

République Algérienne Démocratique et Populaire



Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

TALEB Affif

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Pharmacotoxicologie

THÈME

**Caractérisation phytochimique et
évaluation de la capacité antioxydante de
Calendula officinalis L.**

Soutenu le 01/07/2025.

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Présidente	Benhamimed Elattafia	MCA	U. Mostaganem
Encadrante	Chenini-Bendiab Hadjer	MCB	U. Mostaganem
Examinatrice	Douichene Salima	MCA	U. Mostaganem

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

Avant tout, je voudrais remercier Allah tout-puissant de m'avoir donné la santé, la force, le courage, la patience et la persévérance, et de m'avoir permis d'utiliser les moyens à ma disposition pour accomplir ce modeste travail. Merci de m'avoir montré le chemin de la réussite.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadreur Mme **Chenini-Bendiab Hadjer** qui a dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils et sa disponibilité tout au long de la réalisation de cette étude. Sans elle, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury qui jugeront ma recherche : **Mme Benhamimed Elattafia** et **Mme Douichene Salima**

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à **Professeur Djebli** qui m'a accueillis et ouvert les portes du laboratoire de recherche « Pharmacognosie & Api-phytothérapie ». Université de Mostaganem.

Je remercie très sincèrement l'équipe du laboratoire où nous j'ai effectué mes travaux expérimentaux, précisément l'ingénieur de laboratoire "**Mme Mdjahed**".

Je tiens également à remercier mes enseignants et spécifiquement de la spécialité « Pharmacotoxicologie » de la Faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Mostaganem, qui nous ont suivi tout au long de notre cursus universitaire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude

A mes très chers parents, que j'admire beaucoup, qui m'ont toujours aidés dans ma vie et qui n'ont cessés de m'encourager et de me soutenir tout au long de mes études, que dieu les garde en bonne santé.

Au cheikh khaled Bentounes mon guide et mon cheikh et le gardien de la paix

A mon meilleur ami et mon frère Refai Abderrahmane, qui m'a accompagné tout au long de ce parcours et a partagé avec moi les bons et les mauvais jours.

A mes amis Sahnoun Mouffki, Asma benaouda, Sultan ikram et avec qui j'ai passé des années inoubliables.

Affif

Résumé

Les plantes médicinales sont utilisées depuis des siècles pour leurs vertus thérapeutiques. Riches en principes actifs, elles permettent de traiter naturellement divers pathologies. Notre étude a pour objectif de valoriser l'espèce de *Calendula officinalis* L., de ce faite, nous avons procédé à la caractérisation des composés phénoliques et l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des parties aériennes de cette plante. Deux extractions ont été réalisées par macération en utilisant l'eau et l'éthanol comme différents solvants. Des analyses phytochimiques qualitatives ont été effectuées par réactions colorimétriques et la détermination des teneurs en polyphénols totaux et des tanins condensés et hydrolysables a été également entreprise. De plus l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante a fait objet de différente méthodes telles que : DPPH, ABTS, FRAP et CAT. Les résultats obtenus ont montrés des teneurs significativement élevées des phénols totaux et les tanins catéchiques dans l'extrait hydro-éthanolique de *C.officinalis* (3,293 mgEAG/g Lyophilisat et 0,082 mgEQU/g Lyophilisat respectivement) comparativement à l'extrait aqueux (0,26 mgEAG/g Lyophilisat et 0,014 mgEQU/g Lyophilisat). Cependant les tanins hydrolysables ont révélés des valeurs significativement élevées dans l'extrait aqueux (1,203 mgEAT/g Lyophilisat) en comparaison à l'extrait alcoolique (0,121 mgEAT/g Lyophilisat). Concernant l'activité antioxydante, le lyophilisat aqueux de *C.officinalis* a enregistré des concentrations faibles des IC50 pour les radicaux libres DPPH et ABTS (2,921mg/ml et 2,835mg/ml respectivement) par rapport au lyophilisat hydro-éthanolique (5,942mg/ml et 3,139mg/ml respectivement). Tandis que la capacité antioxydante totale (FRAP et CAT) a été pratiquement comparable pour les deux extraits étudiés. Les données requises lors de cette étude ont confirmées que *Calendula officinalis* L. pourrait éventuellement représenter une source de composés phénoliques exploitée comme un agent antioxydant. Cette capacité serait la clé pour développer différentes thérapeutiques.

Mots clés : *Calendula officinalis* L., composés phénoliques, analyses phytochimiques, activité antioxydante, *in vitro*.

Abstract:

Medicinal plants have been used for centuries for their therapeutic properties. Rich in bioactive compounds, they offer natural treatment options for various pathologies. This study aims to valorize *Calendula officinalis* L. by characterizing its phenolic compounds and evaluating the *in vitro* antioxidant activity of its aerial parts. Two extraction methods were performed using maceration with different solvents: water and ethanol. Qualitative phytochemical analyses were conducted using colorimetric reactions, and the total phenolic content, condensed tannins, and hydrolysable tannins were quantified. Additionally, *in vitro* antioxidant activity was assessed using multiple methods: DPPH, ABTS, FRAP, and CAT. The results revealed significantly higher levels of total phenolics and catechic tannins in the hydroethanolic extract (3.293 mg GAE/g lyophilizate and 0.082 mg CE/g lyophilizate, respectively) compared to the aqueous extract (0.26 mg GAE/g lyophilizate and 0.014 mg CE/g lyophilizate). However, hydrolysable tannins were more abundant in the aqueous extract (1.203 mg TAE/g lyophilizate) than in the hydroethanolic extract (0.121 mg TAE/g lyophilizate). Regarding antioxidant activity, the aqueous lyophilizate of *C. officinalis* exhibited lower IC₅₀ values for DPPH and ABTS radicals (2.921 mg/mL and 2.835 mg/mL, respectively) compared to the hydroethanolic lyophilizate (5.942 mg/mL and 3.139 mg/mL, respectively). Meanwhile, the total antioxidant capacity (FRAP and CAT) was nearly comparable for both extracts. The findings confirm that *Calendula officinalis* L. could serve as a valuable source of phenolic compounds with potential applications as an antioxidant agent. This capacity may be key to developing novel therapeutic strategies.

Keywords: *Calendula officinalis* L., phenolic compounds, phytochemical analysis, antioxidant activity, *in vitro*.

الملخص

تستخدم النباتات الطبية منذ قرون لخصائصها العلاجية. فهي غنية بالمكونات النشطة، وتسمح بمعالجة أمراض مختلفة بطريقة طبيعية. تهدف دراستنا إلى تقييم نوع *Calendula officinalis* L.، ولهذا قمنا بتحديد خصائص المركبات الفينولية وتقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر للأجزاء الهوائية من هذه النبتة. تم إجراء عمليتي استخلاص عن طريق النقع باستخدام الماء والإيثانول كمذيبات مختلفة. تم إجراء تحليلات فيتوكيميائية نوعية عن طريق تفاعلات لونية، كما تم تحديد محتوى البوليفينول الكلي والتانينات المكثفة والقابلة للتحلل المائي. بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر باستخدام طرق مختلفة مثل: DPPH و ABTS و FRAP و CAT. أظهرت النتائج محتويات عالية بشكل ملحوظ من الفينولات الكلية والتانينات الكاتيكية في المستخلص المائي-الإيثانولي مقارنة بالمستخلص المائي ومع ذلك، أظهرت التانينات القابلة للتحلل المائي قيمًا مرتفعة بشكل ملحوظ في المستخلص المائي مقارنة بالمستخلص الكحولي. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للأكسدة، سجل المستخلص المائي المجفف بالتجميد من *C. officinalis* تركيزات منخفضة من IC50 للجذور الحرة DPPH و ABTS مقارنة بالمجفف المائي-الإيثانولي. في حين أن القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية (FRAP و CAT) كانت مماثلة تقريبًا للمستخلصين المدروسين. أكدت البيانات المطلوبة في هذه الدراسة أن *Calendula officinalis* L. قد تمثل مصدرًا للمركبات الفينولية المستخدمة كعامل مضاد للأكسدة. قد تكون هذه القدرة مفتاحًا لتطوير علاجات مختلفة.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للأكسدة، الكاندولا الطبية، مركبات فينولية، تحليلات كيميائية نباتية

Listes des figures

N de figure	Titre	page
01	Le déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire	01
02	Répartition mondiale de <i>Calendula</i>	16
03	Caractéristiques morphologiques de <i>C.officinalis</i> L. Feuilles	18
04	les feuilles de <i>C. officinalis</i>	24
05	Schéma récapitulatif de l'extraction aqueuse et hydro-éthanolique	25
06	Equation du radical DPPH transformé en DPPH	28
07	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH)	29
08	Formation et piégeage du radical ABTS●+ par un antioxydant donneur de H ●	30
09	Analyses phytochimiques qualitatives pour les extraits (A) aqueux et (B) hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante <i>Calendula officinalis</i> L.	32
10	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	33
11	Teneurs en phénols totaux dans les extraits Aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante <i>Calendula officinalis</i> L. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs	34
12	Courbe d'étalonnage de la catéchine	35
13	Teneurs tanins condensés dans les extraits Aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante <i>Calendula officinalis</i> L. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs	36
14	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique	36
15	Teneurs tanins hydrolysables dans les extraits aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante <i>Calendula officinalis</i> L. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs	37

16	Capacité de piégeage du radical libre DPPH par l'acide	38
17	Capacité de piégeage du radical libre ABTS par le Trolox	39
18	Courbe d'étalonnage du sulfate ferreux heptahydraté (FeSO ₄ .7H ₂ O)	40
19	courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	41

Lister des tableaux

N de tableau	Titre	Page
01	Différents exemples des radicaux libres	4
02	Classification des polyphénols	13
03	Classification taxonomique de <i>C. officinalis</i> L	17
04	Contenu nutritionnel de <i>C.officinalis</i> L	19
05	Analyses phytochimiques qualitatives pour les extraits aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante <i>Calendula officinalis</i> L.	33
06	Teneurs en phénols totaux dans les extraits aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante <i>Calendula officinalis</i> L.	34
07	Teneurs en tanins condensés dans les extraits Aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante <i>Calendula officinalis</i> L.	35
08	Teneurs en tanins hydrolysables dans les extraits aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante <i>Calendula officinalis</i> L.	37
09	Capacité du piégeage de 50% du radical libre DPPH des extraits aqueux et hydro-éthanolique de <i>Calendula officinalis</i> L., ainsi que l'acide ascorbique	38
10	Capacité du piégeage de 50% du radical libre ABTS des extraits aqueux et hydro-éthanolique de <i>Calendula officinalis</i> L., ainsi que le Trolox	39
11	Potentiel antioxydant de la réduction ferrique (FRAP) des extraits aqueux et hydro-éthanolique de <i>Calendula officinalis</i> L.	40
12	Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits aqueux et hydro-éthanolique de <i>Calendula officinalis</i> L	41

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

CAT: Catalase. GSH: Gluthathion

CYP : Cytochrome P450

COX : Cyclooxygénase

DPPH: 2,2-diphényle-1-picrylhdrozyl

EOA: Espèces réactives de l'azote.

EGCG : Épigallocatechine Gallate.

FRAP: Pouvoir réducteur-antioxydant ferrique.

GSH : Glutathion.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

iNOS : Inducible Nitric Oxide Synthase.

GST: Glutathione S-transferase.

GPx: Gluthathion peroxydase.

GR: Gluthathion réductase.

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

LDL : Low-Density Lipoprotein.

LOX : Lipoxygénase.

MPO : Myéloperoxydase

NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PM2.5 : Particules fines $\leq 2.5 \mu\text{m}$.

ROS: Espèce réactive de l'oxygène. OS: Stress oxydative.

SOD: Superoxyde dismutase.

Trx: Thiorédoxine.

.RNS : Reactive Nitrogen Species (*Espèces Réactives de l'Azote*).

XO : Xanthine Oxydase.

Table de matières

Introduction.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I : Stress oxydatif

I.1.Définition.....	3
I.2.Radicaux libres.....	3
I.3. Origine des radicauxlibres.....	5
I.3.1. Sources endogènes.....	5
I.3.1.1. Chaine respiratoire mitochondriale.....	5
I.3.1.2. Inflammation.....	5
I.3.1.3. Métaux de transition.....	5
I.3.1.4. Xanthine oxydase.....	6
I.3.1.5. Métabolisme de l'acide arachidonique.....	6
I.3.1.6. Cytochrome P450.....	7
I.3.2. Sources exogènes.....	7
I.3.2.1. Pollution et Toxines Environnementales.....	7
I.3.2.2. Rayonnements Ionisants et UV.....	7
I.3.2.3. Médicaments et Produits Chimiques.....	8
I.4. Types des radicaux libres.....	8
I.4.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	8
I.4.2.Espèces réactives de L'azote (ERN).....	9

CHAPITRE II : Antioxydants

II.1. Définition.....	10
II.2. Différents types d'antioxydant.....	10
II.2.1. Antioxydants endogènes.....	10
II.2.1.1. Antioxydants enzymatiques.....	10
II.2.1.2. Antioxydants non enzymatique.....	11

II.2.2. Antioxydantes exogènes.....	11
II.2.2.1. Vitamines Antioxydantes.....	11
II.2.2.2. Minéraux Antioxydants (Cofacteurs Enzymatiques)	12
II.2.2.3. Polyphénols (Composés Phytochimiques)	12
II.2.2.3.1. Effet Thérapeutique des Polyphénols via leur Activité Antioxydante.....	13
II.3. Plantes médicinales antioxydantes.....	14

CHAPITRE III : *Calendula officinalis* L

III.1. Généralités.....	15
III.2.Écologie et répartition géographique.....	16
III.3. Taxonomie.....	16
III.4. Description botanique.....	17
III.5. Composition phytochimique.....	18
III.5.1. Composition nutritionnelle.....	18
III.5.2. Lipides.....	19
III.5.3. Huiles essentielles.....	19
III.5.4. Composants phytochimiques.....	20
III.5.4.1. Terpénoïdes.....	20
III.5.4.2. Caroténoïdes.....	20
III.5.4.3. Flavonoïdes.....	20
III.5.4.4. Coumarines.....	21
III.5.4.5. Quinones.....	21
III.6. Activités biologiques.....	21
III.6.1. Activité anti-inflammatoire.....	21
III.6.2. Activité de guérison et de régénération.....	21
III.6.3. Activité antimicrobienne.....	21
III.6.4. Activité anticancéreuse.....	22

III.6.5. Activité hépatoprotectrice.....	22
III.6.6. Activité neuroprotectrice.....	22
III.6.7. Activité gastroprotectrice.....	23
III.6.8. Activité immunostimulante.....	23
III.7. Toxicité.....	23

Partie expérimentale Matériels et Méthodes

IV.1. Matériel végétal.....	24
IV.2. Préparation des extraits.....	24
IV.3. Analyses phytochimiques.....	26
IV.3.1. Analyses qualitatives (Screening phytochimique)	26
IV.3.1.1. Polyphénols.....	26
IV.3.1.1. Tanins.....	26
IV.3.2. Caractérisation quantitative des polyphénols	26
IV.3.2.1. Dosage des phénols totaux.....	26
IV.3.2.2. Dosage des tanins condensés.....	27
IV.3.2.3. Dosage des tanins hydrolysables.....	27
IV.4. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante.....	28
IV.4.1. Piégeage des radicaux libres DPPH.....	28
IV.4.2. Pouvoir réducteur FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	28
IV.4.3. Test de l'ABTS (l'acide 2, 2'-azinobis-3 éthylbenzothiazoline-6 sulphonique)	30
IV.4.4. Capacité antioxydante totale (CAT)	31

RESULTATS

V.1. Analyses phytochimiques qualitatives (screening phytochimique)	32
V.2. Analyses phytochimiques quantitatives	33
V.2.1. Détermination de la teneur en phénols totaux.....	33
V.2.2. Détermination de la teneur en tanins condensés.....	35
V.2.3. Détermination de la teneur en tanins hydrolysables.....	36
V.3. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante de <i>Calendula officinalis</i> L.	38
V.3.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)	38
V.3.2. piégeage du radical libre ABTS L'acide 2,2'-azino- bis (3éthylbenzothiazoline-6 sulphonique)	39
V.3.3. Pouvoir antioxydant de la réduction ferrique (FRAP)	40
V.3.4. Capacité antioxydante totale (CAT)	41

DISCUSSION

DISCUSSION.....	42
-----------------	----

Conclusion & perspectives

Conclusion & perspectives.....	43
--------------------------------	----

Introduction

Le Stress oxydant est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène, en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants. Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels (**Bensakhria, 2018**).

Les antioxydants synthétiques, tels que le BHA (butylhydroxyanisole), le BHT (butylhydroxytoluène) et le TBHQ (tert-butylhydroquinone), sont largement utilisés dans les produits alimentaires et cosmétiques pour prévenir l'oxydation. Bien qu'efficaces, ces composés peuvent présenter des risques pour la santé humaine. Des études ont montré qu'une exposition chronique au BHA et au BHT pourrait induire des perturbations endocriniennes, une hépatotoxicité et même des effets cancérogènes chez l'animal (**Williams et al., 1999**).

Pour éviter les risques liés aux antioxydants synthétiques, la phytothérapie offre une alternative naturelle et souvent mieux tolérée. De nombreuses plantes sont riches en composés antioxydants puissants, tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les vitamines naturelles. Par exemple, le thé vert (*Camellia sinensis*), le curcuma (*Curcuma longa*), le gingembre, le romarin et les baies d'açaï et bien d'autres plantes sont reconnues pour leurs effets antioxydants supérieurs à ceux des molécules de synthèse, sans effets secondaires notables aux doses usuelles (**Menon & Sudheer, 2007 ; Khan & Mukhtar, 2018**)

Calendula officinalis L. (Souci officinal) est une plante médicinale reconnue pour ses vertus thérapeutiques très diversifiées. Appartenant à la famille des Astéracées et originaire du bassin méditerranéen, cette plante est riche en composés phytochimiques actifs, tels que les flavonoïdes (quercétine, rutine), les caroténoïdes (lutéine, bêta-carotène) et les triterpénoïdes, qui lui confèrent ses remarquables activités biologiques (**Fonseca et al., 2010**). Des études scientifiques ont démontré que le *C.officinalis* possède des propriétés anti-inflammatoires, cicatrisantes et antibactériennes. Son efficacité dans le traitement des plaies cutanées et son potentiel dans la prévention du vieillissement cellulaire en font une plante particulièrement intéressante en phytothérapie moderne (**Preethi & Kuttan, 2009**).

Dans ce contexte, nous avons entrepris l'évaluation *in vitro* du potentiel antioxydant de *Calendula officinalis* L. Notre approche méthodologique a combiné plusieurs techniques analytiques validées, incluant le pouvoir du piégeage des radicaux libres (DPPH, ABTS), ainsi que la capacité antioxydante totale (FRAP et CAT). Cette démarche a été complétée par des analyses phytochimiques comprenant à la fois des caractérisations qualitatives et la détermination des teneurs en composés phénoliques.

Notre travail a été divisé en deux parties distinctes ; revue bibliographique, incluant des généralités sur le stress oxydatif, les antioxydants, ainsi que la description de *Calendula officinalis* L. Une étude expérimentale déterminant les différents protocoles expérimentaux, dénouée par une discussion et une conclusion générale.

Partie Bibliographique

Chapitre I

Stress oxydatif

I.1. Définition

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la capacité des systèmes antioxydants à les neutraliser, entraînant des dommages aux macromolécules (lipides, protéines, ADN) et contribuant au vieillissement et à diverses pathologies (maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, cancer) (Sies et Jones, 2020) (Fig 01).

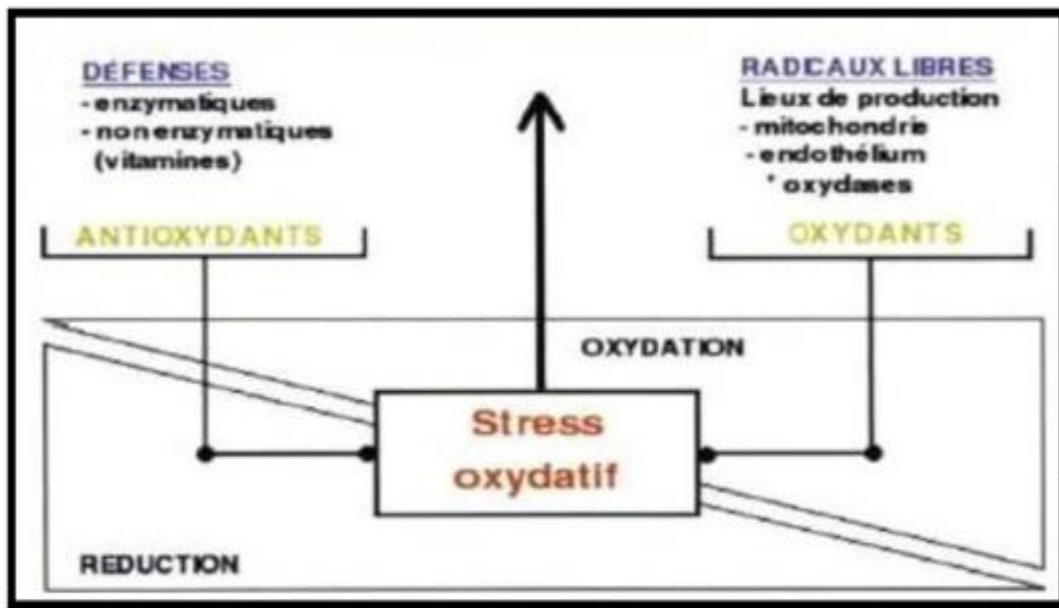


Figure 01 : Le déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Eddhima, 2019).

I.2. Radicaux libres

Les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux hydroxyles ($\cdot OH$) et l'oxygène singulet (1O_2) sont des espèces réactives de l'oxygène (ROS) communément définies (Sato et al., 2013).

Des processus tels que la phosphorylation des protéines, l'activation de plusieurs facteurs de transcription, l'apoptose, l'immunité et la différenciation dépendent tous d'une production et d'une présence adéquates de ROS à l'intérieur des cellules, qui doivent être maintenues à un faible niveau (Rajendran et al., 2014). Lorsque la production de ROS augmente, elle commence à avoir des effets néfastes sur des structures cellulaires importantes telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Wu j et al., 2013). Le **tableau 1** récapitule les principaux radicaux libres.

Tableau 01 : Différents exemples des radicaux libres (Mohammedi, 2012).

Nomenclature	Structure	Principales réactions
Superoxyde	$\bullet\text{O}=\text{O}-$	Catalyseur de la réaction de Haber-WeiB par recyclage de Fe^{2+} et Cu^{+} ; formation du peroxyde d'hydrogène et peroxydinitrite
Peroxyde d'hydrogène	$\text{HO}=\text{OH}$	Formation du radical hydroxyle; inactivation d'enzymes; oxydation de biomolécules
Radical hydroxyle	$\bullet\text{OH}$	Abstraction de d'hydrogène, production de radicaux libres et peroxydes lipidiques, oxydation des thiols
Ozone	$-\text{O}=\text{O}^{+}=\text{O}$	Oxydation de biomolécules, spécialement celles contenant des doubles liaisons, formations des ozonides et des aldéhydes cytotoxiques
Oxygen singulet	$\bullet\text{O}=\text{O}$	Réaction avec les doubles liaisons, formation de peroxydes, décomposition des aminoacides et nucléotides
Oxide nitrique	$\bullet\text{N}=\text{O}$	Formation de peroxydinitrite, réaction avec autres radicaux
Peroxydinitrite	$\text{O}=\text{N}=\text{O}=\text{O}$	Formation du radical hydroxyle, oxydation des groupements thiols et aromatiques, conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, oxydation des biomolécules
Hypochlorite	ClO^{-}	Oxydation des groupements amine et sulfure, formation de chlore
Radical	$\text{R}\bullet$	Abstraction d'hydrogène, formation des radicaux peroxy et autres radicaux, décomposition des lipides et autres biomolécules
Radical peroxy	$\text{R}=\text{O}=\text{O}\bullet$	Abstraction d'hydrogène, formation des radicaux, décomposition des lipides et autres biomolécules
Hydroperoxyde	$\text{R}=\text{O}=\text{OH}$	Oxydation des biomolécules, destruction des membranes biologiques

I.3. Origine des radicaux libres

Il y a deux origines de radicaux libres auxquelles nous sommes continuellement confrontés : une source interne, où nos cellules en génèrent, et une source externe, où ils proviennent de notre environnement (**Tacchini, 2014**).

I.3.1. Sources endogènes

I.3.1.1. Chaîne respiratoire mitochondriale

La production de ROS par les mitochondries est un processus physiologique résultant principalement de la fuite d'électrons au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire, conduisant à la formation de superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Ce radical peut ensuite être converti en d'autres espèces réactives comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$).

Bien que ces ROS jouent un rôle dans la signalisation cellulaire, leur accumulation excessive peut endommager les lipides, les protéines et l'ADN, contribuant au stress oxydatif et à diverses pathologies. Les mitochondries sont ainsi une source majeure de ROS dans la cellule, notamment lors de dysfonctionnements métaboliques ou sous l'effet de stress cellulaires (**Murphy, 2009**).

I.3.1.2. Inflammation

L'inflammation constitue une source majeure de production endogène de radicaux libres, principalement via l'activation des cellules immunitaires. Les neutrophiles et macrophages génèrent d'importantes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) grâce au système enzymatique NADPH oxydase (NOX2) et à la myéloperoxydase (MPO) lors du "burst oxydatif" phagocytaire.

Parallèlement, la synthèse induite de monoxyde d'azote ($NO\bullet$) par la NO-synthase inductible (iNOS) conduit à la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$), un puissant oxydant. Ces dérivés réactifs, bien qu'utiles pour éliminer les pathogènes, deviennent délétères lorsqu'ils sont produits en excès, contribuant à la peroxydation lipidique, à la fragmentation protéique et aux lésions de l'ADN observées dans les pathologies inflammatoires chroniques (**Droge, 2002**).

I.3.1.3. Métaux de transition

Les métaux de transition, notamment le fer (Fe) et le cuivre (Cu), constituent une source endogène importante de radicaux libres via la réaction de Fenton et la réaction de Haber-Weiss. Ces métaux, présents sous forme libre ou liée dans l'organisme, catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyle ($\bullet OH$), une espèce extrêmement réactive responsable de dommages oxydatifs aux lipides, protéines et ADN.

Le fer labile, en particulier, joue un rôle central dans le stress oxydatif en favorisant la peroxydation lipidique et en amplifiant les dommages cellulaires. Une dysrégulation du métabolisme de ces métaux, comme dans l'hémochromatose ou la maladie de Wilson, entraîne une accumulation toxique contribuant à diverses pathologies neurodégénératives, cardiovasculaires et cancéreuses (**Kell, 2009**).

I.3.1.4. Xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme clé du métabolisme des purines qui catalyse l'oxydation de l'hypo-xanthine en xanthine, puis de la xanthine en acide urique, tout en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette production de radicaux libres, normalement contrôlée, peut devenir pathologique dans des conditions d'ischémie-reperfusion, d'inflammation ou d'hyperuricémie, contribuant au stress oxydatif tissulaire.

La XO est particulièrement active dans le foie, les vaisseaux sanguins et les tissus inflammatoires, où son activité exacerbée participe à la dysfonction endothéliale, à la peroxydation lipidique et à la progression de maladies cardiovasculaires et métaboliques. L'inhibition pharmacologique de la xanthine oxydase (par exemple par l'allopurinol) représente donc une stratégie thérapeutique pour réduire le stress oxydatif dans ces pathologies (**Battelli et al., 2014**).

I.3.1.5. Métabolisme de l'acide arachidonique

Le métabolisme de l'acide arachidonique, libéré des membranes phospholipidiques par l'action des phospholipases A2, constitue une importante source endogène de radicaux libres via les voies des cyclooxygénases (COX) et des lipoxygénases (LOX). Ces enzymes génèrent non seulement des eicosanoïdes pro-inflammatoires (prostaglandines, leucotriènes) mais produisent également des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme sous-produit de leurs réactions enzymatiques.

La voie de la COX, en particulier, génère des radicaux libres lors de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine G2 (PGG2) et sa réduction ultérieure en PGH2. De même, la voie de la 5-LOX produit des radicaux peroxydes lors de la synthèse des leucotriènes. Ces ROS contribuent à l'amplification du stress oxydatif dans divers processus inflammatoires et sont impliqués dans la pathogenèse de maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et cancéreuses (**Kukreja et al., 1986**).

I.3.1.6. Cytochrome P450

Le système enzymatique du cytochrome P450 (CYP), particulièrement abondant dans le foie, joue un rôle clé dans le métabolisme des xénobiotiques et des composés endogènes, mais représente également une source importante de radicaux libres. Lors du cycle catalytique des CYP, une fuite d'électrons peut survenir au niveau du complexe CYP-réductase à NADPH, conduisant à la production d'anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont générées notamment lors du découplage du cycle catalytique, phénomène fréquent lors du métabolisme de certains substrats. Cette production de radicaux libres contribue au stress oxydatif hépatique et systémique, impliqué dans la toxicité médicamenteuse, les lésions d'ischémie-reperfusion et le développement de certaines pathologies métaboliques. L'induction chronique des CYP, comme lors de la consommation d'alcool ou de certains médicaments, peut ainsi exacerber les dommages oxydatifs cellulaires (**Zangar et al., 2004**).

I.3.2. Sources exogènes

Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent provenir de facteurs externes à l'organisme.

I.3.2.1. Pollution et Toxines Environnementales

Les polluants environnementaux et les toxines exogènes constituent une source majeure de radicaux libres, contribuant au stress oxydatif systémique. Les particules fines (PM_{2.5}), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les métaux lourds (plomb, cadmium, mercure) et les pesticides organochlorés favorisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via plusieurs mécanismes, notamment l'activation des enzymes de détoxification (comme les cytochromes P450), la perturbation des chaînes respiratoires mitochondriales et la réduction directe d' O_2 en superoxyde.

La fumée de cigarette, riches en radicaux libres et en composés pro-oxydants (comme le benzo[a]pyrène), aggravent également ce phénomène. Cet agent exogène endommage les lipides membranaires, les protéines et l'ADN, favorisant ainsi le vieillissement prématuré et le développement de pathologies chroniques (cancers, maladies respiratoires et neurodégénératives) (**Valko et al., 2006**).

I.3.2.2. Rayonnements Ionisants et UV

Les rayonnements ionisants (rayons X, gamma) et ultraviolets (UV-A/UV-B) constituent des sources exogènes majeures de radicaux libres, générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par interaction directe avec les molécules biologiques.

Les rayonnements ionisants induisent la radiolyse de l'eau, produisant des radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$), hydrogène ($\text{H}\bullet$) et des électrons hydratés ($\text{e}^{-\text{aq}}$), tandis que les UV provoquent la formation de superoxyde ($\text{O}_2\bullet^{-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) via l'excitation des chromophores cellulaires (NADH, flavines).

Ces ROS endommagent l'ADN (cassures simple/double brin, dimères de thymine), les protéines et les membranes lipidiques, contribuant au vieillissement cutané, à la carcinogénèse et aux syndromes de radiation aiguë. Les mécanismes de défense antioxydants (superoxyde dismutase, glutathion) sont souvent dépassés lors d'expositions intenses ou chroniques à ces rayonnements (Cadet et Wagner, 2013).

I.3.2.3. Médicaments et Produits Chimiques

De nombreux médicaments et produits chimiques industriels agissent comme des sources exogènes de radicaux libres par différents mécanismes. Certains agents chimiothérapeutiques (comme la doxorubicine et la bléomycine) génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via des réactions redox cycliques, tandis que des toxiques environnementaux comme le paraquat (herbicide) produisent du superoxyde ($\text{O}_2\bullet^{-}$) en acceptant des électrons de la NADPH oxydase.

Les anesthésiques volatils (halothane), les antibiotiques (nitrofurantoïne) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent également induire un stress oxydatif en perturbant les fonctions mitochondriales ou en activant les enzymes du cytochrome P450. Ces composés exogènes contribuent à la peroxydation lipidique, aux dommages à l'ADN et à la nécrose cellulaire, expliquant en partie leurs effets secondaires toxiques sur le foie, les reins et le système cardiovasculaire (kalyanaraman, 2020).

I.4. Types des radicaux libres

Dans les systèmes biologiques, les radicaux libres les plus importants sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS, de l'anglais *Reactive Oxygen Species*) et les espèces réactives de l'azote (RNS, de l'anglais *Reactive Nitrogen Species*) (Ré et al., 2005).

I.4.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO, ou ROS en anglais pour *Reactive Oxygen Species*) sont des molécules dérivées de l'oxygène moléculaire (O_2), caractérisées par une grande réactivité chimique due à la présence d'électrons non appariés. Parmi les principales ERO figurent l'anion superoxyde ($\text{O}_2\bullet^{-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$).

Ces espèces sont produites naturellement lors de processus cellulaires tels que la phosphorylation oxydative mitochondriale, les réactions d'oxydo-réduction enzymatiques (cytochrome P450, NADPH oxydase) ou encore l'activation des phagocytes lors de la réponse immunitaire (Sies et Jones, 2020). Bien qu'elles jouent un rôle crucial dans la signalisation cellulaire et la défense contre les pathogènes, un excès d'ERO peut provoquer un stress oxydatif, entraînant des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides membranaires.

Ce déséquilibre est impliqué dans diverses pathologies, dont les maladies neurodégénératives, le diabète et le vieillissement prématuré (Liguori et al., 2018).

I.4.2. Espèces réactives de L'azote (ERN)

Les Espèces Réactives de l'Azote (ERN ou RNS en anglais pour *Reactive Nitrogen Species*) sont des molécules dérivées du monoxyde d'azote ($\bullet\text{NO}$) et de ses dérivés, jouant un rôle crucial dans la signalisation cellulaire, la défense immunitaire et l'inflammation. Parmi les principales ERN figurent le monoxyde d'azote ($\bullet\text{NO}$), produit par les enzymes NO-synthases (NOS), et le peroxy-nitrite (ONOO^-), formé par la réaction entre $\bullet\text{NO}$ et le superoxyde ($\text{O}_2\bullet^-$). Ces espèces sont impliquées dans des processus physiologiques tels que la vasodilatation, la neurotransmission et la réponse aux pathogènes (Förstermann et Sessa, 2012).

Cependant, un excès d'ERN peut entraîner une nitrosylation des protéines, des lésions de l'ADN et un stress nitrosatif, contribuant à des pathologies comme les maladies cardiovasculaires, les désordres neurodégénératifs (Alzheimer, Parkinson) et le cancer (Pacher et al., 2007).

Chapitre II

Antioxydants

II.1. Définition

Les antioxydants sont des molécules capables de prévenir ou de ralentir l'oxydation d'autres molécules en neutralisant les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ils jouent un rôle crucial dans la protection des cellules contre le stress oxydatif, qui est impliqué dans le vieillissement et diverses maladies (comme les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives). Les antioxydants peuvent être d'origine endogène (produits par l'organisme, comme le glutathion) ou exogène (apportés par l'alimentation, comme les vitamines C et E, les polyphénols et les caroténoïdes) (**Lobo et al., 2010**).

II.2. Différents types d'antioxydant

II.2.1. Antioxydants endogènes

L'organisme possède un système antioxydant complexe pour neutraliser les radicaux libres et limiter le stress oxydatif. Ces défenses incluent des enzymes antioxydantes, des molécules piègeuses de radicaux, et des systèmes de réparation.

II.2.1.1. Antioxydants enzymatiques

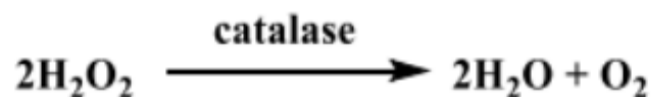
Les antioxydants enzymatiques sont des enzymes produites par l'organisme qui jouent un rôle essentiel dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la protection contre le stress oxydatif. Parmi les principales enzymes antioxydantes figurent le superoxyde dismutase (SOD), qui convertit le superoxyde en peroxyde d'hydrogène, la catalase (CAT), qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, et la glutathion peroxydase (GPx), qui réduit les hydroperoxydes lipidiques en utilisant le glutathion comme cofacteur.

Ces enzymes agissent en synergie pour maintenir l'équilibre redox cellulaire et prévenir les dommages oxydatifs à l'ADN, aux lipides et aux protéines. Leur dérégulation est associée à diverses pathologies, notamment les maladies neurodégénératives et le vieillissement accéléré (**Birben et al., 2012**).

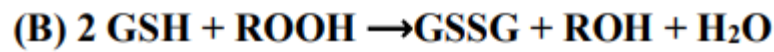
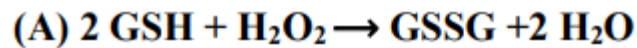
- Superoxyde dismutase (SOD) (**Fukai et Ushio-Fukai, 2011**)



- Catalase (CAT) (**Chelikani et al., 2004**)



- Glutathion peroxydase (GPx) (**Brigelius-Flohé et Maiorino ,2013**)



II.2.1.2. Antioxydants non enzymatique

Les antioxydants non enzymatiques endogènes sont des molécules naturellement synthétisées par l'organisme pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et limiter le stress oxydatif. Parmi les plus importants figurent le glutathion (GSH), un tri-peptide thiol jouant un rôle central dans la détoxification des radicaux libres et la régénération d'autres antioxydants comme les vitamines C et E. L'acide urique, un produit du métabolisme des purines, agit également comme un puissant antioxydant plasmatique en piégeant les radicaux libres. D'autres molécules, comme la bilirubine et la coenzyme Q10 (ubiquinol), contribuent à la protection des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique. Contrairement aux antioxydants enzymatiques, ces composés agissent principalement par des mécanismes de piégeage direct des radicaux ou de régénération des systèmes antioxydants. Leur déficit peut favoriser des pathologies liées au stress oxydatif, telles que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Sies, 2015**).

II.2.2. Antioxydantes exogènes

Les antioxydants exogènes sont des composés non produits par l'organisme, mais apportés par l'alimentation ou des suppléments, qui aident à neutraliser les radicaux libres et à prévenir le stress oxydatif. Ils complètent les défenses antioxydantes endogènes.

II.2.2.1. Vitamines Antioxydantes

Les vitamines antioxydantes comprennent principalement la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (tocophérols et tocotriénols) et les précurseurs de la vitamine A (caroténoïdes comme le bêta-carotène). Ces micronutriments jouent un rôle crucial dans la neutralisation des radicaux libres et la protection des cellules contre le stress oxydatif.

- La vitamine C, hydrosoluble, agit principalement dans le milieu intracellulaire et plasmatique en régénérant la vitamine E oxydée et en piégeant directement les ROS.
- La vitamine E, liposoluble, protège les membranes cellulaires en inhibant la peroxydation lipidique.
- Les caroténoïdes, agissent comme des piègeurs de singulet d'oxygène et potentialisent l'effet d'autres antioxydants.

Ces vitamines sont essentiellement apportées par l'alimentation (fruits, légumes, huiles végétales) et leur déficit peut favoriser des pathologies liées au stress oxydatif, telles que les maladies cardiovasculaires et le vieillissement prématuré (**Tarber et Stevens, 2011**).

II.2.2.2. Minéraux Antioxydants (Cofacteurs Enzymatiques)

Les minéraux antioxydants exogènes, principalement le sélénium (Se), le zinc (Zn), le cuivre (Cu) et le manganèse (Mn), jouent un rôle crucial dans la défense contre le stress oxydatif, bien qu'ils ne soient pas des antioxydants directs. Ces oligo-éléments, apportés par l'alimentation (noix, fruits de mer, céréales complètes), agissent comme des cofacteurs essentiels pour les enzymes antioxydantes endogènes.

Par exemple, le sélénium est un composant clé de la glutathion peroxydase (GPx), tandis que le zinc et le cuivre sont indispensables à l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). Le manganèse, quant à lui, participe à la fonction de la SOD mitochondriale.

Ces minéraux aident ainsi à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à maintenir l'intégrité cellulaire. Une carence en ces minéraux peut compromettre les systèmes de défense antioxydante, augmentant le risque de maladies inflammatoires et dégénératives (**Rayman, 2012**).

II.2.2.3. Polyphénols (Composés Phytochimiques)

Les polyphénols constituent une famille majeure d'antioxydants exogènes d'origine végétale, comprenant plus de 8000 composés répartis en plusieurs classes telles que les flavonoïdes (quercétine, catéchines), les acides phénoliques, les stilbènes (resvératrol) et les lignanes.

Ces composés phytochimiques, abondants dans les fruits, légumes, thé, café et vin rouge, exercent leurs effets antioxydants par divers mécanismes : piégeage direct des radicaux libres, chélation des métaux pro-oxydants.

Leur capacité à moduler les voies de signalisation cellulaire leur confère également des propriétés anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et cardioprotectrices. Cependant, leur biodisponibilité relativement faible et leur métabolisme complexe influencent significativement leur activité biologique dans l'organisme vivant (**Scalbert et Saltmarsh, 2005**).

Le **tableau 02** résume quelques composés phénoliques et leur source alimentaire

Tableau 02 : Classification des polyphénols (Manach et al., 2004).

Classe Principale	Sous-classe	Exemples	Sources Alimentaires
Flavonoïdes	Flavonols	Quercétine, Kaempférol, Myricétine	Oignon, pomme, thé, brocoli
	Flavones	Lutéoline, Apigénine	Persil, céleri, camomille
	Flavanones	Hespéridine, Naringénine	Agrumes
	Flavanols (Catéchines)	Épigallocatechine, Épicatéchine	Thé vert, cacao, raisin
	Anthocyanidines	Cyanidine, Delphinidine	Baies, cerises, aubergine
	Isoflavones	Génistéine, Daidzéine	Soja, légumineuses
	Acides Phénoliques	Acides benzoïques	Acide gallique, acide ellagique
Acides cinnamiques		Acide caféique, acide férulique	Café, céréales complètes
Stilbènes	-	Resvératrol, Ptérostilbène	Raisin, vin rouge, baies
Lignanes	-	Sécoisolaricirésinol, Matairésinol	Graines de lin, sésame
Autres	Tanins condensés	Proanthocyanidines	Pomme, raisin, chocolat

II.2.2.3.1. Effet Thérapeutique des Polyphénols via leur Activité Antioxydante

Les polyphénols exercent un effet thérapeutique majeur grâce à leur puissante activité antioxydante, qui leur permet de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN), réduisant ainsi le stress oxydatif impliqué dans de nombreuses pathologies.

En piégeant directement les radicaux libres (*scavenging*), en inhibant les enzymes pro-oxydantes (comme la NADPH oxydase) et en activant les voies de défense antioxydantes, les polyphénols protègent les cellules contre les dommages oxydatifs (Pandey & Rizvi, 2009).

Leur capacité à chélater les métaux transitionnels (Fe^{2+} , Cu^{+}), limite également la formation de radicaux hydroxyle ($\bullet OH$) via la réaction de Fenton.

Ces mécanismes expliquent leur rôle bénéfique dans la prévention et l'atténuation des maladies cardiovasculaires (en inhibant l'oxydation des LDL), des maladies neurodégénératives (en réduisant la neuroinflammation) et du vieillissement prématuré (en protégeant l'ADN et les mitochondries) (Scalbert et al., 2005). De plus, certains polyphénols, comme le resvératrol et la curcumine, agissent en synergie avec les antioxydants endogènes (SOD, glutathion), renforçant ainsi les défenses cellulaires. (Pandey et Rizvi, 2009).

II.3. Plantes médicinales antioxydantes

Les plantes médicinales constituent une ressource thérapeutique majeure depuis des millénaires, utilisées dans diverses médecines traditionnelles et validées par la science moderne pour leurs principes actifs. Environ 80 % de la population mondiale dépend des plantes pour des soins de santé primaires, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2023).

Les composés bioactifs, tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes et les terpènes, expliquent leurs effets pharmacologiques (Heinrich et al., 2023). Cependant, leur usage requiert une évaluation rigoureuse des bénéfices/risques, notamment concernant les interactions médicamenteuses (EMA, 2022). Les plantes restent ainsi un pont entre médecine ancestrale et innovation thérapeutique. (Fabricant et farnsworth , 2001)

Les plantes médicinales à activité antioxydante contiennent des composés antioxydants qui protègent les cellules contre les dommages oxydatifs. Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) et le thym (*Thymus vulgaris*) renferment des polyphénols tels que l'acide rosmarinique et le carvacrol, dont l'activité antioxydante a été démontrée. De même, les catéchines du thé vert (*Camellia sinensis*), en particulier l'épigallocatechine gallate (EGCG), présentent une capacité significative à piéger les radicaux libres. Ces propriétés pourraient contribuer à la prévention des maladies chroniques associées au stress oxydatif (Ghorbani et Esmaeilzadeh, 2020).

Chapitre III Calendula officinalis L.

III.1. Généralités

Calendula officinalis L. appartient au genre calendula de la famille des Asteraceae, qui comprend 15 espèces. Originaires du sud-ouest de la région méditerranéenne (**Gonçalves et al., 2018**). Elle est annuelle ou vivace avec une base ligneuse et peut atteindre 70 cm de hauteur (**Tutin et al., 1964**).

L'utilisation traditionnelle du *C.officinalis* L comme plante médicinale remonte au 12^e siècle. Cultivée par les Égyptiens, les Grecs, les Hindous et les Arabes. Elle doit son nom au mot latin « Calends », qui signifie le premier jour de chaque mois, en raison de sa longue période de floraison (**Kemper, 1999**).

Dans la région méditerranéenne, elle est traditionnellement utilisée comme plante médicinale contre les brûlures, les troubles cardiovasculaires, la nervosité et l'insomnie, les problèmes de foie et de jaunisse, les inflammations oculaires, les ulcères et les problèmes digestifs, les callosités cutanées et les verrues (**Salhi et al., 2019**).

Le principal constituant chimique de l'huile essentielle de calendula est l' α -cadinol (**Raal et al., 2019**). Plusieurs études phytochimiques ont révélé la présence de divers groupes chimiques dans *C. officinalis*, tels que des lipides (**Chisholm et Hopkins, 1967**) des terpénoïdes (**Vecherko et al., 1969**) des caroténoïdes (**Goowin, 1954**) des flavonoïdes des coumarines (**Olenikov, 2013**) et des quinones (**Janiszowska et Michalski et Kasprzyk, 1976**).

Plusieurs études ont été menées sur les effets biologiques du calendula, notamment les effets anti-inflammatoires (**Loggia et al., 1994**), cicatrisants et régénérateurs (**Fronza et al., 2009**), antimicrobiens (**Efstratiou et al., 2012**), anticancéreux (**Ukiya et al., 2006**), antigénotoxiques et génotoxiques (**Frankič, et Salobir et Salobir, 2009**), hépatoprotecteurs (**Cordova et al 2002**), neuroprotecteur (**Shivasharan et al., 2013**), cardioprotecteur (**Ray et al., 2010**) gastroprotecteur, (**Chandra et Kishore et Ghosh, 2015**), antioxydant (**Preethi et Kuttan et Kuttan, 2006**), spasmogène et spasmolytique (**Bachir et al., 2006**), anti-protozoaire (**Nikmehr et al., 2014**), anthelminthique (**Szakiel et al., 2008**), acaricide (**Godara et al., 2015**), antiviral (**Kalvatchev et Walder et Garzaro., 1997**), anti-âge (**Ahmad et Khan et Wahid.,2012**), photoprotecteur (**Mishra et Chattopadhyay, 2012**) et immunostimulant (**Varljen et Lipták et Wagner., 1989**)

III.2.Écologie et répartition géographique

C.officinalis L est originaire des régions méditerranéennes, où elle pousse naturellement dans le sud de l'Europe (Portugal, Espagne, Italie, Grèce et Balkans), en Afrique du Nord (Maroc, Tunisie, Libye) et au Proche-Orient (Turquie, Liban, Chypre).

L'espèce s'est largement naturalisée en Asie, notamment dans le sous-continent indien (Inde, Pakistan, Népal, Assam), en Asie centrale (Kazakhstan, Ouzbékistan, Tadjikistan), ainsi qu'en Chine (des régions du nord au sud-est, incluant le Tibet et le Xinjiang) et en Asie du Sud-Est (Vietnam, Philippines, Malaisie, Indonésie).

Dans les Amériques, elle a été introduite et se rencontre désormais aussi bien en Amérique du Nord (États-Unis, Canada, Mexique) qu'en Amérique du Sud (Argentine, Chili, Colombie, Pérou, Brésil). On la trouve également, bien que de manière plus localisée, dans certaines régions d'Afrique de l'Est (Éthiopie), en Australie et Nouvelle-Zélande, ainsi que sur plusieurs îles océaniques (Maurice, îles Juan Fernández). Cette large distribution témoigne de la grande adaptabilité écologique de l'espèce (López et al., 2010) (Fig 02).

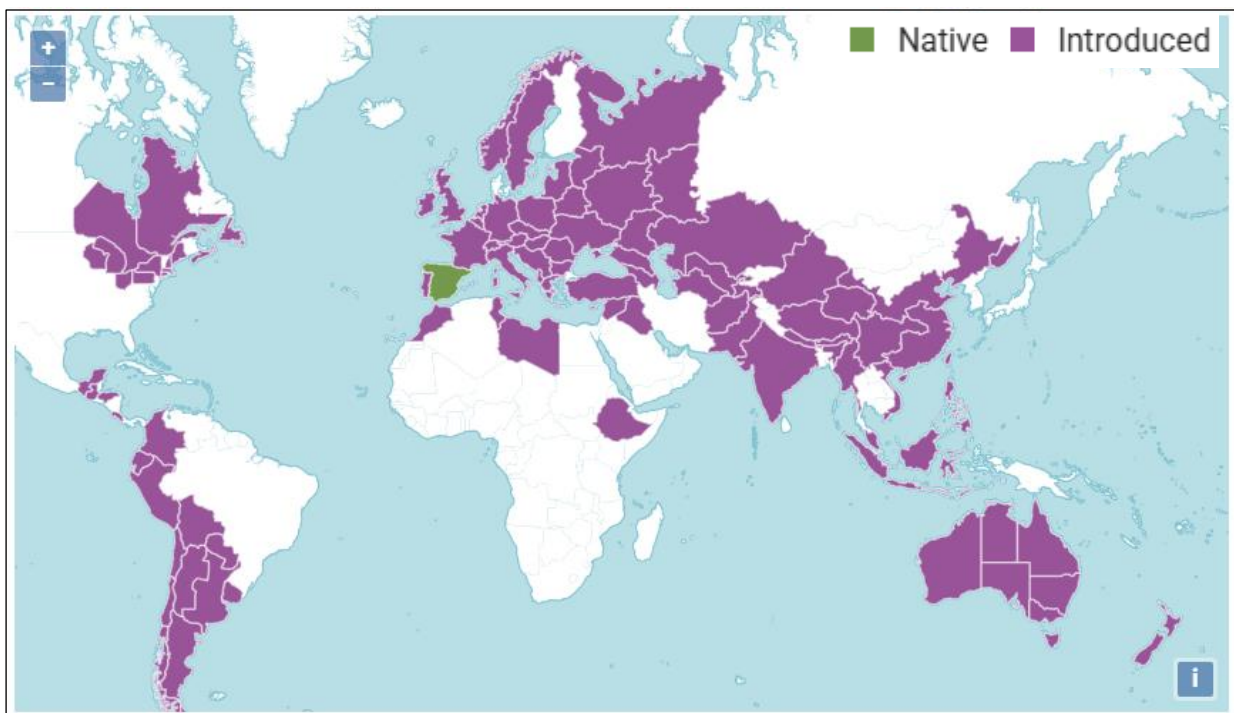


Figure 02 : Répartition mondiale de *Calendula officinalis* L. (López et al., 2010)

III.3. Taxonomie

Le genre *Calendula* comprend 15 espèces, dont *C. officinalis* et *C. arvensis* sont connues depuis longtemps. Avant 1753, les espèces de *Calendula* étaient répertoriées sous le nom de "Caltha"

(Gonçalves et al., 2018). La classification taxonomique actuelle de *C. officinalis* figure sur le tableau 03 par la classification botanique phylogénétique III (2009)

Tableau 03 : Classification taxonomique de *C. officinalis*. (Classification botanique phylogénétique III (2009))

Règne	Plantae
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Noyau des Dicotylédones vraies
Clade	Astéridées
Clade	Composées
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Sous-famille	Asteroideae
Tribu	Calenduleae
Genre	<i>Calendula</i>
Espèce	<i>Calendula officinalis</i> L., 1753

III.4. Description botanique

C.officinalis peut être annuelle ou vivace avec une base ligneuse. Les tiges mesurent 20-50 cm de long, sont dressées, diffuses ou étalées, très ramifiées et généralement feuillues presque jusqu'à l'apex (tutin et al., 1964).

Ces caractéristiques dépendent de l'endroit où la plante pousse, les plantes qui vivent à l'intérieur des terres et qui sont protégées des vents étant plus droites que celles qui poussent sur la côte et qui ont tendance à dépasser (Gonçalves et al., 2018). Les feuilles sont 7-14 cm, oblongues, étroitement obovales, oblongues ou globuleuses, brièvement acuminées ou obtuses, L'épaisseur des feuilles semble dépendre des conditions environnementales, les plantes poussant sur la côte ayant des feuilles plus courtes et plus épaisses que celles poussant à l'intérieur des terres, où les feuilles sont plus longues et plus fines (Gonçalves et al., 2018) .

Les capitules ont généralement un diamètre de 4 à 7 cm. Ligules souvent longues de 2 cm, au moins deux fois plus longues que les bractées, jaunes ou orange ; fleurs tubulaires généralement plus ou moins de la même couleur que les ligules, parfois brunâtres. Capitules en fruits avec ou sans rangée extérieure d'akènes courbés (ou rarement ouverts), à bec étroit, de 2-2,5 cm de long, alternant avec des akènes beaucoup plus courts, cylindriques (rarement trifoliolés) (Tutin et al., 1964) (Fig 03).

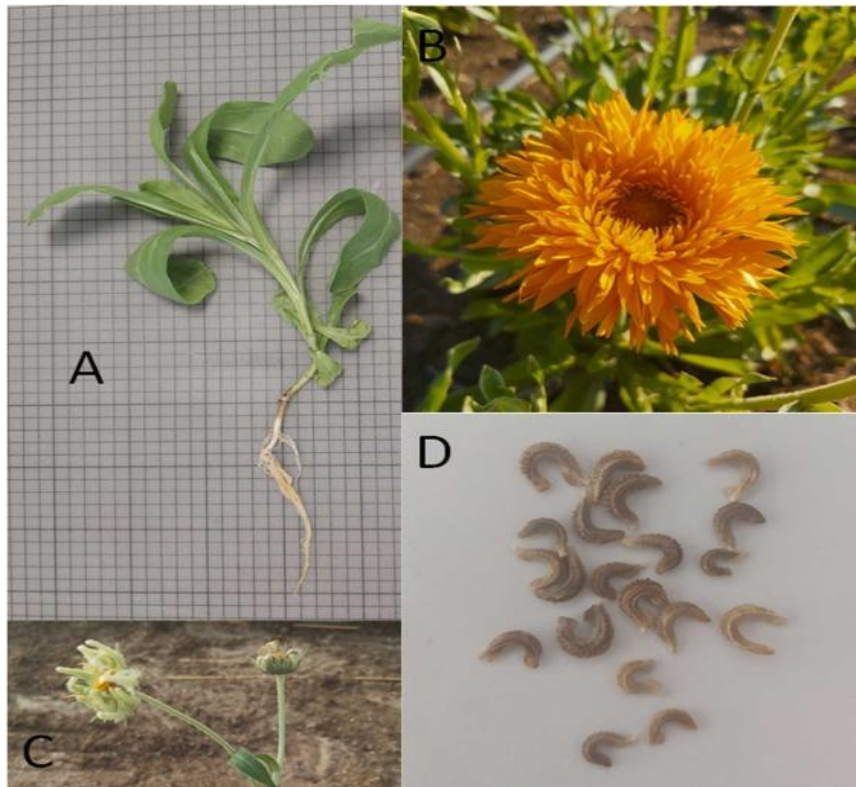


Figure. 03 : Caractéristiques morphologiques de *C.officinalis* L. Feuilles (A), inflorescence (B), akènes (C, D) (Tutin et al., 1964).

III.5. Composition phytochimique

III.5.1. Composition nutritionnelle

Les études sur la valeur nutritionnelle et la composition des fleurs de *C.officinalis* L. on rapportées que les teneurs en matières grasses, en protéines et en cendres étaient respectivement de 5,33 %, 6,43 % et 8,93 %, tandis que la teneur totale en glucides était de 81,32 %. Le pourcentage d'acides organiques était de 3,98 % et la teneur en sucres solubles, de 3,61 %, se composait principalement de saccharose et de fructose, suivis de glucose.

La teneur en acides gras saturés, en acides gras monoinsaturés et en acides gras polyinsaturés était respectivement de 40,70 %, 1,79 % et 57,51 %, tandis que la teneur en tocophérols était de 60,88 %, principalement constituée d' α -tocophérol (Pires et al., 2016) (Tab 04).

Tableau 04 : Contenu nutritionnel de *C.officinalis* L. (Pires et al., 2016)

matières grasses	5.33 %
protéines	6.43%
cendres	8.93%
Glucides	81.32%
Sucres solubles	3.61%
acides gras saturés	40.70%
acides gras monoinsaturés	1.79%
acides gras polyinsaturés	57.51%
tocophérols	60.88%

III.5.2. Lipides

Plusieurs acides gras présents dans les plantes de *C.officinalis* ont été identifiés et décrits dans des études. **Chisholm et Hopkins,1960** ont isolé un acide triénoïque conjugué à partir de l'huile de graine de *C.officinalis* extraite avec de l'éther de pétrole dans un Soxhlet. L'acide isolé a été identifié comme étant l'acide trans, 8 : trans, 10 : cis, 12-octadécatriénoïque et a été nommé acide calendique. L'acide calendique est l'un des principaux acides gras de l'huile de graine de *C.officinalis* L de 17 espèces étudiées, allant de 38,9 % à 58,4 %, et il est synthétisé en permanence, atteignant une concentration maximale à la maturité de la graine.

III.5.3. Huiles essentielles

Il existe plusieurs études sur l'isolement et la caractérisation de l'huile essentielle de *C.officinalis* L à partir de plantes provenant de différentes régions et utilisant différentes techniques. (**Raal et al.,2016**) ont isolé l'huile essentielle à partir d'inflorescences séchées de 8 cultivars de *C.officinalis* L poussant en Estonie par la méthode d'hydrodistillation. La durée de distillation était de 4 heures et le rendement en huile variait de 0,10 % à 0,43 %.

L'huile essentielle a été analysée par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS), et les principaux constituants chimiques des huiles ont été déterminés comme étant l' α -cadinol (18,4-32,0 %), le γ -cadinène (9,7-18. 9 %), viridiflorol (2,0-10,0 %), τ -cadinol (4,7-7,9 %), δ -cadinol (3,3-5,6 %) et γ -muurolène (0,8-5,1 %). L' α -cadinol a également été identifié précédemment comme un constituant majeur de l'huile essentielle de *C.officinalis* L.

III.5.4. Composants phytochimiques

Plusieurs études phytochimiques portant sur la composition chimique du *C.officinalis* ont été réalisées au fil des ans, révélant plusieurs classes chimiques d'une grande importance pharmacologique, telles que les terpénoïdes, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les coumarines et les quinones.

III.5.4.1. Terpénoïdes

La calendula est riche en terpénoïdes qui ont été isolés et identifiés dans le cadre de plusieurs études. **Vecherko et al. (1969)** ont isolé 8 glycosides triterpéniques de *C.officinalis* L, qui ont été nommés calendulosides A, B, C, D, E, F, G et H, par ordre croissant de polarité. Un nouvel ester de glycoside sesquiterpénique nommé viridiflorol-10-O- β -quinovopyranoside-2-O-(3-méthyl-2-pentenoate) avec des propriétés anti-protazoaires a été récemment isolé à partir de fleurs de calendula.

III.5.4.2. Caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes des fleurs de *C.officinalis* L varie de 0,20 % à 3,51 % et dépend de la variété de la plante, de la couleur des fleurs ligulées et tubulaires, de la société importatrice des graines et de facteurs environnementaux tels que l'époque et le lieu de culture (**Raal et al., 2009**). **Goodwin, (1954)** a identifié 6 caroténoïdes dans les pétales de *C.officinalis*, à savoir le phytofluène, le β -carotène, le γ -carotène, le pigment X, le ζ -carotène et le lycopène, et les xanthophylles : flavochrome, mutatochrome, lutéine, flavoxanthine et maxanthine de chrysanthème.

III.5.4.3. Flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes du *C.officinalis* L varie de 0,21 % à 0,68 % et dépend du cultivar utilisé ainsi que de la période et du lieu de culture (**Raal et Kirsipuu, 2011**). **Komissarenko et Chernobai et Derkach (1988)** ont examiné la composition en flavonoïdes du *C. officinalis* et ont isolé la quercétine, l'isorhamnétine, la quercitrine, l'isorhamnétine 3-glucoside et la narcissine, ainsi que trois nouveaux flavonoïdes nommés calendoflaside, calendoflavoside et calendoflavobioside. Plusieurs autres flavonoïdes isolés du souci comprennent la manghasline, la rutine, l'isoquercitrine, la quercétine-3-O-(2''-ramnosyl)-rhamnoside, quercétine-3-O-(6''-acetyl)-glucoside, typhaneosidem, isorhamnétine-3-O-(6''-acetyl)-glucoside, calendoflaside

III.5.4.4. Coumarines

Un certain nombre de coumarines ont été isolées à partir de *C.officinalis* L, notamment l'ombelliférone, l'aesculetin, l'aesculine, la cichoriine, la scopolétine (**Olennikov et Kashchenko, 2013**) et le scopolétine-7-O-glucoside (**Rigane et al., 2013**).

III .5.4.5. Quinones

Certaines des quinones présentes dans le *C.officinalis* ont été identifiées comme étant la plastoquinone, la phylloquinone, l' α -tocophérol, l'ubiquinone (**Janiszowska et Michalski et Kasprzyk, 1976**), l'ubiquinone-9, l' γ -tocophérol, le 7-méthyltolcol, le 8-méthyltolcol, l' α -tocophérolquinone, la γ -tocophérolquinone, la 5-phytyltoluquinone et la 6- phytyltoluquinone (**Janiszowska et Rygier ,1985**)

III.6. Activités biologiques

L'utilisation traditionnelle du *C.officinalis* L contre divers troubles de la santé et maladies a donné lieu à des études approfondies et à des essais cliniques sur ses activités pharmacologiques et son mode d'action.

III.6.1. Activité anti-inflammatoire

L'administration orale de 250 et 500 mg/kg de poids corporel à des souris a entraîné une inhibition de 50,6 % et 65,9 % de l'œdème de la patte induit par la carragénine et une inhibition de 41,9 % et 42,4 % de l'inflammation provoquée par le dextrane, respectivement. Cet effet anti-inflammatoire est probablement dû à l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires et de la cyclooxygénase-2 (**Preethi et Kuttan, 2009**).

III.6.2. Activité de guérison et de régénération

Les fibroblastes sont importants dans le processus de cicatrisation car ils sont impliqués dans plusieurs processus, tels que la dégradation du caillot de fibrine et son remplacement par la matrice extracellulaire (MEC) et la formation de structures de collagène (**Bainbridge, 2013**). Dans une étude portant sur l'effet cicatrisant du *C.officinalis* L sur les fibroblastes de souris, il a été rapporté que les extraits hexaniques des fleurs de la plante à des concentrations de 1 et 10 μ g/ml augmentaient le nombre de fibroblastes de 50,76 % et 64,35 %, tandis que les extraits éthanoliques les augmentaient de 60,80 % et 70,53 %, respectivement (**Fronza et al., 2009 ; Hormozi et al .,2019**).

III.6.3. Activité antimicrobienne

L'application d'extraits méthanoliques et éthanoliques de fleurs de *C.officinalis* a montré une activité antifongique contre certaines espèces du genre *Aspergillus* et *Candida*, ainsi qu'une

activité antibactérienne, l'extrait méthanolique ayant un effet plus important contre les bactéries testées (Efstratiou et al., 2012). Une activité antibactérienne similaire a également été rapportée pour les extraits de feuilles de *C. officinalis* contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Sarcina lutea* et *Bacillus subtilis* (Shahen et al., 2019). Des extraits méthanoliques de fleurs de *C. officinalis* ont inhibé la croissance de certaines bactéries parodontales anaérobies et aérobies facultatives isolées chez des patients atteints de parodontite (Iauk et al., 2003).

III.6.4. Activité anticancéreuse

Ukiya et al., 2006 ont rapporté que deux des glycosides triterpéniques isolés des fleurs de *C. officinalis*, à savoir le calenduloside F 6'-O-n-butyl ester et le calenduloside G 6'-O-méthyl ester, ont montré une puissante activité cytotoxique contre le cancer du côlon humain, la leucémie et les cellules cancéreuses de mélanome *in vitro*. Dans une étude, l'effet du souci sur la métastase des cellules de mélanome B16F-10 chez la souris a été examiné, et il a été rapporté que ses extraits réduisaient les nodules tumoraux du poumon de 74 % et augmentaient l'espérance de vie des souris de 43.3 % (Preethi et al., 2010), tandis qu'un effet similaire contre les lignées cellulaires de mélanome a été observé à partir de la fraction d'acétate d'éthyle des extraits éthanoliques en raison de l'inhibition de l'expression de la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP-2) due à la suppression de la voie de signalisation de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) (Xuan et Park, 2019).

III.6.5. Activité hépatoprotectrice

La fraction butanolique des extraits de fleurs de *C. officinalis* a montré une activité antioxydante en réduisant les concentrations de radicaux superoxyde et hydroxyle, tandis que l'application de la fraction à une concentration de 0,5 mg/ml a montré une activité hépatoprotectrice en inhibant la peroxydation lipidique des microsomes de foie de rat (Cordova et al., 2002). Des propriétés similaires ont été observées pour les extraits éthanoliques et aqueux liant les radicaux 2,2-diphényl-1'-picrylhydrazide (DPPH), le premier montrant une meilleure activité antioxydante et hépatoprotectrice (Hamzawy et al., 2013).

III.6.6. Activité neuroprotectrice

Les extraits floraux méthanoliques de *C. officinalis* ont montré une activité neuroprotectrice contre la neurotoxicité induite par le glutamate monosodique chez les rats en réduisant de manière significative les changements comportementaux, le stress oxydatif et les dommages à l'hippocampe (Shivasharan et al., 2013). Une activité similaire contre la neurotoxicité induite par l'acide 3-nitropropionique chez les rats a été rapportée pour les extraits floraux méthanoliques, qui ont réduit de manière significative les changements comportementaux,

les dommages oxydatifs et la perte de neurones striataux lorsqu'ils sont administrés par voie orale à des doses de 100 et 200 mg/kg par jour (Shivasharan et al., 2013). Des doses de 100, 200 et 300 mg/kg d'extraits de fleurs de *C.officinalis* L ont montré une activité neuroprotectrice contre la maladie d'Alzheimer induite par le chlorure d'aluminium chez des rats Wistar, la dose la plus élevée étant la plus puissante (Jasoria et al., 2024 ; Zhang et al., 2024).

III.6.7. Activité gastroprotectrice

Les extraits éthanoliques de *C.officinalis* ont montré des effets gastroprotecteurs lors de tests sur des rats en augmentant les niveaux de mucus et de glutathion (GSH) tout en diminuant les concentrations de pepsine (Chandra et Kishore et Ghosh, 2015). Des extraits méthanoliques de fleurs de *C.officinalis* ont inhibé les lésions gastriques induites par l'éthanol chez des souris après administration orale de 100 et 200 mg/kg, tandis que la fraction soluble dans le 1-butanol a produit une inhibition complète. Les deux inhibent également complètement les lésions gastriques induites par l'indométhacine (Yoshikawa et al., 2001).

III.6.8. Activité immunostimulante

Trois polysaccharides isolés des fleurs de *C.officinalis* ont montré une activité immunologique dans des essais in vitro avec des granulocytes. À des concentrations de 10^{-5} et 10^{-6} PS -I, la phagocytose a atteint 40 et 57 %, PS-II 20-30 %, tandis que PS-III a eu une phagocytose de 54 et 100 % (Varljen et Lipták et Wagne., 1989) .

III.7. Toxicité

L'utilisation de *Calendula .officinalis* L est généralement considérée comme sûre. Les études *in vitro* n'ont pas révélé d'effets toxicologiques graves. L'huile essentielle de *C. officinalis* n'a montré aucun effet toxique ou indésirable lors de tests de toxicité cutanée aiguë et subchronique pour des doses de 20 ml/kg et jusqu'à 10 ml/kg pendant 90 jours, respectivement (Mishra et Chattopadhyay., 2018)

Les extraits hydroxylés de *C. officinalis* n'ont pas montré de toxicité dans les tests de toxicité aiguë à des doses allant jusqu'à 5 g/kg et subaiguë à des doses allant jusqu'à 1 g/kg pendant 30 jours respectivement, mais on a observé une augmentation des taux d'azote uréique sanguin et d'alanine transaminase (Silva et al., 2002).

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

L'étude expérimentale a été effectuée au niveau du laboratoire de recherche « Pharmacognosie & Api-Phytothérapie » de l'université de Mostaganem.

IV.1. Matériel végétal

Le matériel biologique a porté sur les fleurs de *Calendula officinalis* L. Cette plante a été cultivée sur le territoire de l'université de Presov en Slovaquie, sans utilisation de pesticides ni d'énergie industrielle (**Fig 04**).



Figure 04 : (A) *C. officinalis* conditionnée (B). Les fleurs de *C. officinalis*

IV.2. Préparation des extraits

La méthode d'extraction employée repose sur une macération utilisant deux solvants de polarités distinctes : l'eau et l'éthanol 96°C à 70%. Dans un premier temps, la matière végétale séchée est macérée dans de l'eau distillée pendant 24 heures sous agitation orbitale à température ambiante et dans l'obscurité, permettant l'extraction des composés hydrosolubles. Suivie d'une filtration à l'aide de papier Whatman N°4 et une lyophilisation afin de conserver l'extrait aqueux obtenu.

Une autre macération est ensuite soumise à une seconde macération dans de l'éthanol 96°C à 70% (30%/70%, V/V), un solvant hydroalcoolique offrant une meilleure solubilisation des composés de polarité intermédiaire (alcaloïdes, flavonoïdes, terpénoïdes). Cette étape, également suivie de filtration (Whatman N°4) et d'évaporation sous pression réduite à 40°C, fournit l'extrait hydroéthanolique. Cette approche bipolaire permet une extraction plus exhaustive des métabolites secondaires en exploitant la complémentarité des solvants, tout en limitant les interactions indésirables entre molécules de polarités différentes (**Fig 05**).

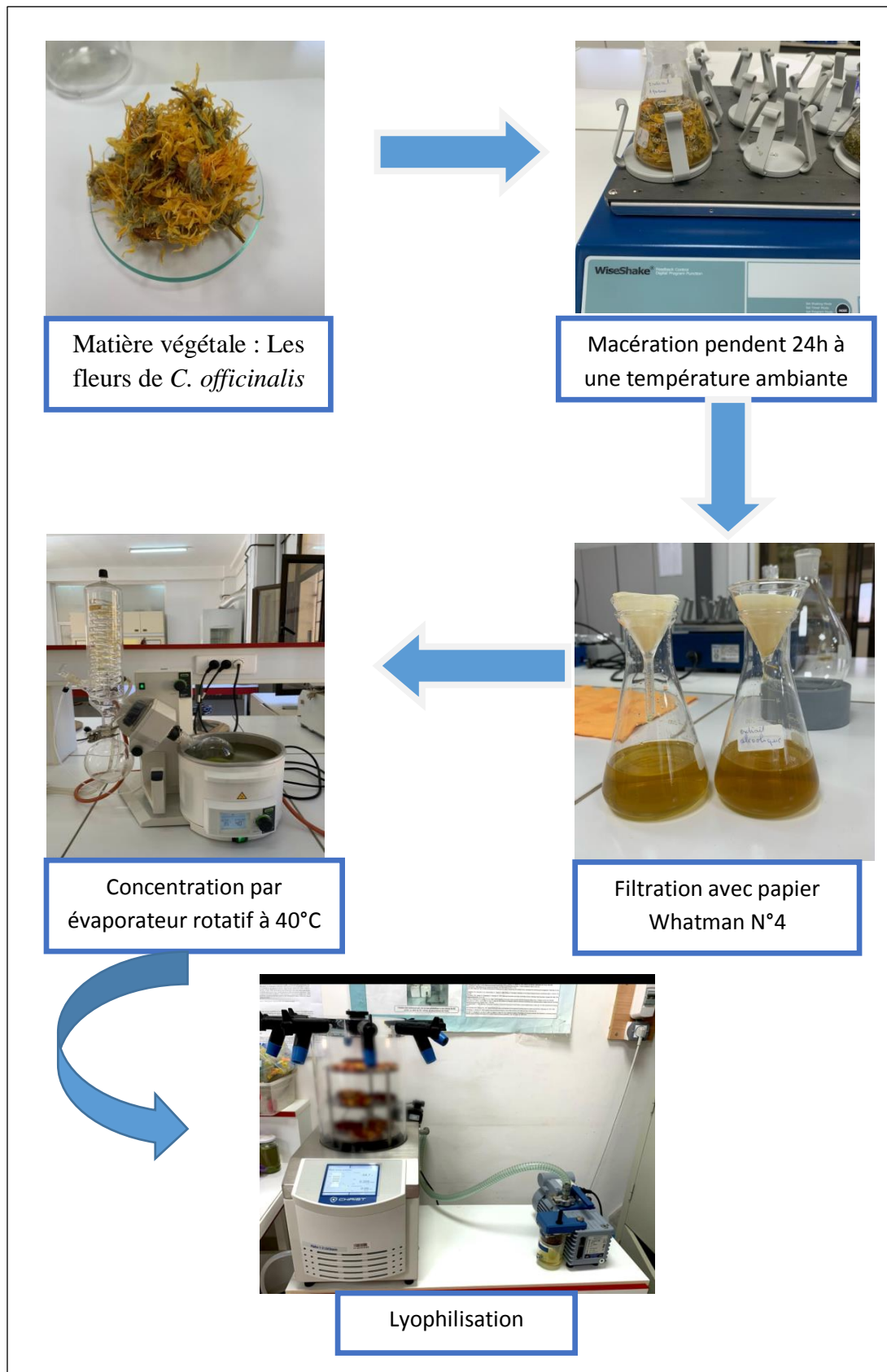


Figure 05 : Schéma récapitulatif de l'extraction aqueuse et hydro-éthanolique

IV.3. Analyses phytochimiques

IV.3.1. Analyses qualitatives (Screening phytochimique)

IV.3.1.1. Polyphénols

Le teste de chlorure de fer permet la détection des composés phénoliques présents dans l'extrait étudié. Il consiste à mélanger 1 ml d'extrait avec 1 ml d'acide chlorhydrique (HCL) à 2% puis ajouté quelques gouttes de (FeCl₃) à 3%. Une coloration verdâtre indique la présence des polyphénols (Nguessan *et al.*, 2009).

IV.3.1.1. Tanins

Deux tests ont été retenus

- a) Test de Chlorure de fer : mélanger 1 ml de chaque extrait, avec 1 ml de solution de FeCl₃ à 3%. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques. L'apparition d'une coloration bleu noir indique la présence des tanins galliques (Diallo, 2005).
- b) Teste de Stiasny : mélanger 10 ml d'extrait avec 5 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol et 5 ml de HCL) suivi d'un chauffage au bain marié à 90°C pendant 15min. La présence d'un précipité rouge indique la présence des catéchiques, suive d'une neutralisation du surnageant avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) et quelques gouttes de FeCl₃. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre confirme la présence des tanins galliques (Diallo, 2005).

IV.3.2. Caractérisation quantitative des polyphénols

IV.3.2.1. Dosage des phénols totaux

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.

➤ Principe

Principe Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot & Charpentier, 2006).

➤ **Méthode**

20 µL de chaque extrait est induit dans les tubes à essai et ajouté 680 µL d'eau distillée, ensuite 400 µL de réactif Folin-Ciocalteu à 0,5 N (10%) et 400 µL de solution de carbonate de sodium (10%) ont été additionnés au mélange, le tout est agité par un vortex.

Le mélange obtenu est laissé incubée dans l'obscurité à température ambiante pendant 120 minutes, l'absorbance est mesurée à 760nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV.

IV.3.2.2. Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline (**Julkunen-Tito, 1985**)

➤ **Principe**

Dans cette méthode les tanins condensés se dépolymérisent en présence d'acide concentré (HCL) et se transforment en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline

➤ **Méthode**

Une prise de 50 µL d'extrait est ajoutée à 750 µL de vanilline à 4% et 375 µL d'acide chlorhydrique concentré (HCL) est additionnés par la suite après une homogénéisation, le mélange est mis en incubation à température ambiante pendant 20 minutes, l'absorbance est mesurée contre un blanc à 550 nm

La teneur en tanins condensés, déterminées en se référant à une gamme étalon de catéchine sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de lyophilisat (mg EC/g).

IV.3.2.3. Dosage des tanins hydrolysables

La teneur en tanin hydrolysable des extraits étudiés a été déterminée selon la méthode de (**Bouss et al., 2006**)

➤ **Principe**

La réaction entre l'iodate de potassium (KIO₃) et les tanins hydrolysables est une réaction d'oxydoréduction KIO₃ en I₂ (iode moléculaire), forme un complexe coloré rose visible

➤ **Méthode**

Un volume de 1ml d'extrait est ajouté à 5ml d'une solution aqueuse de KIO₃ (2,5%), l'absorbance a été mesurée à 550nm après une incubation de 4mn à température ambiante. La concentration des tanins hydrolysables est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de lyophilisat à partir de la courbe d'étalonnage

IV.4. Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante

IV.4.1. Piégeage des radicaux libres DPPH

➤ Principe

Le test DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante.

En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (Molyneux, 2004). Le changement de couleur peut être suivie par spectrophotométrie à 517nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée (Popovici *et al.*, 2010 ; Molyneux, 2004) (Fig 06).

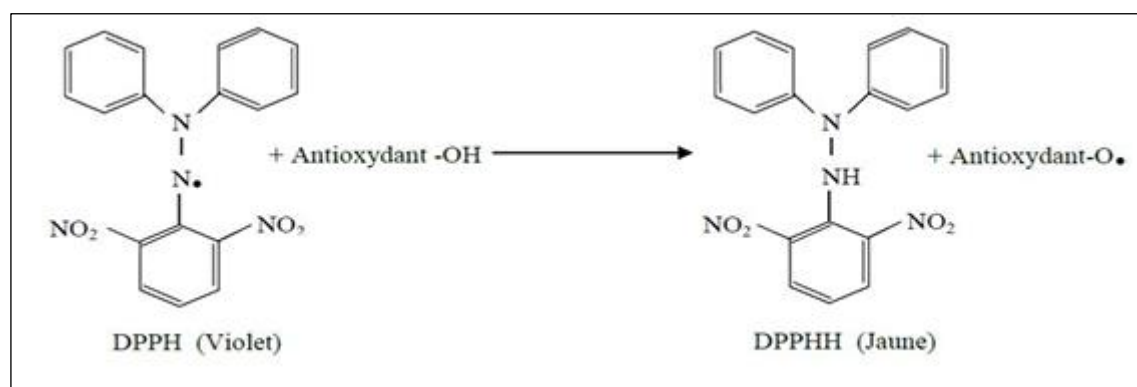


Figure 06 : Equation du radical DPPH transformé en DPPH (Talbi *et al.*, 2015).

➤ Méthode

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0,024 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

IV.4.2. Pouvoir réducteur FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

➤ Principe

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés (Ou *et al.*, 2001).

La présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung *et al.*, 2002). En effet, le système FeCl₃/K₃Fe(CN)₆ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination «semi quantitative» des concentrations des antioxydants, qui participent à la réaction redox (Amarowicz *et al.*, 2004) (Fig 07).

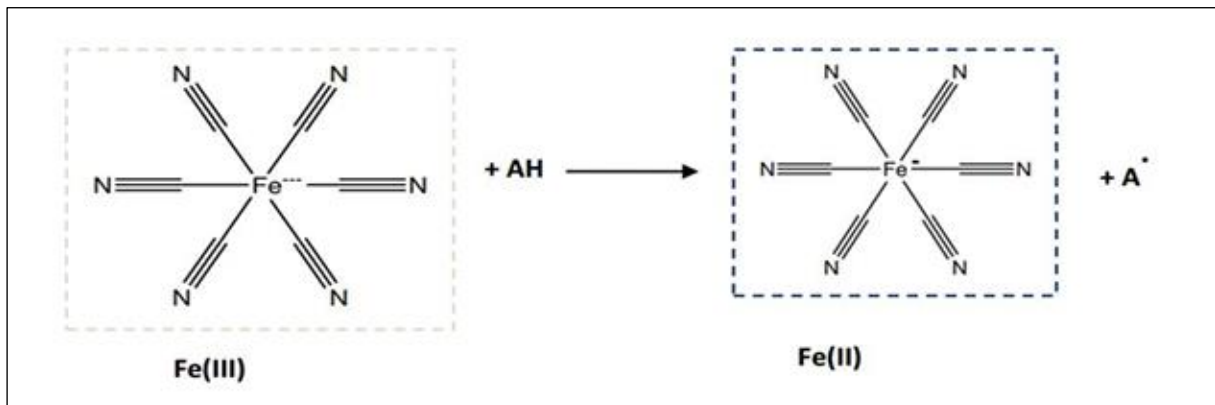


Figure 07 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH)

➤ Méthode

Préparation des réactifs : Commencez par préparer un tampon acétate (300 mM, pH 3,6) en dissolvant 3,1 g d'acétate de sodium dans 500 ml d'eau distillée, en ajoutant 16 ml d'acide acétique, en ajustant à 1 litre et en vérifiant le pH. Préparez ensuite la solution de HCl (40 mM) en diluant 1 ml de HCl 1 M dans 25 ml d'eau distillée. Préparez ensuite la solution de TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) en dissolvant 32 mg de TPTZ dans 10 ml de 40 mM HCl. Préparez ensuite la solution de FeCl₃·6H₂O (20 mM) en dissolvant 54 mg de FeCl₃·6H₂O dans 10 ml d'eau distillée. Préparez ensuite le réactif FRAP en mélangeant 25 ml de tampon acétate, 2,5 ml de TPTZ et 2,5 ml de FeCl₃·6H₂O (ratio 10:1:1), puis chauffez à 37 °C avant utilisation.

Pour la gamme standard (FeSO₄·7H₂O), préparer une solution mère (2200 µmol/L) en dissolvant 0,61 g de FeSO₄·7H₂O dans 1 L d'eau distillée, puis diluer pour obtenir des concentrations de 1100, 440, 330, 220 et 165 µmol/L.

Incuber 1,5 mL de réactif FRAP avec 50 µL d'extrait à 37 °C pendant 5 minutes et mesurer immédiatement l'absorbance à 594 nm par rapport à un blanc (réactif FRAP + solvant) à l'aide d'un spectrophotomètre.

obtenir une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm. Pour le test, 2 970 μL de la solution ABTS⁺⁺ diluée sont mélangés avec 30 μL de l'extrait de plante à la concentration souhaitée. Après 6 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 734 nm. Les résultats sont exprimés en équivalents Trolox (TEAC) en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec des solutions de Trolox de concentrations connues.

IV.4.4. Capacité antioxydante totale (CAT)

➤ Principe

La capacité antioxydante totale (CAT) ou l'activité réductrice du molybdate des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène proposée par **Prieto et al. (1999)** avec de légères modifications

Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de molybdène présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{-2} à molybdène MoO^{+2} en présence de l'antioxydant pour former un complexe vert de phosphate dans un milieu acide (**Prieto et al., 1999**).

➤ Méthode

Le protocole expérimental consiste à mélanger 300 μL d'extrait dilué avec 3 mL de solution réactive contenant de l'acide sulfurique 0.6 M, du phosphate de sodium 28 mM et du molybdate d'ammonium 4 mM. Les tubes scellés sont ensuite incubés à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 695 nm en utilisant comme blanc un mélange de 3 mL de solution CAT et 300 μL d'eau distillée ayant subi le même traitement. Parallèlement, une courbe d'étalonnage est établie dans des conditions identiques en utilisant de l'acide ascorbique comme standard. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide ascorbique par gramme de lyophilisat (mg EAA/g), permettant ainsi de quantifier le pouvoir antioxydant total des échantillons testés.

Résultats

V.1. Analyses phytochimiques qualitatives (screening phytochimique)

Dans le but de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires, des tests physico-chimiques qualitatifs spécifiques fondés sur des réactions de coloration et de précipitation ont été effectués.

Les résultats affichés sur la figure et le tableau ci-dessous (**Fig 09, Tab 05**) ont montrés globalement la très forte présence des phénols totaux dans les deux extraits aqueux et hydro-éthanolique de *C.officinalis*. Toutefois, les tanins catéchiques ont révélés une très forte présence dans l'extrait alcoolique, avec la réaction de Stiany et le $FeCl_3$. Tandis que l'extrait aqueux a montré une forte présence avec la réaction Stiasny. Cependant, ce dernier s'est imposé avec une très forte présence des tanins hydrolysables avec la réaction de $FeCl_3$, qui n'a révélé qu'une forte présence avec l'extrait hydro-éthanolique.

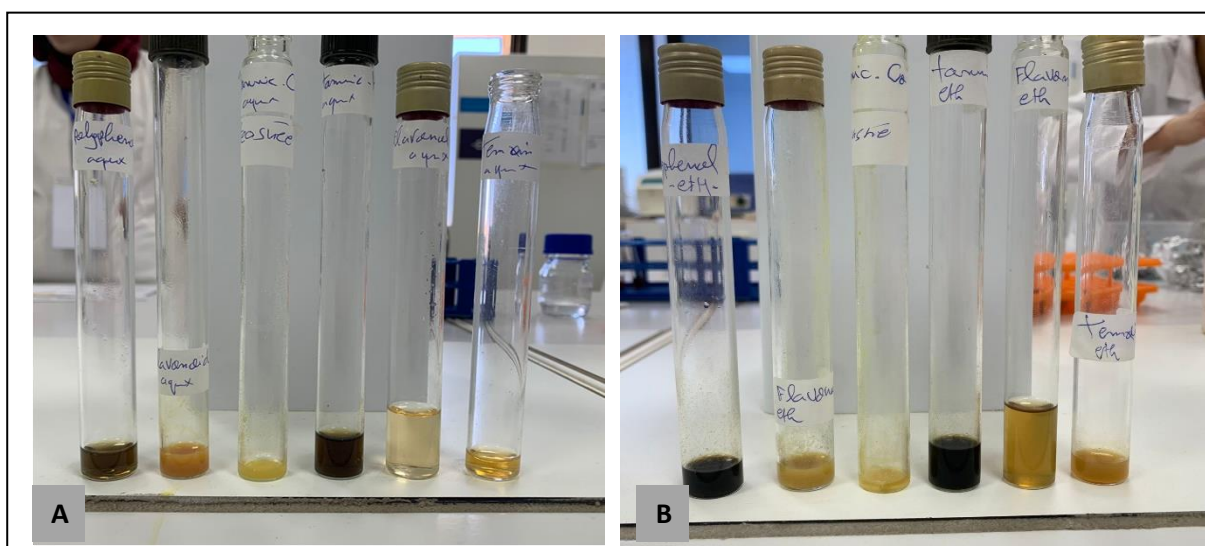


Figure 09 : Analyses phytochimiques qualitatives pour les extraits (A) aqueux et (B) hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante *Calendula officinalis* L.

Tableau 05 : Analyses phytochimiques qualitatives pour les extraits aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante *Calendula officinalis* L.

(+++): Très forte présence, (++) : Forte présence, (-) : Absence

Les extraits	Polyphénols totaux	Tanins (fecI3) catéchiqes	Tanins (fecI3) hydrolysables	Tanins (Stiasny) Catéchiqes	Tanins (stiasny) Hydrolysables
Hydro-éthanolique	+++	+++	++	+++	+
Aqueux	+++	+++	+++	++	+
observation	Couleur Verdâtre	Verdâtre	noirâtre	précipité rouge	Surnageant Bleu-noirâtre

V.2. Analyses phytochimiques quantitatives

V.2.1. Détermination de la teneur en phénols totaux

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique obtenue est illustrée sur la **figure 10**. L'équation linéaire de régression utilisée est $y=1,6151x-0,0103$, avec un coefficient de détermination de $R^2=0,995$.

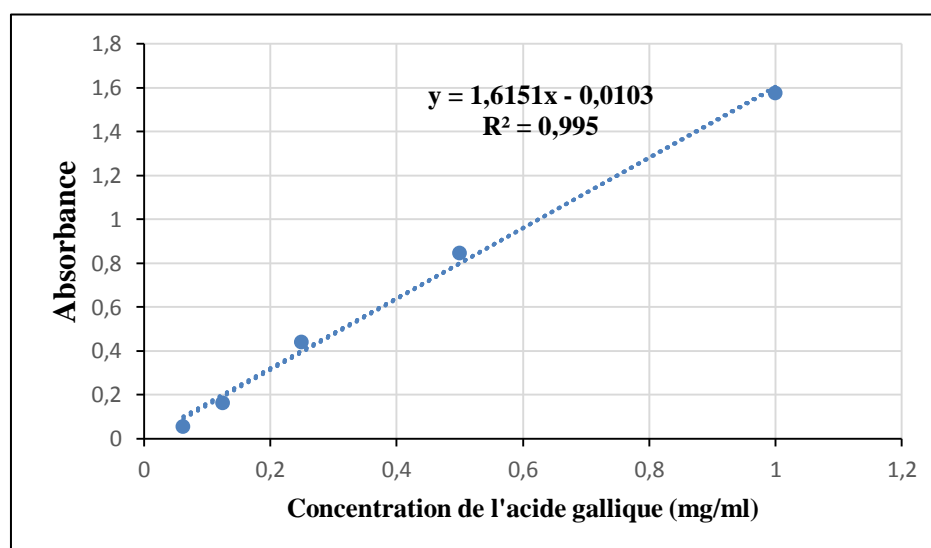


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les concentrations obtenues à partir des lyophilisats aqueux et hydro-éthanolique de *C. officinalis* ont révélés des valeurs de l'ordre de 0,26 mgEAG/g Lyophilisat et 3,293 mgEAG/g Lyophilisat respectivement (**Tab 06**).

Tableau 06 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante *Calendula officinalis* L.

Extraits	Aqueux	Hydro éthanolique
Teneur en phénols totaux mgEAG/g Lyophilisat	0,26±0,02	3,293±0,262

Les valeurs ont été représentées par les moyennes \pm SD (n=3).

L'extrait éthanolique de *C. officinalis* a enregistré une concentration des polyphénols significativement élevée par rapport à l'extrait aqueux (**Fig 11**)

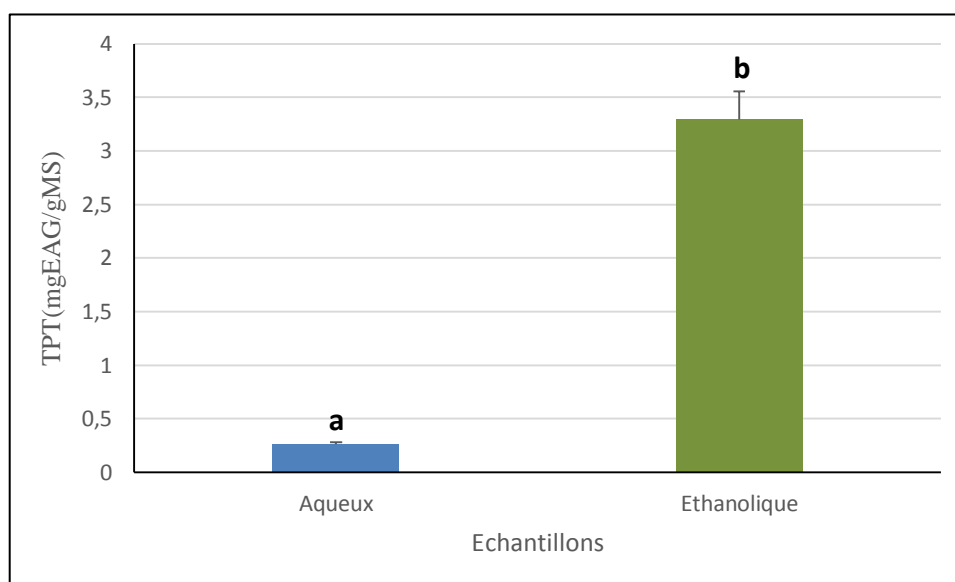


Figure 11 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits Aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante *Calendula officinalis* L. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs

V.2.2. Détermination de la teneur en tanins condensés

La teneur en tanins condensés est exprimée en milligrammes équivalents catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/gMS). L'équation de la courbe de régression linéaire est la suivante : $y = 2,5039x$, avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0,9908$ (**Fig 12**).

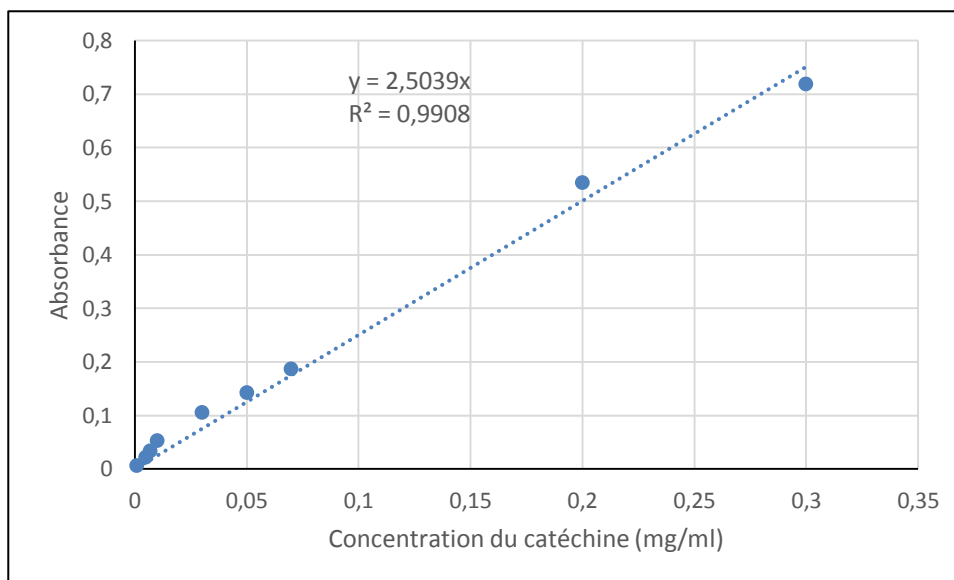


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la catéchine

Les teneurs des tanins condensés obtenues de 0,014 mgEQU/g Lyophilisat et 0,082 mgEQU/g Lyophilisat sont attribuées respectivement aux extraits aqueux et hydro-éthanoliques de la plante *Calendula officinalis* L. (**Tab 07**).

Tableau 07 : Teneurs en tanins condensés dans les extraits Aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante *Calendula officinalis* L.

Extraits	Aqueux	Hydro-éthanolique
Teneur en Tanins condensés mgEQU/g Lyophilisat	0,014±0,008	0,082±0,02

Les valeurs ont été représentées par les moyennes \pm SD (n=3).

Le macérât hydro-éthanolique a enregistré a affiché une valeur significativement élevée comparativement à l'extrait aqueux de *C.officinalis* L (**Fig 13**).

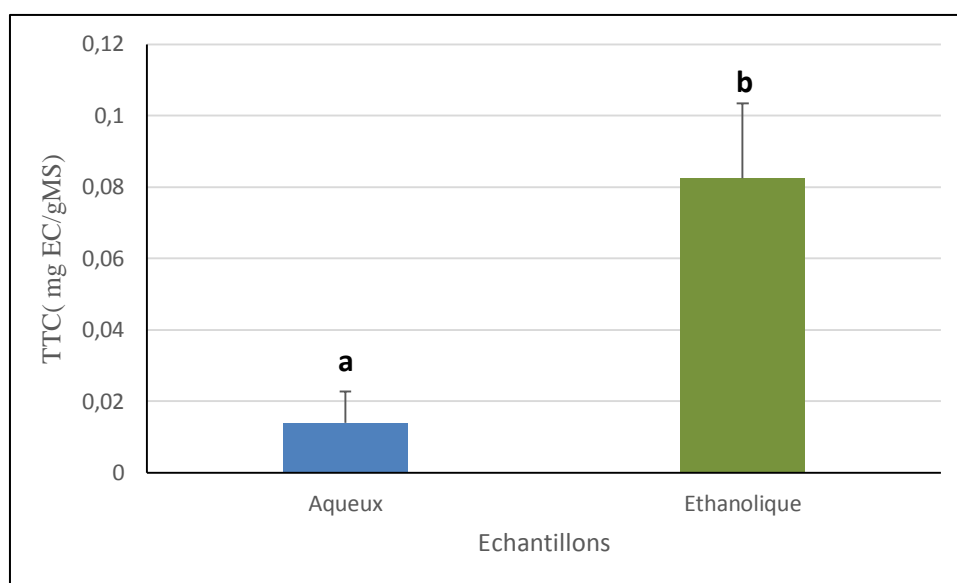


Figure 13 : Teneurs tanins condensés dans les extraits Aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante *Calendula officinalis* L. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs

V.2.3. Détermination de la teneur en tanins hydrolysables

La teneur en tanins hydrolysable a été exprimée en milligrammes équivalents d'acide tannique par gramme de matière sèche (mgEAT /g Lyophilisat). L'équation obtenue de la courbe de régression linéaire est comme suite : $y = 0,1673x + 0,0384$, avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,9978$ (**Fig 14**).

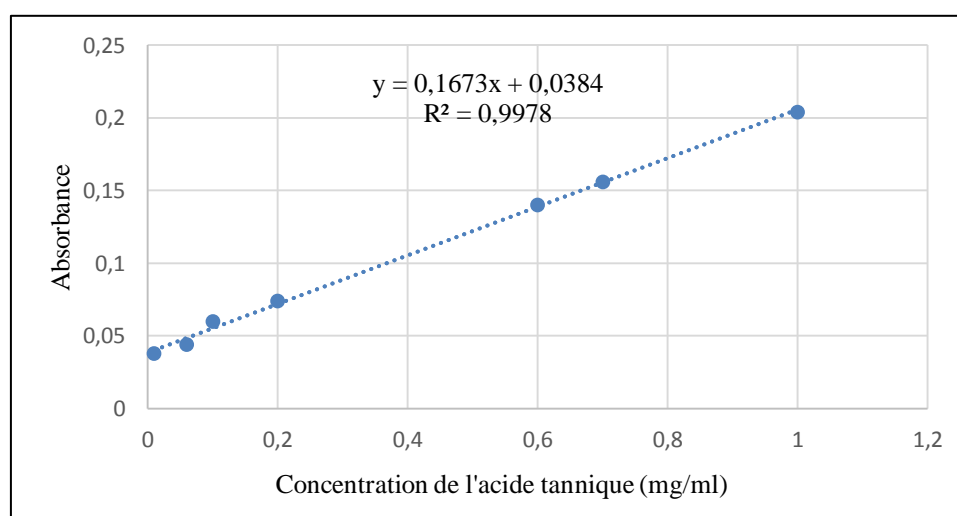


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique

Les valeurs notées pour les teneurs en tanins hydrolysables sont affichées sur le tableau suivant (**Tab 08**). 1,203 mgEAT/g Lyophilisat pour l'extrait aqueux et 0,121 mgEAT/g Lyophilisat pour l'extrait hydro-éthanolique de *Calendula officinalis* L.

Tableau 08 : Teneurs en tanins hydrolysables dans les extraits aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante *Calendula officinalis* L.

Extraits	Aqueux	Hydro-éthanolique
Teneur en Tanins hydrolysables mgEAT/g Lyophilisat	1,203±0,087	0,121±0,012

Les valeurs ont été représentées par les moyennes ± SD (n=3).

Les résultats obtenus ont montrés une teneur significativement élevée des tanins hydrolysables dans l'extrait aqueux de *C.officinalis*, alors que l'extrait alcoolique a enregistré une valeur beaucoup plus faible (**Fig 15**).

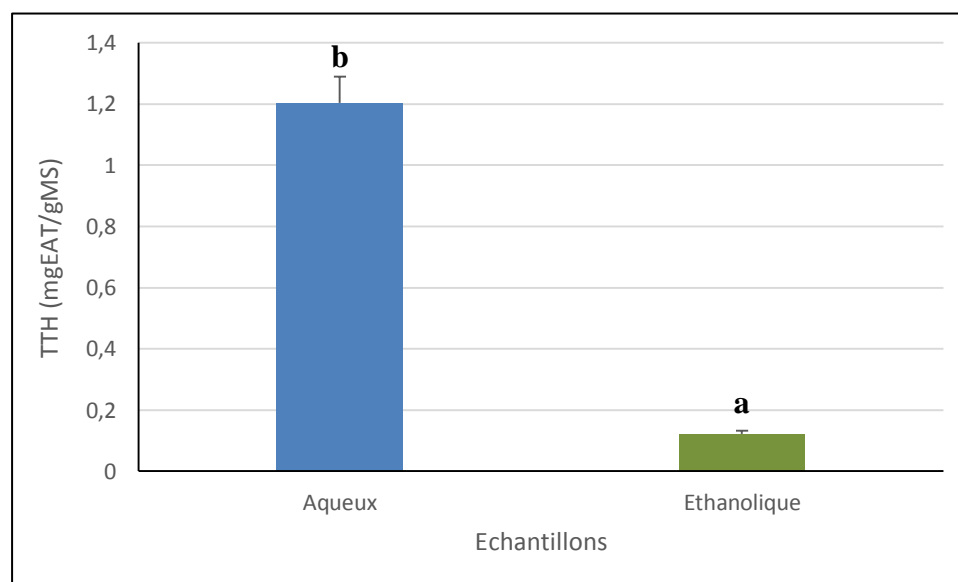


Figure 15 : Teneurs tanins hydrolysables dans les extraits aqueux et hydro-éthanolique obtenus par macération de la plante *Calendula officinalis* L. Les $P \leq 0,05$ ont été considérés comme statistiquement significatifs

V.3. Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de *Calendula officinalis* L.

V.3.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

La capacité de piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le calcul de la IC₅₀ (Concentration inhibitrice à 50%) en fonction de l'équation de la courbe de régression linéaire $y=ax+b$. La courbe des résultats du captage du DPPH par l'acide ascorbique a été utilisée pour l'appréciation des résultats obtenus. L'équation de la courbe d'étalonnage est la suivante : $y=510,98x+44,135$, avec un coefficient de détermination de R² de 0.994 (**Fig 16**).

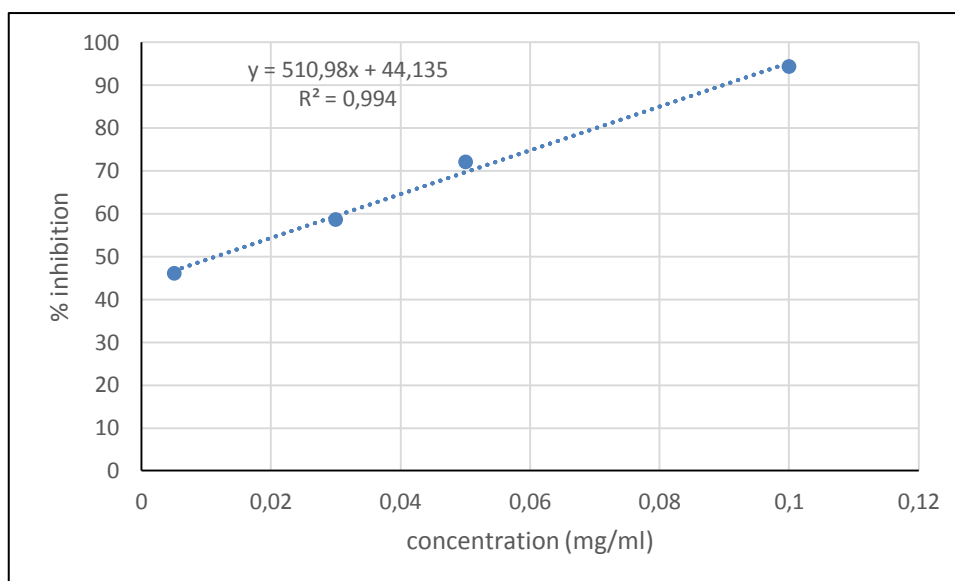


Figure 16 : Capacité de piégeage du radical libre DPPH par l'acide ascorbique

Les résultats obtenus par mesure du captage du radical libre DPPH à 50% ont révélé une concentration élevée de l'IC₅₀ de l'extrait hydro-éthanolique de l'ordre de 5,942 mg/ml. Alors que l'extrait aqueux a présenté une IC₅₀ de 2,921mg/ml. Quant à la référence, sa concentration inhibitrice était de 0,0114mg/ml (**Tab 09**).

Tableau 09 : Capacité du piégeage de 50% du radical libre DPPH des extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Calendula officinalis* L., ainsi que l'acide ascorbique

Extraits	DPPH IC ₅₀ (mg/ml)
Extrait aqueux	2,921
Extrait hydro-éthanolique	5,942
Acide ascorbique	0,0114

V.3.2. piégeage du radical libre ABTS L'acide 2,2'-azino- bis (3éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

La capacité de piégeage du radical libre ABTS a été mesurée selon le calcul de la IC₅₀ (Concentration inhibitrice à 50%) en fonction de l'équation de la courbe de régression linéaire $y=ax+b$. La courbe des résultats du captage de l'ABTS par la référence, le Trolox a été utilisée pour l'appréciation des résultats obtenus. L'équation de la courbe d'étalonnage est la suivante : $y= 510,98x+44,135$, avec un coefficient de détermination de R² de 0.994 (**Fig 17**).

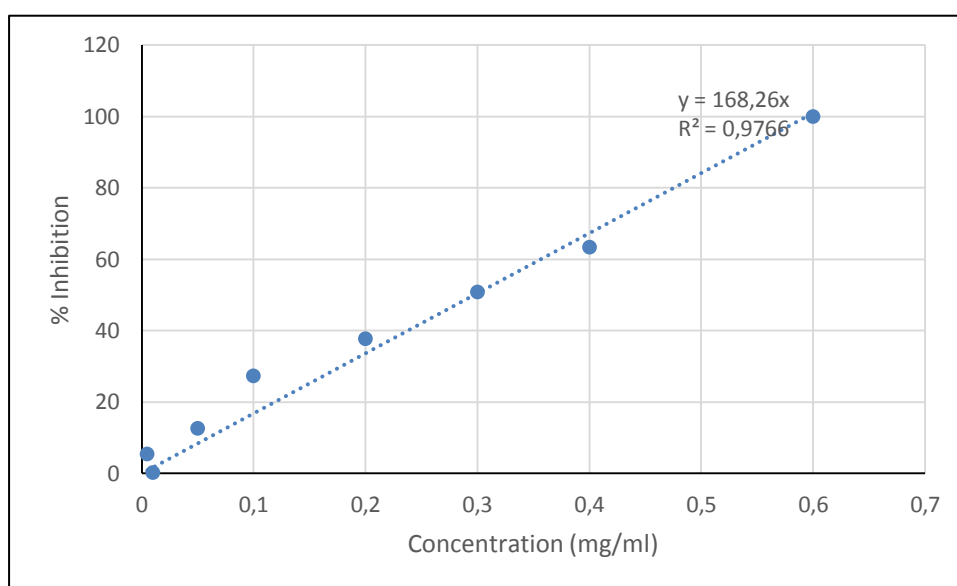


Figure 17 : Capacité de piégeage du radical libre ABTS par le Trolox

La valeur de l'IC₅₀ obtenu par l'extrait aqueux de *C.officinalis*, correspondant à la concentration d'inhibition de 50 % le radical libre ABTS est de l'ordre de 2,835 mg/ml, cette dernière est plus faible que celle affichée par l'extrait hydro-éthanolique. Cependant, le trolox a enregistré une IC₅₀ beaucoup plus faible que nos extraits étudiés (**Tab 10**).

Tableau 10 : Capacité du piégeage de 50% du radical libre ABTS des extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Calendula officinalis* L., ainsi que le Trolox

Extraits	ABTS IC ₅₀ (mg/ml)
Extrait aqueux	2,835
Extrait hydro-éthanolique	3,139
Trolox	0,29

V.3.3. Pouvoir antioxydant de la réduction ferrique (FRAP)

La capacité antioxydante totale des extraits aqueux et hydro-éthanolique de *C.officinalia* été déterminée selon l'équation de la régression linéaire ($y = ax+b$) établie par la courbe d'étalonnage du sulfate ferreux heptahydraté ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (**Fig 18**).

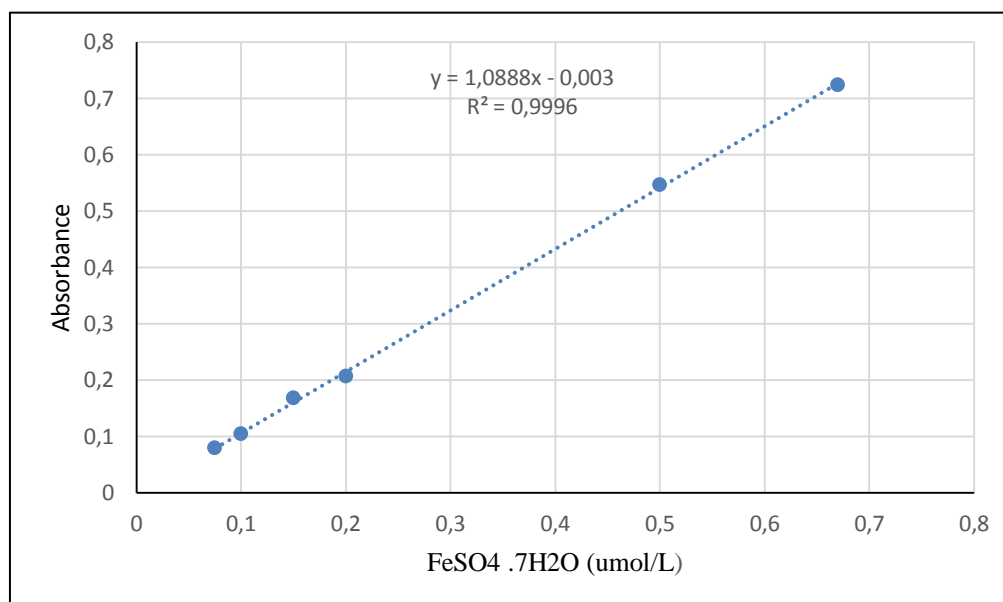


Figure 18 : Courbe d'étalonnage du sulfate ferreux heptahydraté ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

L'activité antioxydante évaluée par la méthode FRAP correspond à la capacité totale à réduire le complexe Fe^{III} -TPTZ. Ce qui a été traduit par un pouvoir réducteur pratiquement semblable pour les extraits aqueux et hydro-éthanolique de *C.officinalis* de l'ordre de 23,144 et 20,481 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$ lyophilisat (**Tab 11**).

Tableau 11: Potentiel antioxydant de la réduction ferrique (FRAP) des extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Calendula officinalis* L.

Extraits	FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$ lyophilisat)
Extrait aqueux	23,144 \pm 0,736
Extrait hydro-éthanolique	20,481 \pm 0,735

V.3.4. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale a été exprimée en milligrammes équivalents acide ascorbique par 100gramme de lyophilisat (mgEAA/100g lyophilisat). L'équation de la courbe de régression linéaire est la suivante : $y = 0,694x + 0,0775$, avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0,9982$ (**Fig 19**).

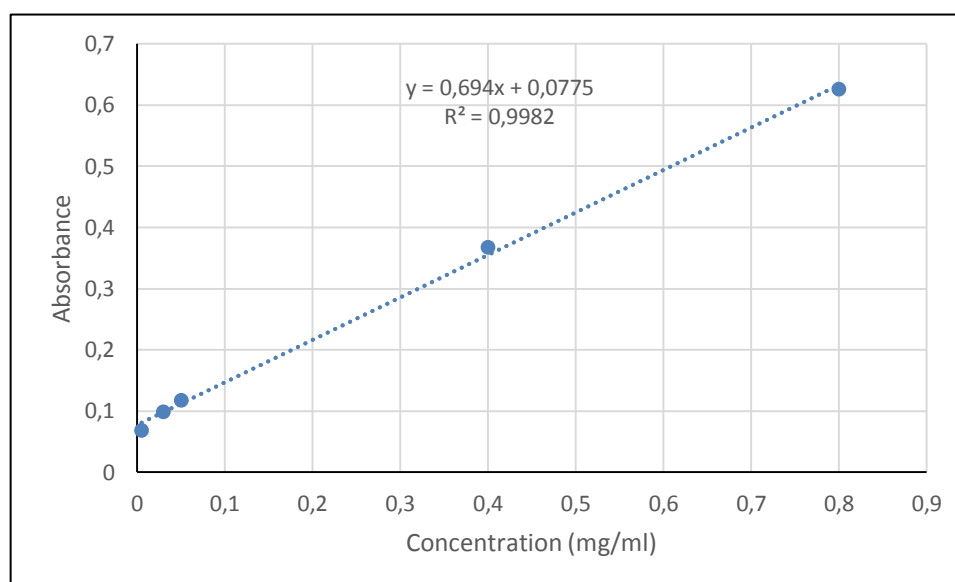


Figure 19 : courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

Le pouvoir antioxydant enregistré des extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Calendula officinalis* L. a été estimé à 67,723 et 63,184 respectivement (**Tab 12**) ce deux valeur sont très proches et reflète une capacité anti radicalaire importante.

Tableau 12: Capacité antioxydante totale (CAT) des extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Calendula officinalis* L.

Extraits	mg EAA/100g lyophilisat)
Extrait aqueux	67,723 ± 0,720
Extrait hydro-éthanolique	63,184 ± 2,593

Discussion

L'étude phytochimique qualitative menée sur les extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Calendula officinalis* L. a mis en évidence une composition remarquablement riche en métabolites secondaires bioactifs, tout en révélant des variations significatives liées à la nature du solvant d'extraction. Les tests de coloration et de précipitation ont confirmé une concentration très élevée de polyphénols totaux (+++) dans les deux extraits. Nos résultats qualitatifs confirment que *Calendula officinalis* L. est une plante riche en polyphénols totaux (+++ dans les deux extraits), ce qui est en parfait accord avec les travaux de **Efstratiou et al. (2012)** qui ont identifié cette espèce comme une source importante de composés phénoliques, notamment des flavonoïdes et des tanins. De même, **Muley et al. (2009)** ont rapporté une forte réactivité aux tests de coloration pour les polyphénols dans les extraits hydro-alcooliques, corroborant nos observations.

L'analyse des tanins a mis en évidence des profils d'extraction distincts selon la nature du solvant employé. Pour les tanins catéchiques, les deux extraits ont présenté une très forte réactivité (+++) au test au FeCl₃, se manifestant par une coloration verdâtre caractéristique, tandis que la réaction de Stiasny a révélé une prédominance significativement plus marquée dans l'extrait hydro-éthanolique (+++) comparé à l'extrait aqueux (++) , comme en témoigne l'intensité du précipité rouge formé. Concernant les tanins hydrolysables, l'extrait aqueux a démontré une concentration particulièrement élevée (+++) lors du test au FeCl₃, caractérisée par une intense coloration noirâtre, alors que l'extrait hydro-éthanolique n'a montré qu'une teneur notable (++) . La réaction de Stiasny quant à elle a indiqué une présence modérée mais systématique (+) de ces composés dans les deux extraits, se traduisant par un surnageant bleu-noirâtre, confirmant ainsi la nature mixte des tanins présents dans *Calendula officinalis* L. Ces variations d'extraction pourraient s'expliquer par les différences de polarité entre les solvants et les propriétés chimiques distinctes des deux classes de tanins.

Concernant les tanins hydrolysables, nos analyses ont révélé une teneur très élevée (+++) dans l'extrait aqueux contre une concentration notable (++) dans l'extrait hydro-éthanolique lors du test au FeCl₃, tandis que la réaction de Stiasny a indiqué une présence modérée (+) dans les deux extraits. Ces observations s'expliquent par les travaux de **Costa et al. (2015)**, qui ont démontré que l'éthanol peut limiter l'extraction des tanins hydrolysables en favorisant la formation de complexes insolubles. Nos résultats confirment ainsi la meilleure efficacité des solvants aqueux pour l'extraction de cette classe de composés phénoliques, en accord avec leur nature chimique plus polaire.

En ce qui concerne les tanins catéchiques (condensés), nos résultats ont révélé une forte réactivité (++++) au test au FeCl₃ (coloration verdâtre caractéristique) dans les deux extraits, avec une prédominance plus marquée dans l'extrait hydro-éthanolique (++++) comparé à l'extrait aqueux (++) lors de la réaction de Stiasny. Ces observations corroborent les travaux de **Jiménez-Medina et al. (2006)**, qui ont également démontré une meilleure extraction des tanins condensés par l'éthanol à 70%, attribuant ce résultat à la capacité du solvant à rompre efficacement les liaisons hydrophobes des proanthocyanidines. Cette similarité dans les profils d'extraction selon la nature du solvant confirme l'importance de la polarité dans l'isolement des tanins condensés.

La détermination spectrophotométrique des phénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu a révélé des variations significatives ($p < 0,05$) entre les extraits aqueux et hydro-éthanoliques de *Calendula officinalis* L. (exprimées en mg EAG/g lyophilisat). La courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y=1,6151x -0,0103$) a démontré une excellente linéarité ($R^2 = 0,995$), validant la robustesse de la méthode analytique employée. Les analyses ont montré une concentration phénolique significativement plus élevée dans l'extrait hydro-éthanolique ($3,293 \pm 0,262$ mg EAG/g) comparé à l'extrait aqueux ($0,26 \pm 0,02$ mg EAG/g), avec un facteur de différence supérieur à 12%. Cette disparité prononcée pourrait être attribuée à la capacité supérieure du mélange hydro-éthanolique à extraire simultanément les composés phénoliques polaires et non polaires, la dégradation potentielle des polyphénols thermosensibles lors de l'extraction aqueuse, et les interactions différentielles solvant-paroi cellulaire végétale affectant la libération des métabolites secondaires. Ces observations sont cohérentes avec les mécanismes connus d'extraction des composés phénoliques, où les solvants hydro-alcooliques présentent généralement une meilleure efficacité d'extraction que l'eau pure. Nos résultats s'avèrent légèrement inférieures mais comparables à celles rapportées par **Khalid et al. (2018)** pour des extraits similaires (4,02 mg EAG/g pour l'éthanolique 80% et 0,42 mg EAG/g pour l'aqueux), avec des écarts relatifs modérés de 18-22%.

La quantification des tanins condensés a été réalisée par une méthode spectrophotométrique basée sur une courbe d'étalonnage utilisant la catéchine comme standard. La courbe de régression linéaire ($y=2,5039x$) présente un coefficient de détermination élevé ($R^2=0,9908$), indiquant une bonne corrélation entre l'absorbance et la concentration des tanins condensés. Cette linéarité confirme la fiabilité de la méthode pour la gamme de concentrations testées.

Les résultats montrent une teneur significativement plus élevée dans l'extrait hydro-éthanolique ($0,082 \pm 0,02$ mg EC/g Lyophilisat) comparée à l'extrait aqueux ($0,014 \pm 0,008$ mg EC/g Lyophilisat). Ces observations sont en accord avec les travaux menés par **Efstratiou et al. (2012)** qui ont également rapporté que les extraits hydro-alcooliques (70% éthanol) de *Calendula* présentaient une concentration supérieure en polyphénols, y compris les tanins condensés, par rapport aux extraits aqueux.

La quantification des tanins hydrolysables a été réalisée par une méthode spectrophotométrique basée sur une courbe d'étalonnage utilisant l'acide tannique comme standard. La courbe de régression linéaire obtenue ($y = 0,1673x + 0,0384$) présente un coefficient de détermination très élevé ($R^2 = 0,9978$), ce qui indique une excellente linéarité et une forte corrélation entre l'absorbance et la concentration des tanins hydrolysables. Ce résultat confirme la fiabilité et la précision de la méthode utilisée pour la gamme de concentrations testées. Contrairement aux résultats observés pour les tanins condensés, les tanins hydrolysables présentent une teneur significativement plus élevée dans l'extrait aqueux ($1,203 \pm 0,087$ mg EAT/g MS) par rapport à l'extrait hydro-éthanolique ($0,121 \pm 0,012$ mg EAT/g MS). Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Mari et al. (2013)**, qui ont également rapporté une teneur plus élevée en tanins hydrolysables dans les extraits aqueux de *Calendula officinalis* par rapport aux extraits hydro-alcooliques.

L'évaluation *in vitro* du potentiel antioxydant de *Calendula officinalis* L. a combiné plusieurs techniques analytiques validées, incluant le pouvoir du piégeage des radicaux libres (DPPH, ABTS), ainsi que la capacité antioxydante totale (FRAP et CAT).

D'après le teste de DPPH, L'extrait aqueux montre une activité antioxydante deux fois plus élevée que l'extrait hydro-éthanolique, ce qui suggère que les composés actifs de *Calendula officinalis* (flavonoïdes, polyphénols) sont mieux extraits par l'eau que par l'éthanol. Cette observation est surprenante car les solvants hydro-éthanoliques sont généralement plus efficaces pour extraire les antioxydants polaires et non polaires Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par **Fonseca et al. (2020)**, qui a rapporté une forte activité antioxydante Notre extrait aqueux (2,921 mg/ml) est deux fois moins actif que celui de Fonseca. (1,50 mg/mL). et l'extrait hydro-éthanolique (5,942 mg/ml) est sept fois moins actif que celui de l'étude (0,85 mg/mL).

Dans le test ABTS, on remarque que : L'extrait aqueux est plus actif que l'hydro-éthanolique, ce qui corrobore avec les résultats du DPPH. Par contre les deux extraits sont moins actifs que le Trolox,

Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par **Jiménez-Medina et al. (2006)** qui a rapporté une forte activité antioxydante. Notre extrait aqueux (2,835 mg/mL) est moins actif que celui dans l'étude. (1,20 mg/mL) et l'extrait hydro-éthanolique (3,139 mg/mL) est moins actif que dans l'étude (0,45 mg/mL).

Les résultats du test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) révèlent que les extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Calendula officinalis* L. présentent une activité antioxydante comparable, avec une légère supériorité de l'extrait aqueux (23,144 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{ g}$) par rapport à l'extrait hydro-éthanolique (20,481 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$). Cette observation suggère que les composés réducteurs du fer ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) sont similairement biodisponibles dans les deux solvants, bien que l'eau semble extraire une fraction légèrement plus active. Les résultats obtenus dans notre étude montrent des valeurs d'activité FRAP significativement inférieures (de 19 à 65%) à celles rapportées par **Mishra et al. (2010)** pour des extraits de *Calendula officinalis* L. En effet, tandis que cette étude référence mesure une activité de $58,1 \pm 3,5 \mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/100\text{ g}$ pour l'extrait méthanolique et $28,5 \pm 1,8 \mu\text{mol}/100\text{ g}$ pour l'extrait aqueux

Les résultats du test CAT, exprimés en milligrammes équivalents acide ascorbique (mg EAA/100 g de lyophilisat), révèlent une capacité antioxydante élevée et comparable pour les extraits aqueux (67,723mg EAA/100 g) et hydro-éthanolique (63,184 mg EAA/100 g) de *Calendula officinalis* L. La similarité des valeurs suggère que les composés antioxydants majeurs (polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes) sont similairement extraits par les deux solvants, bien que l'eau semble légèrement plus efficace. En comparaison de nos résultats avec ceux de **Mishra et al. (2010)**, cela révèle une excellente concordance pour l'extrait aqueux, avec des valeurs de 67,723 mg EAA/100 g dans notre étude contre $68,3 \pm 3,0$ mg EAA/100 g dans l'étude de **Mishra et al. (2010)**, soit une différence non significative de seulement 0,8%. Cette remarquable similarité confirme la reproductibilité des méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante totale pour les extraits aqueux de *Calendula officinalis* L

Conclusion et perspectives

Cette présente étude sur *Calendula officinalis* L. a mis en évidence des variations significatives dans la composition phytochimique et le potentiel antioxydant en fonction des solvants d'extraction employés, révélant des mécanismes d'extraction différentiels particulièrement intéressants d'un point de vue pharmacognosique.

Les analyses systématiques ont démontré que l'extrait hydro-éthanolique (70%) présente une affinité marquée pour les composés de nature intermédiairement polaire, avec des teneurs significativement plus élevées en polyphénols totaux ($3,293 \pm 0,262$ mg EAG/g Lyophilisat) et en tanins condensés ($0,082 \pm 0,02$ mg EC/g Lyophilisat). Ce profil s'explique par la capacité du mélange hydro-alcoolique à perturber efficacement les structures pariétales végétales tout en solubilisant une large gamme de métabolites secondaires

À l'inverse, l'extrait aqueux a révélé une efficacité d'extraction supérieure pour les tanins hydrolysables ($1,203 \pm 0,087$ mg EAT/g Lyophilisat), probablement en raison de la plus grande polarité de ces esters d'acides phénoliques.

La performance inattendue de l'extrait hydraulique dans les tests de piégeage des radicaux libres (DPPH, ABTS), malgré sa teneur globale plus faible en polyphénols, suggère fortement la présence de composés antioxydants spécifiques à haute biodisponibilité aqueuse, potentiellement des dérivés glycosylés ou des complexes tanniques hydrosolubles présentant une activité radicalaire particulièrement efficace.

Les analyses comparatives des différents tests antioxydants (DPPH, ABTS, FRAP, CAT) ont révélé des profils d'activité distincts mettant en évidence des mécanismes d'action complémentaires et hiérarchisés selon la nature du solvant d'extraction. La supériorité significative de l'extrait aqueux dans certains tests, particulièrement le DPPH et l'ABTS, pourrait s'expliquer par trois mécanismes synergiques : premièrement, la présence préférentielle dans cet extrait de métabolites spécialisés à fort potentiel réducteur, notamment des tanins hydrolysables et des flavonoïdes glycosylés présentant une densité élevée de groupements phénoliques libres ; deuxièmement, des interactions synergiques complexes entre différents groupes phénoliques (effet dit "d'entourage" phytochimique) qui potentialisent l'activité antioxydante globale ; et troisièmement, une meilleure accessibilité conformationnelle des sites actifs dans le milieu aqueux, favorisant les réactions de transfert d'électrons et de piégeage radicalaire.

Ces observations suggèrent que l'efficacité antioxydante ne dépend pas uniquement de la concentration totale en polyphénols, mais également de facteurs structuraux et environnementaux influençant la réactivité des molécules bioactives.

Les résultats de cette étude ouvrent des perspectives de recherche multidimensionnelles pour *Calendula officinalis* L., articulées autour de quatre axes majeurs. Le premier axe concerne l'élucidation des mécanismes d'action moléculaire, incluant l'étude approfondie des voies de signalisation cellulaire modulées par les extraits, l'analyse des interactions spécifiques tanins hydrolysables/espèces réactives de l'oxygène, et la caractérisation des relations structure-activité des antioxydants identifiés. Le deuxième axe porte sur l'optimisation des procédés d'extraction via l'évaluation de technologies émergentes (ultrasons, micro-ondes, fluides supercritiques), l'optimisation systémique des paramètres opératoires par méthodologie des surfaces de réponse, et le développement d'extraits standardisés. Le troisième axe s'oriente vers la valorisation thérapeutique, avec des évaluations *in vivo* des effets sur le stress oxydatif, des études translationnelles en médecine intégrative, et le développement de formulations galéniques innovantes (nanovecteurs, systèmes à libération contrôlée). Enfin, le quatrième axe propose des approches intégratives combinant synergies phytochimiques et modélisation *in silico*.

Ces orientations stratégiques permettront non seulement de décrypter les mécanismes bioactifs sous-jacents, mais aussi de développer des applications ciblées en nutraceutique, dermo-cosmétique et phytomédecine, tout en assurant une valorisation durable et scientifiquement fondée de cette ressource végétale prometteuse.

Références bibliographiques

A

- ANDREYEV A.Y., KUSHNAREVA Y.E., STAR K.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70: 200-214.
- AHSAH H., ALI A., ALI R., 2003. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 131(3): 398-404.
- ALGECIRAS-SCHIMNICH A., COOK W-J., MILZ T-C., SAENGER A-K., KARON B-S., 2007. Evaluation of haemoglobin interference in capillary heel-stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clinical Biochemistry*, 40: 1311–1316.
- Ahamet, S., 2003. Étude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae). Thèse de Pharmacie, Bamako, 117 p.
- AL-GUBORY K.H., GARREL C., FAURE P., SUGINO N., 2012. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproductive Biomedicine Online*, 25: 551–560.
- Ahmad, M., Khan, M. A., & Wahid, A. (2012). (Référence complète non fournie – étude sur l'activité antiviellissement)

B

- BABIOR B.M., 2004. NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16(1): 42–47.
- BATTEGLIO M.G., BOLOGNESI A., POLITO L., 2014. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(9): 1502-1517.
- BECKMAN K.B., AMES B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78(2): 547-581.
- BENSKHRIA A., 2018. Toxicologie générale - Stress oxydatif. Université catholique Saint Antonio de Murcia.
- BIAGLOW J.E., MITCHELL J.B., HELD K., 1992. The importance of peroxide and superoxide in the X-ray response. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 22: 665-669.

- BONNEFONT-ROUSSELOT D., PEYNET J., BEAUDEUX J.L., THEROND P., LEGRAND A., DELATTRE J., 2002. Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16: 260-267.
- BRIGELIUS-FLOHÉ R., MAIORINO M., 2013. Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5): 3289-3303.

C

- Church DF, Pryor WA: Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect.* 1985, 64: 111-126.
- Comhair SA, Thomassen MJ, Erzurum SC: Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O₂ or cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000, 23: 350-354. 10.1165/ajrcmb.23.3.4076.
- CADET J., WAGNER J.R., 2013. DNA base damage by reactive oxygen species. *Mutation Research*, 736: 1-2.
- CARR A.C., FREI B., 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB Journal*, 13(9): 1007-1024.
- CARR A.C., MAGGINI S., 2017. Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11): 1211.
- CHELIKANI P., FITA I., LOEWEN P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2): 192-208.
- CHIU S.M., XUE L.Y., FRIEDMAN L.R., OLEINICK N.L., 1993. Copper ion-mediated sensitization of nuclear matrix attachment sites to ionizing radiation. *Biochemistry*, 32: 6214-6219.
- COMHAIR S.A., ERZURUM S.C., 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(2): L246-L255.
- COSTA P., LOURENÇO A., GONÇALVES S., 2015. Hydrolysable tannins in medicinal plants: Extraction and quantification methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(12): 3105-3115.
- Chandra, S., Kishore, K., & Ghosh, A. K. (2015). Gastroprotective effect of *Calendula officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 170, 261-269.

- Chisholm, M. J., & Hopkins, C. Y. (1967). Calendic acid, a new fatty acid from *Calendula officinalis* seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44(7), 407-409.
- Cordova, C. A., et al. (2002). Hepatoprotective activity of *Calendula officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 381-384.

D

- Deponte (2017) "Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes
- DAVID G.-W., 2015. *Encyclopedia of Mind Enhancing Foods, Drugs and Nutritional Substances* (2nd ed.). McFarland & Company.
- DELATTRE J., BEAUDEUX J.-L., BONNEFONT-ROUSSELOT D., 2005. Antioxydants et nutrition. In: *Radicaux libres et stress oxydant*. Lavoisier, Paris, pp. 45-60, 261-276.
- DEPONTE M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830: 3217–3266.
- DROGE W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1): 47-95.
- DUBOIS B., 2015. Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : revue bibliographique. Thèse de doctorat, Université Claude-Bernard-Lyon I.

E

- Eddhima, Z. (2019). *Les radicaux libres: effets, mecanisme et approches therapeutiques* (Doctoral Dissertation).
- EFSTRATIOU E., IBRAHIM F., LALAS S., 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of *Calendula officinalis*. *Journal of Medicinal Food*, 15(6): 978-984.
- ESRA BIRBEN, UMUR MURAT SAHINER, CANSIN SACKESEN, SERPIL ERZURUM, OMER KALAYCI, 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1): 9-19.

- EVANS J.L., GOLDFINE I.D., MADDUX B.A., GRODSKY G.M., 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23(5): 599-622.
- Efstratiou, E. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(10), 1825-1830.

F

- Fonseca (2020) L'étude "Antioxydant and anti-inflammatory activities of *Calendula officinalis* hydroalcoholic extracts"
- FAVIER A., 2003. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité Chimique*, 115 p.
- FONCESCA Y.M., MARQUES M.B., 2010. Antioxydant and anti-inflammatory activities of *Calendula officinalis* hydroalcoholic extracts. *Journal of Medicinal Food*, 13(6): 1397-1406.
- FORMAN H.J., MAIORINO M., URSINI F., 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2): 1-12.
- FUKAI T., USHIO-FUKAI M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6): 1583-1606.
- FUNK C.D., 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294(5548): 1871–1875.
- Frankič, T., Salobir, J., & Salobir, K. (2009). (Référence complète non fournie – étude sur l'activité antigénotoxique)
- Fronza, M (2009). Wound healing activity of *Calendula officinalis* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(3), 463-470.
-

G

- GEOPTAR A.R., SCHEERENS M., VERMEULEN N.P., 1995. Oxygen and venobiotic reductase activities of cytochrome P 450. *Critical reviews in toxicology*, (25): 25-65.
- Garait, B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier-Grenoble 1. P 123-125.
- GARREL C., FAURE P., SUGINO N., 2012. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproductive Biomedicine Online*, 25: 551–560.
- GATÉ L., PAUL J., NGUYEN BAL G., TEW K.-D., TAPIERO H., 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 53: 169-180.
- GLASAUER A., CHANDEL N.S., 2014. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 92: 90–101.
- Gonçalves, T. D., (2018). (Référence complète non fournie – nécessite une recherche supplémentaire pour les détails exacts)
- Goodwin, T. W. (1954). Carotenoids: Chemical structure and distribution. *Annual Review of Biochemistry*, 23(1), 497-522.

H

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Edition. Oxford University Press
- Hocine, F.M. et Gorine, M.A. (2017). Evaluation de l'exposition au plomb et cadmium et impact sur quelques paramètres du statut oxydant/antioxydant chez les ouvriers exposés aux fumées de soudage.
- Hansen J. M., Go Y. M., and Jones D. P., Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. (2006) 46, 215–234, [16402904](#)
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- HALENG J., PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J.O., CHARLIER C., CHAPPELLE J.P., 2007. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10): 628-638.

- HARRISON R., 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(6): 774-797.
- HILTERMANN J.T., LAPPERRE T.S., VAN BREE L., STEERENBERG P.A., BRAHIM J.J., 1999. Ozone-induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: a new noninvasive tool in epidemiologic studies on air pollution and asthma. *Free Radical Biology & Medicine*, 27: 1448-1454.

J

- Jean-Charles *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*: Volume 36, Issue 2
Pages: 145-247 March 2012
- Jaeschke et al. (2012) "Acetaminophen hepatotoxicity"
- Janiszowska, W., Michalski, W., & Kasprzyk, Z. (1976). Occurrence of ubiquinone and plastoquinone in plants. Part II. *Acta Biochimica Polonica*, 23(3), 227-236.
- JANGI S., OTERO R., 2024. Bilirubin as a modulator of mTOR signaling in oxidative stress conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, 210: 158-167.
- JOHNSON R.J., LOPEZ-PARDO M., 2024. The Janus face of uric acid in neurodegeneration: Antioxidant or pro-oxidant? *Nature Reviews Neurology*, 20(1): 45-59

K

- Kell, D. B. (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation in inflammatory diseases. *BMC Medical Genomics*, 2(1), 2.
- Kelly (2003) "Oxidative stress: the role of air pollution"
- Kukreja, R. C., Kontos, H. A., Hess, M. L., & Ellis, E. F. (1986). PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circulation Research*, 59(6), 612-619
- Khalid, M (2018). *Ind Crops Prod.* 111:347-354
- KALYANARAMAN B., 2020. Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox Biology*, 34: 101558.

- KHAN N., MUKHTAR H., 2018. Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients*, 11(1): 39.
- KUHN H., BAKHSHYEVA O., 2015. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4): 308-330.
- Kalvatchev, Z., Walder, R., & Garzaro, D. (1997). Antiviral activity of *Calendula officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 57(2), 159-163.
- Kemper, K. J. (1999). Longwood Herbal Task Force: *Calendula officinalis*. Centre for Holistic Pediatric Education and Research.
- Komissarenko, N. F., Chernobai, V. T., & Derkach, A. I. (1988). (Référence complète non fournie – étude sur les flavonoïdes)

L

- López (2010). "Ethnobotany of *Calendula officinalis* in the Mediterranean Basin". *Economic Botany*, 64(3), 231–242
- Littarru & Tiano (2007) "Clinical aspects of coenzyme Q10
- Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F. et Samuel J-L. (2007). *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux*. Edition John Libbey Eurotext, Paris, P : 31, 316- 317.
- Laib, N et Megag, B. (2020). « Etude des propriétés biologiques des métabolites secondaires de quelques espèces végétales de la famille Astéracées »Mémoire de fin d'études Université Mohamed Seddik Ben Yahia Jijel.
- Lu & Cederbaum (2008) "CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol
- LACRAZ G., 2009. Relation entre stress oxydant et homéostasie glucidique au cours du diabète de type 2 : adaptation de la cellule β pancréatique. Thèse de doctorat, Université de Paris.
- LEE J., KOON N., MIN D.B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1): 21-33.
- LIGUORI I., RUSSO G., 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13: 757–772.

- Loggia, R. D. (1994). Anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis*. *Planta Medica*, 60(6), 516-520.

M

- MOHAMMEDI Z., 2012. Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud ouest de l'Algérie. Thèse doctorat en biologie. Université de Aboubekr belkaide, Telemcen, Alger
- Matthay MA, Geiser T, Matalon S, Ischiropoulos H: Oxidant-mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1999, 27: 2028-2030. 10.1097/00003246-199909000-00055.
- Matés, J., Perez-Gomez, C. et Nunez Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry Journal*, Vol 32, pp. 595-603.
- Menon, V. P., & Sudheer, A. R. (2007). "Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin." *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, 105-125.
- Mishra, A (2010). *Phytother Res*, 24(8), 1230-34.
- Mari, A (2013). Phytochemical profile and antioxidant activity of *Calendula officinalis* extracts. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1703-1711
- MANACH C., SCALBERT A., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5): 727-747.
- MATÉS J.M., PÉREZ-GÓMEZ C., NÚÑEZ DE CASTRO I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32: 595-603.
- MURPHY M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1): 1–13.
- Mishra, A. K., & Chattopadhyay, P. (2012). Photoprotective activity of *Calendula officinalis*. *Journal of Cosmetic Science*, 63(3), 153-163.

N

- Nikmehr, B., et al. (2014). Anti-protozoal activity of *Calendula officinalis*. *Iranian Journal of Parasitology*, 9(2), 251-257.

P

- Preethi, K. C., & Kuttan, R. (2006). Antioxidant activity of *Calendula officinalis*. *Journal of Medicinal Food*, 9(3), 451-456
- Packer, L (2021). "Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with therapeutic potential in metabolic diseases". *Antioxidants & Redox Signaling*, 34(8), 621-642.
- Pandey, K.B. & Rizvi, S.I. (2009). "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Packer, L., Kraemer, K. et Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. 17(10) : 888-895.
- Preethi, K.C., & Kuttan, R. (2009). *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 20(2), 73-79.
- Pacher, P (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424.
- Powers & Jackson (2008) "Exercise-induced oxidative stress

R

- Reiter (2016) "Melatonin as an antioxidant
- Rayman, M.P. (2020). "Selenium intake, status, and health: A complex relationship". *Nutrients*, 12(2), 527.
- RICHE D. et CHOSE D., 2008. *Micronutrition, santé et performance*. Groupe de Boeck et Larcier, Paris, 372p.
- Rocha-Guzman, N-E., Herzog, A., Gonzalez-Laredo, R-F., Ibarra-Perez, F-J., Zambrano Galvan, G. et Gallegos-Infante, J-A. (2007). Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*. 103 : 521–527.
- Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E. N., and Lakshminarasiah U., *Antioxidants and human diseases, Clinica Chimica Acta*. (2014) 436, 332–347, [24933428](#)
- Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian, L. et Had-Aissouni, L. (2005). Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate

concentrations? Consequences for neuronal viability. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24, 502–509.

S

- Sies, H. (2022). "Nutritional antioxidants and redox balance". *Redox Biology*, 52, 102284
- Stohs SJ, Bagchi D: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. 1995, 18: 321-336. 10.1016/0891-5849(94)00159-H.
- Scarim, C. B., Jornada, D. H., Machado, M. G. M., Ferreira, C. M. R., Santos, J. L. et Chung, M. C. (2019). "Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 162, pp. 378-395.
- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N.V., Zucca, P., Varoni, E. M, Dini L, Panzarini, E, et Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in physiology*, 11, 694.
- Stamler, J-S et Slivka, A. (1996). Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Reviews*, 54 (1), 1 – 30.
- Sato H., Shibata H., Shimizu T., Shibata S., Toriumi H., and Ebine T., Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion, *Neuroscience*. (2013) 248, 345–358, [23774632](#),
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Oxidative Stress. In *Encyclopedia of Stress* (2nd ed., pp. 45–48). Academic Press.
- Shivasharan, B. D (2013). Neuroprotective effects of *Calendula officinalis*. *Pharmaceutical Biology*, 51(3), 304-309.

T

- Traber & Atkinson (2007) "Vitamin E: Antioxidant and nothing more
- Trait, A.R. (2023). "Glutathione in aging and longevity: New insights from centenarian studies". *Redox Biology*, 59, 102572
- TACCHINI P., 2014. Les radicaux libres et l'oxydation. EDEL THERAPEUTICS, PSE-B, 1015 LAUSANNE

- Taniyama Y. and Griending K. K., Reactive oxygen species in the vasculature, *Hypertension*. (2003) 42, 1075–1081, [14581295](#)

U

- Ukiya, M., (2006). Cytotoxic triterpenoids from *Calendula officinalis*. *Journal of Natural Products*, 69(12), 1692-1696.

V

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40
- Varljen, J., Lipták, A., & Wagner, H. (1989). Immunostimulatory polysaccharides from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*, 28(9), 2379-2383.

W

- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., & Whysner, J. (1999). "Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives." *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 1027-1038.
- Wu J. Q., Kosten T. R., and Zhang X. Y., Free radicals, antioxidant defense system, and schizophrenia, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. (2013) 46, 200–206, [23470289](#)
- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82-83, 969–974.
- Yoshikawa, M., (2001). Gastroprotective effects of *Calendula officinalis*. *Journal of Natural Products*, 64(8), 1128-1130.

Z

- Zangar (2004) "Mechanisms for generation of reactive oxygen species by cytochrome P450"

- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 316-331

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم-

كلية علوم الطبيعة والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية

لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): . طالب عفيف..... رقم التسجيل الجامع.....37030449.....

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم:.....118088935..... والصادرة

بتاريخ:.....2020/07/06.....

عن. فرناكة مستغانم.....

المسجل بكلية علوم الطبيعة والحياة / قسم البيولوجيا

شعبة . بيولوجيا..... / التخصص.....Pharmacotoxicologie.....

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان: ...

.Caractérisation phytochimique et évaluation de capacité antioxydante de calendula officinalis L.

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ:.....2025/06/30.....

إمضاء المعني

* ملحق القرار الوزاري رقم 933 المؤرخ في 28 جويلية 2016 الذي يحدد القواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.