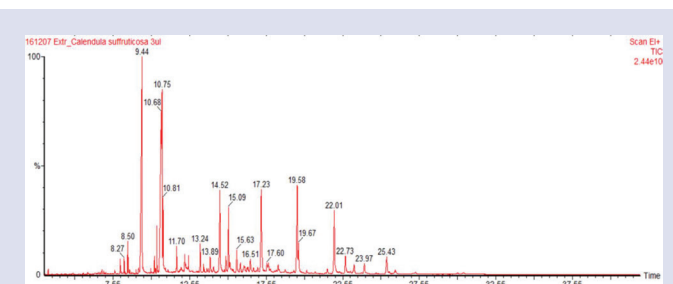


Figure 1: Chromatographic profile of the ethanolic extract of the aerial part of *Calendula suffruticosa*.

Table 1: Chemical compounds of the ethanolic extract of the aerial part of *C. suffruticosa* by GC-MS.

No	Retention time	Name of Compound	The molecular formula	The molecular weight	Percentage (%)
1	6.810	Undecanoic acid	$C_{11}H_{22}O_2$	186	-
2	6.830	2(4H) -Benzofuranone, 5, 6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl	$C_{11}H_{16}O_2$	180	-
3	7.645	α -Bisabolol	$C_{15}H_{26}O$	222	1.70%
4	7.665	3-Buten-2-one,4-(4-hydroxy-2,2,6-trimethyl-7-axabicycol (4,1,0) hept-1-yl-	$C_{13}H_{20}O_3$	224	-
5	8.015	Myristic acid	$C_{14}H_{28}O_2$	228	-
6	8.070	1-cyclohexane,2-methyl-2-oxobutyl	$C_{12}H_{20}O_2$	196	-
7	8.185	7-Hexadecene, (Z)-	$C_{16}H_{32}$	224	-
8	8.270	Acetic acid,2-(2,2,6-trimethyl-7-axa-bicyclo (4,1,10) hept-1-yl propenylester	$C_{14}H_{22}O_3$	238	0.2 %
9	8.335	Bicycle (3,2,1) octan-3-one, 6-(2-hydroxyethyl, endo-	$C_{10}H_{16}O_2$	168	0.17%
10	8.496	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	$C_{20}H_{40}O$	296	0.22 %
11	8.546	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl	$C_{18}H_{36}O$	268	-
12	8.631	Pentadecanoic acid	$C_{15}H_{30}O_2$	242	-
13	8.766	Phtalic acid, butyl undecylester	$C_{23}H_{36}O_4$	376	-
14	8.776	3-Octadecyne	$C_{18}H_{34}$	250	-
15	9.051	Palmitic acid, methyl ester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	-
16	9.221	Cis, cis, cis-7, 10,13-Hexadecatrienal	$C_{16}H_{26}O$	234	-
17	9.436	Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256	1.15%
18	10.011	Margaric acid	$C_{17}H_{34}O_2$	270	0.16%
19	10.241	Nonadecane	$C_{19}H_{40}$	268	-
20	10.271	Linolelaidic acid, methyl ester	$C_{19}H_{34}O_2$	294	-
21	10.316	Linolenic Acid, methyl ester	$C_{19}H_{32}O_2$	292	-
22	10.406	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	296	1.20%
23	10.656	Linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	280	23.58 %
24	10.746	α -linolenic acid	$C_{18}H_{30}O_2$	278	24.20 %
25	10.811	Stearic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	284	4.93 %
26	11.702	Tricosane	$C_{23}H_{48}$	324	0.27%
27	12.232	Arachic acid	$C_{20}H_{40}O_2$	312	0.15%
28	12.272	7-metyl-Z-tetradecen-1-olacetate	$C_{17}H_{32}O_2$	268	0.18%
29	12.437	Ocatdecane,6-methyl-	$C_{19}H_{40}$	268	1.13%
30	12.477	Adipic Acid, bis(2-ethylhexyl) ester	$C_{22}H_{42}O_4$	370	1.46%
31	13.242	Octacosane	$C_{28}H_{58}$	394	0.22%
32	13.512	Docosanoic acid, methyl ester	$C_{23}H_{46}O_2$	354	-
33	13.673	6 β Bicyclo [4,3,0] nonane,5 β -iodomethyl-1 β -isopropenyl-4 α -dimethyl-	$C_{15}H_{25}$	332	-

Continued...

Table 1: Cont'd.

No	Retention time	Name of Compound	The molecular formula	The molecular weight	Percentage (%)
34	13.763	Diisooctyl phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390	-
35	13.893	Docosanoic acid	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340	1.30%
36	14.113	Tetradecane2,6,10-trimethyl-	C ₁₇ H ₃₆	240	-
37	14.523	B-D-Mannofuranoside,farnesyl-	C ₂₁ H ₃₆ O ₆	384	-
38	14.923	A-Himachalene	C ₁₅ H ₂₄	204	-
39	15.173	Humulane-1,6-dien-3-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.11 %
40	15.873	Lignoceric acid	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368	-
41	16.149	Globulol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.24 %
42	16.364	Thujopsene	C ₁₅ H ₂₄	204	0.13 %
43	16.514	5-(7a-isopropenyl-4,5-dimethyl-octahydroinden-4-yl) -3-methyl-penta-2,4-dien-1-ol	C ₂₀ H ₃₂ O	288	1.61%
44	16.999	Ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.17 %
45	17.224	Nonacosane	C ₂₉ H ₆₀	408	4.89 %
46	17.704	4,8,13-Cyclotetradecatriene-1,3-diol,1,5,9-trimethyl-12-(1-methylethyl) -	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306	1.59 %
47	18.334	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	380	-
48	19.670	2-Metyl-Z-4-tetradecene	C ₁₅ H ₃₀	210	6.62 %
49	20.210	Vitamine E (α-tocopherol)	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	0.25 %
50	21.426	1,2-Pentanediol,5-(6-bromodecahydro-2-hydroxy-2,5,5a,8a-tetramethyl-1-naphtanyl	C ₂₀ H ₃₅ BrO ₃	402	-
51	21.551	Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	400	0.10 %
52	22.006	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	8.53 %
53	22.341	2-Hydroxy-1,1,10-trimethyl-6,9-epidioxydecalin	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	226	-
54	22.731	β-sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	3.50 %
55	22.941	Ergosta-7,22-dien-3β-ol,acetate	C ₃₀ H ₈₄ O ₂	-	-
56	23.066	Oxalic acid,allyl pentadecyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	340	-
57	23.296	Urs-12-en-24-oic acid,3-oxo-, methyl ester	C ₃₁ H ₄₈ O ₃	468	-
58	23.781	Kauran-18-al, 17-(acetyloxy) -, (4β) -	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	346	-
59	23.967	α -Amyrin	C ₃₀ H ₅₀ O	426	2.49 %
60	24.112	Androstan-3-one, 17-hydroxy-2,4-dimethyl-, (2α,4α,5α,17β) -	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	318	-
61	24.727	Methanol, [6,8,9-trimethyl-4-(propenyl) -3-oxabicyclo[3,3,1] non-6-en-1-yl]	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236	-
62	25.432	Lupeol	C ₃₀ H ₅₀ O	426	3.76 %
63	25.997	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	-
64	27.293	Pregn-16-en-20-one,3-hydroxy-, (3β,5β) -	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316	-

The compounds identified with their retention time (RT), molecular formula (MF), molecular weight (MW) and peak area as a percentage are presented in Table 1.

This extract consists mainly of α linoleic acid (24.20%), linoleic acid (23.58%) Stigma sterol (8.53%), 2-metyl-4-Z-tetradecene (6.62%) and α-Bisabolol (1.70 %).

Antioxidant activity

Free radical DPPH scavenging

The antioxidant activity of the ethanol extract of *Calendula suffruticosa* and the standard antioxidants (ascorbic acid, BHA and BHT) against the DPPH radical was evaluated using a spectrophotometer.

The Figure 2 presents the inhibition percentages obtained from the ethanolic extract of *C. suffruticosa* compared with that of the positive controls used (BHA, BHT and ascorbic acid) as a function of the different concentrations used for scavenging of the free radical DPPH.

The values obtained have enabled us to trace curves having an exponential shape with the presence of a stationary phase which means the almost total reduction of DPPH in its non-radical form. This is reflected by the strong antioxidant activity of the standards which recorded high inhibition percentages of $97.72 \pm 0.13\%$ for ascorbic acid, $96.92 \pm 0.04\%$ for BHT, and $96.74 \pm 0.05\%$ for BHA. The ethanolic extract of the aerial part of *C. suffruticosa* has also showed a strong antioxidant activity with a percentage reduction of DPPH of $92.07 \pm 0.05\%$ Figure 2.

By comparing the IC₅₀s of the standards with those of the extract tested, we note that the three positive controls used possess a powerful antioxidant activity which is superior to that of the extract studied.

BHA is the most active with a IC₅₀ = 0.0058 ± 1.45 mg / ml, followed by ascorbic acid and BHT (0.0071 ± 0.27 mg / ml and 0.0078 ± 6.52 mg / M1), respectively. The ethanolic extract of *C. suffruticosa* also showed a very high antioxidant activity with an IC₅₀ = 0.017 ± 1.00 mg / ml.

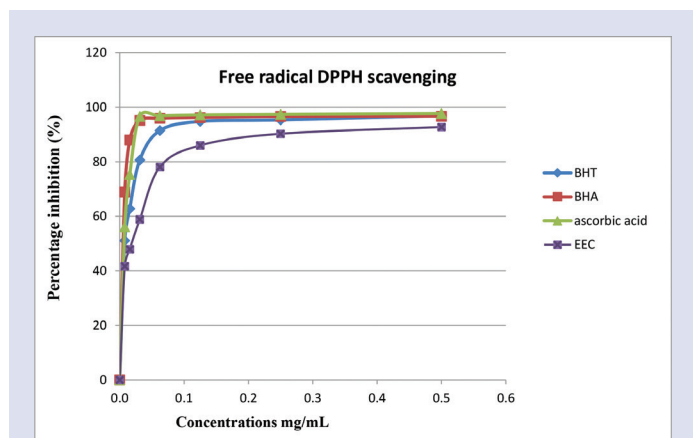
Antioxidant activity:**Free radical DPPH scavenging:**

Figure 2: Anti-radical activity of the ethanol extract of *Calendula suffruticosa*. (Each value represents the mean of three trials \pm SD).

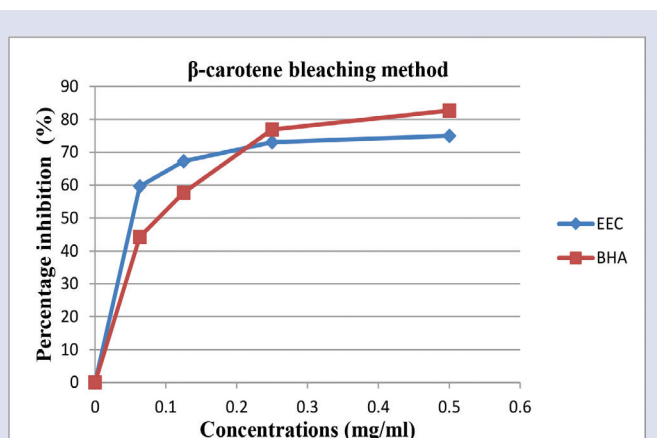
Antioxidant activity: **β -carotene bleaching assay:**

Figure 4: Antioxidant power of the ethanol extract of *C. suffruticosa* tested by the method of bleaching of β -carotene.

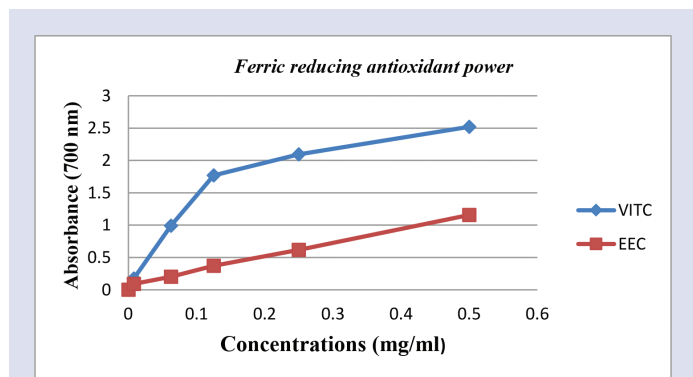
Antioxidant activity:**FRAP assay:**

Figure 3: Reductive power of the ethanolic extracts of the studied plant and of the ascorbic acid tested by the FRAP assay.

FRAP assay

This method was described for the first time in 1996 by Benize and Strain. The FRAP method is a simple, inexpensive and robust spectrophotometric technique. It is based on the capacity of polyphenols to reduce ferric iron Fe^{3+} into ferrous iron Fe^{2+} .¹⁸

The results of the reducing power of the ethanolic extract of *C. suffruticosa* and of ascorbic acid are represented in Figure 3.

The results obtained in FIG. (03) show that the capacity to reduce the iron of the ethanolic extract of the aerial part of *C. suffruticosa* is very high with a maximum optical density of 1.157 at a concentration of 0.5 mg / ml. But it is clearly lower to that of ascorbic acid which represent a DO of 1.77 mg / ml at the concentration 0.1 mg / ml only.

B-carotene bleaching assay

Figure 4 presents the antioxidant power tested by the method of bleaching of β -carotene of the ethanol extract of *C. suffruticosa*.

According to our results, we clearly note that BHA exerts a strong antioxidant effect, with inhibition percentages up to $82.69 \pm 0.03\%$.

The extract tested also shows a strong inhibiting power of the coupled oxidation of linoleic acid and β -carotene with a percentage of $75 \pm 1.02\%$ at the concentration 0.5 mg / ml.

DISCUSSION

The ethanolic extract of the species *Calendula suffruticosa*, was identified by GC / MS for the first time. This extract consists mainly of a linoleic acid (24.20%), linoleic acid (23.58%) Stigma sterol (8.53%), 2-metyl-4-Z-tetradecene (6.62%) and α -Bisabolol (1.70 %).

We have not found in the literature information on the chemical composition of the ethanolic extract of the species *Calendula suffruticosa*. While the species *Calendula officinalis* has been the subject of numerous phytochemical investigations.

The results we have obtained of the phytochemical analysis agree with other scientific work reported on the species *Calendula officinalis*.

Various terpenoids were detected in the petroleum ether extract of *C. officinalis* flowers. They include sitosterol's, Stigma sterols¹⁹ Lupeol.²⁰⁻²¹ In another study²², the petroleum ether extract of *C. officinalis* is rich in lipids such as: monol fatty acids, sterol esters, 3-monoesters, lauric acid, myristic acid, palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acid.

The existence of linoleic acid and stearic acid in the methanolic extract of the stem and the leaf of *C. officinalis* is also demonstrated with a percentage of 27.56 and 6.41% respectively.²³

According to the results of GC / MS, the strong antioxidant activity of the ethanolic extract of *C. suffruticosa* is probably due to its richness of active ingredients which possess an antioxidant effect such as α tocopherol, campesterol, stegmasterol, β -sitosterol, Lupeol, α -Bisabolol and linoleic α -acid.

The scavenging effect of the hydro-methanol extracts of *C. officinalis* and of the standard on the DPPH radical expressed in IC_{50} values were of the order: flowers (0.35 mg.ml⁻¹), leaves (0.57 mg. ml⁻¹) and BHT (8.11 mg.ml⁻¹).⁸ These data reveal that the extracts of the different parts probably have a stronger effect of trapping free radicals than the positive control (BHT).

The potentiality of the ethanolic extract of *C. suffruticosa* to reduce ferric iron Fe^{3+} into ferrous iron Fe^{2+} is related to the nature of the reducing substances existing in this extract.

The antioxidant activity by the FRAP assay of methanolic extracts of the species *C. officinalis* collected in the Béja region of Tunisia was studied. The authors obtained values of 28.37 ± 0.12 and 17.68 ± 0.02 mM Trolox for the flowers and leaves respectively.⁸

In addition, the species *Calendula arvensis* of western Algeria, reported an antioxidant capacity of the essential oil of this species tested by FRAP test where it recorded the concentration of $90.7 \mu\text{g} / \text{mL}$ a reducing power of the HE of *C. arvensis* much higher with a value of (DO = 1.698).²⁴

In a similar study, the aqueous extract of *C. officinalis* at a concentration of $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ showed anti-radical and antioxidant activities, by an inhibition rate of 74.6% of the lipid peroxidation of linoleic acid, this activity is higher than that of α -tocopherol (63%) which has been used as a standard.²⁵

CONCLUSION

In this study, we studied for the first time the chemical composition and the antioxidant activity of the ethanolic extract of the species *Calendula suffruticosa* subsp. *suffruticosa* Vahl endemic to north-east of Algeria. The analysis of the ethanol extract by GC-MS showed the presence of various bioactive compounds confirming the medicinal interest of this plant. The antioxidant activity of this extract is very important and comparable to some extent to synthetic antioxidants (BHA, BHT and ascorbic acid).

This extract could therefore constitute as alternative to certain synthetic additives. It is necessary to attract attention to the fact that these results are obtained *in vitro*.

Their interest resides in the fact that they allow to directly search the antioxidant activity of this extract or pure compounds *in vivo* to correlate the results observed in the two cases.

CONFLICT OF INTEREST

The authors are declared no conflict of interest.

ABBREVIATION USED

GC-MS: Gas chromatography mass spectrometry; FRAP: Ferric reducing antioxidant power; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; BHT: 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxycarboxylic acid; BHA : butylated hydroxy anisole; EEC: Ethanolic extract of *Calendula suffruticosa*.

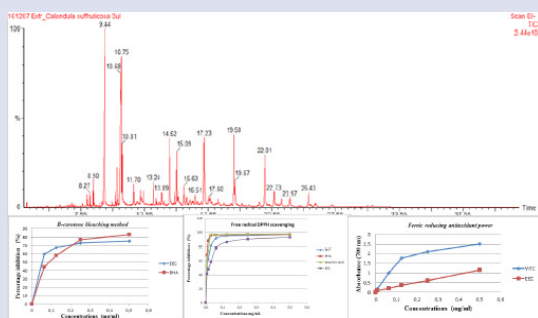
REFERENCES

- Paolini J, Barboni T, Desjobert JM, Djabou N, Muselli A, Costa J. Chemical composition, interspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2010;38(5):865-74.
- Beniston N, Beniston W. *Fleurs d'Algérie*. Entreprise National du Livre. p.359;1984.
- Tutin T, Heywood H. *Flora Europaea: Plantaginaceae to Compositae* (and Rubiaceae). Cambridge University Press. p.534;1976.
- Couplan F, *Les plantes et leurs noms: Histoires insolites*. Editions Quae.

p.223;2012.

- Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Filho BP, Nakamura CV, Cortez DA. Analysis of the essential oils from *Calendula Officialis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;44(3):391-5.
- Wilen RW, Barl B, Slinkard AE. Feasibility of Cultivation *Calendula* as a Dual Purpose Industrial Oil seed and Medicinal Crop. *Future for Medicinal and Aromatic Plants*. 2004:199-206.
- Masterova I, Grancaiova Z, Uhrinova S, Suchy V, Bik K, Nagy M. Flavonoids in flowers of *Calendula Officialis* L. *Chemis Papers*. 1991;45(1):105-8.
- Rigane G, Ben-younes S, Ghazghazi H, Ben-salem R. Investigation in to the biological activities and chemical composition of *Calendula Officialis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal* 2013;20(6):3001-7.
- Albulescu M, Alexa N, Cojan C. *Calendula Officialis* flowers, source of extracts with antioxidant activity. *Annals of West University of Timisoara. Series Chemistry*. 2004;13(2):169-76.
- Kirmizibekmeza H, Bassarello C, Piacente S, Pizza C. Triterpene Saponins from *Calendula arvensis*. *Verlag der Zeitschrift f ur Naturforschung*. 2006;61(9):1170-3.
- Khalid KHA, Teixeira JA. Biology of *Calendula Officialis* Linn: focus on pharmacologic, biological activities and agronomic practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. Medicinal and Aromatic Plant Science an Biotechnology*. 2012;6(1):12-27.
- Sauserde R, Kampuss K. Composition of carotenoids in *Calendula (Calendula Officialis* L.) flowers. *Foodbalt*. 2014.
- Pintea A, Bele C, Andrei S, Socaciu C. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula Officialis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis*. 2003;47(1-4):37-40.
- Quezel P, Santa S. *Nouvelle Flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales*. Tome 2. Centre national de la recherche, Paris. p. 565;1962.
- Benhammou N, Atik-Bekkara F, Kadifkova PT. Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L and *Pistacia atlantica* Desf. *Adv Food Sci*. 2007;29(3):155-61.
- Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan J Nutri*. 1986;103:413-9.
- Ozsoy N, Can A, Yanardag R, Akev A. Antioxidant activity of *Smilax Excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*. 2008;110(3):571-83.
- De-la RLA, Alvarez PE, Gonzalez GA. Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability. *John Wiley and sons*.p.380;2009.
- Adler G, Kasprzyk Z. Free sterols, sterol esters, glycosides, acylated glycosides and water-soluble complexes in *Calendula Officialis*. *Photochemistry*. 1975;14(3):627-31.
- Wilkomerski B. Pentacyclic triterpene triols from *Calendula Officialis* flowers. *Photochemistry*. 1985; 24(12):3066-7.
- Zitterl E, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert Z, Della loggia R, Tubaro A, et al. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L). *journal of ethnopharmacology*. 1997;57(2):139-44.
- Badami RC, Morris LJ. The oxygenated fatty acid of *Calendula* seeds oil. *The Journal of the American Oil Chemist's Society*. 1965;42(12):1119-21.
- Abdul-jalil R. GC-MS analysis of *Calendula Officialis* and cytotoxic effects of its flower crude extract on human epidermoid larynx carcinoma (hep-2). *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2014;3(4):237-75.
- Belabbes R. Enquête ethnobotanique, caractérisation chimique et activités biologiques des volatils de deux variétés médicinales de l'ouest Algérien: *Calendula arvensis* L et *Carthamus* sp L. M.Sc. Thesis, University Abou Bekr belkaid, Tlemcen, Algeria. 2014.
- Kassim GK, Fouad RS, Faroun AE. Antibiofilm, Antibacterial and Antioxidant activities of water extract of *Calendula officinalis* flowers. *International journal of Biological and Pharmaceutical Research*. 2013;4(7):465-70.

GRAPHICAL ABSTRACT



SUMMARY

- Calendula suffruticosa* ssp. *suffruticosa* Vahl, Medicinal and Aromatic plant, spontaneous and widespread in the Mediterranean region and in the north-east of Algeria.
- Sixty-four compounds are identified by GC/MS analysis of the ethanolic extract, six are predominant: α -linoleic acid (24.20%), linoleic acid (23.58%), Stigmasterol (8.53%), 2-Methyl-Z-4-tetradecene (6.62%) and α -Bisabolol (1.70%).
- The free radical scavenging by DPPH method indicated that the ethanolic extract of *C. suffruticosa* showed a very high antioxidant activity with an $\text{IC}_{50} = 0.017 \pm 1.00$ mg / ml.
- This extract also showed an ability to reduce very high iron with a maximum optical density of 1.157 at a concentration of 0.5 mg / ml and an antioxidant activity compared to the β -carotene / linoleic acid test of order of $75 \pm 1.02\%$.

ABOUT AUTHORS

Ismahene Sofiane: Ph.D in Laboratory of Plant Biology and Environment “Medicinal Plants” Axis, Departement of Biology, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar Annaba. Bp 12, 23000 Annaba. Algeria.

Ratiba Seridi: Presently, working as Director of Laboratory of Plant Biology and Environment “Medicinal Plants” Axis, and Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar Annaba. Bp 12, 23000 Annaba. Algeria.

Diego Cortes: Presently, working as Director of Laboratory of Pharmacognosy , and Professor in Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estelles s / n 46100 Burjassot, Valencia Spain.

Nuria Cabedo: Doctor, Laboratory of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estelles s / n 46100 Burjassot, Valencia Spain.

Cite this article: Sofiane I, Seridi R, Cortes DM, Cabedo N. Phytochemical Composition and Evaluation of the Antioxidant Activity of the Ethanolic Extract of *Calendula suffruticosa* subsp. *suffruticosa* Vahl. *Pharmacog J.* 2018;10(1):64-70.