

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

KRITLI Djaouida

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Etude chimique et microbiologique de l'huile essentielle de
*Calendula algeriensis***

Soutenue le 23 juin 2011, devant le jury composé de :

Y. DAGHBOUCHE	Pr	Présidente	Université de Blida
Z. CHEMAT	MCB	Examinatrice	Université de Blida
A. BADIS	MCA	Examineur	Université de Blida
M. EL HATTAB	MCA	Rapporteur	Université de Blida



Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes parents et surtout mon oncle Younes pour leur soutien tout au long des mes études et durant cette thèse.

A mon frère Salim.

A mes sœurs Goucem & Raïfa.

A mon beau-frère Redouane. Et sans oublier mes deux agréables neveux Nadir & Sid'Ahmed

A toute ma famille.

A mes amies.



Remerciements

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été menées au sein du laboratoire de :

Chimie des substances naturelles, de L'Université Saad Dahlab de Blida, dirigé par le docteur

EL-HATTAB Mohamed.

- ❖ *Je tiens à le remercier vivement de m'avoir accueilli dans son groupe et de m'avoir donné l'opportunité de me former en chimie des substances naturelles.*

- ❖ *Je remercie Madame le Professeur DAGHBOUCHE Y. de la faculté des sciences de l'université de Blida, d'avoir accepté de présider le jury de mon mémoire de master.*

- ❖ *Je tiens à exprimer ma très grande considération à Monsieur le Docteur BADIS A. de la faculté des sciences d'ingénieur de l'université de Blida, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.*

- ❖ *Je remercie également Madame CHEMAT Z. Maître de conférences de la faculté des sciences d'ingénieur de l'université de Blida, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.*

Bien que le mémoire soit fondamentalement un travail individuel, il n'aurait pu être mené à bien sans une équipe de collègues qui contribue au bon fonctionnement du laboratoire, avec lesquels il est possible d'échanger les conseils et suggestions ... je remercie pour cela :

Asma, Amira, Hanane, Zahida, Boubekour, Redha. Je les remercie également pour tous les moments agréables passés au laboratoire.

Je souhaite aussi exprimer ma gratitude à tous les autres membres de l'équipe :

Sarah L, Sarah K, Leila, Nassima, Ibtissem, Hanane, pour leur gentillesse et leur disponibilité.

J'aimerais en particulier remercier mes petits amis *Chahinez, Melyara & Mohamed* pour leur agréable compagnie et leurs conseils.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail sans citer les noms.

Résumé

Ce travail porte sur l'étude chimique et microbiologique d'une plante médicinale algérienne nommée *Calendula algeriensis* appartenant au genre *Calendula* réputé pour sa richesse en métabolites secondaires et doté d'activités biologiques potentielles. Les espèces appartenant au genre *Calendula* trouvent diverses utilisations dans la médecine alternative, la plus importante, les fleurs ont été faites dans les extraits, teintures, baumes et appliquées directement sur la peau pour aider à guérir les plaies et à calmer l'inflammation et la peau endommagée.

L'analyse par CG/SM de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis* a montré que cette huile est majoritairement composée d'acide gras notamment l'**acide dodécanoïque** (11.69%) mais aussi de composés terpéniques en particulier le **carvacrol** (9.84%)

Les tests d'activités microbiologiques effectués sur l'huile essentielle du *Calendula algeriensis* ont manifesté une activité antibactérienne modérée vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* et *Echerichia coli* et une faible activité vis-à-vis de la souche *Enterococcus faecalis*. L'huile essentielle a montré aussi une certaine activité vis-à-vis du *Candida* SP et de deux levures. Par contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* et le *Candida tropicalis* se sont montrés insensibles à l'action de cette même huile essentielle.

Mot clés : *Calendula algeriensis*, Huile essentielle, Etude chimique, Activité antimicrobienne.

Abstract

This work concerns the chemical and microbiological study of a named Algerian medicinal herb *Calendula algeriensis* belonging to the *Calendula* genus considered for its wealth of secondary metabolites and has biological activities potential. The species belonging to the *Calendula* genus find various uses in the alternative medicine, most importantly, the flowers were made into extracts, tinctures, balms and salves and applied directly to the skin to help heal wounds and to soothe inflamed and damaged skin.

The analysis by GC/MS of the essential oil of *Calendula algeriensis* showed that this oil is mainly made up of fatty-acid in particular the dodecanoic acid (11.69 %) but also of terpenic compounds in particular the carvacrol (9.84 %). The microbiological tests of activities carried out on the essential oil of *Calendula algeriensis* expressed moderate antibacterial activity with respect to the strain *Staphylococcus aureus* and *Echerichia coli* and a weak activity with respect to the strain *Enterococcus faecalis*, Essential oil showed also some activity opposite candidas SP and of two yeasts. On the other hand the strain *Pseudomonas aeruginosa* and the candidas *tropicalis* were insensitive with the action of this same essential oil.

Key words : *Calendula algeriensis*, Essential Oil, Chemical study, Antimicrobial activity.

ملخص

يندرج هذا العمل ضمن الدراسة الكيماوية و الميكروبيولوجية للنباتات الطبية الجزائرية كالونديلا ألبيريانيسيس (الجمرة الجزائرية) التي تنتمي إلى النوع كالونديلا المتميزة بغناها بالأيضات الثانوية مع الأنشطة البيولوجية المحتملة. النباتات التي تنتمي إلى النوع كالونديلا لها استخدامات مختلفة في الطب البديل، والأهم، قدمت الزهور، ومقتطفات المراهم، الصبغات تطبيقها مباشرة على الجلد للمساعدة على تضييد الجراح وتهدئة الالتهاب و تلف الجلد.

أظهر التحليل باستخدام الكروماتوغرافيا الطور الغازي مع مطيافية الكتلة أن الزيت تتكون أساسا من الأحماض الدهنية خصوصا حمض دوديكانويك (11.69%) و لكن أيضا و بصفة خاصة كارفكرول (9.84%).

وقد أظهرت الاختبارات الميكروبيولوجية التي نفذت على الزيت الأساسية كالونديلا ألبيريانيسيس نشاط معتبر ضد ستييلوكوكيس اغيبس و اشيريشيا كولي بينما تجاه اونتيروكوكيس فكلويس أظهرت نشاط منخفض. كما أظهرت أيضا الزيوت الأساسية نشاط مع كونديدا اس ب و لوفير لكن ضد بسدوموناس ارجينوسا و كونديدا تروبيكاليس أثبتت حساسة لعمل هذه الزيت.

مفتاح الكلمات: كالونديلا ألبيريانيسيس، الزيوت الأساسية، الدراسة الكيماوية، الاختبارات الميكروبيولوجية.

Table des matières

Introduction.....	11
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
1.1 Systématique et taxonomie du genre <i>Calendula</i>	14
1.1.5 Systématique et taxonomie des espèces <i>Calendula officinalis</i> et <i>Calendula arvensis</i>	15
1.2 Etude chimique du genre <i>Calendula</i>	16
1.2.1 Etude chimique des extraits lipidiques des espèces appartenant au genre <i>Calendula</i>	16
1.2.2 Etude chimique de la composition de l'huile essentielle des espèces appartenant au genre <i>Calendula</i>	20
1.3 Activités biologiques des espèces appartenant au genre <i>Calendula</i>	20
1.4. Conclusion	22
Chapitre 2 : Partie expérimentale	
2. Extraction de l'huile essentielle de l'espèce <i>Calendula algeriensis</i>	24
2.2 Systématique et taxonomie de l'espèce <i>Calendula algeriensis</i>	25
Résultats et discussions de l'extraction de l'huile essentielle	28
2.4 Analyse de l'huile essentielle de <i>Calendula algeriensis</i> par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	29
2.4.1 Résultats et discussions de l'analyse par CG/SM	40
Chapitre 3 : Tests d'Activités Microbiologiques	
3. Tests d'activités microbiologiques	43
3.1 Matériels, réactifs chimiques, microorganismes et milieux de cultures.....	43
3.2.1 Test d'activité antibactérienne.....	44
3.2.2 Résultat et discussion du pouvoir antibactérien.....	45
3.2.3 Activité antifongique.....	47
3.2.3.3 Résultat et discussion du pouvoir antifongique	48
Conclusion	
Conclusion	51
Références bibliographiques	53
Annexes.....	59



Liste des figures

Figure 1 : Fleurs de <i>Calendula officinalis</i>	Figure 2 : Fleurs de <i>Calendula arvensis</i>	15
Figure 3 : Image de l'espèce <i>Calendula algeriensis</i>		25
Figure 4 : Fleurs sèches de <i>Calendula algeriensis</i> utilisées dans l'extraction.....		26
Figure 5 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau		27
Figure 6 : Huile essentielle de <i>Calendula algeriensis</i>		29
Figure 7 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Calendula algeriensis</i>		30
Figure 8 : Différent agrandissements du chromatogramme.....		31
Figure 9 : Représentation de chaque classe dans la composition chimique de l'huile essentielle.....		39
Figure 10 : Spectre de masse de carvacrol.....		40
Figure 11 : Spectre de masse de la Trans caryophyllène		40
Figure 12 : Spectre de masse de l'acide dodécanoïque.....		41
Figure 13 : Prélèvement des colonies et flambage de l'anse.		43
Figure 14 : Disposition des disques.		44
Figure 15 : Résultats du test d'activité antibactérienne.		45
Figure 16 : Résultat de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		46
Figure 17 : Disposition des disques		47
Figure 18 : Résultats du test d'activité antifongique.....		48

Liste des tableaux

Tableau 1: Composés terpéniques isolés de <i>Calendula officinalis</i>	17
Tableau 2 : Composés phénoliques isolés de <i>C. officinalis</i>	18
Tableau 3 : Composés terpéniques isolés de <i>Calendula arvensis</i>	19
Tableau 4 : Récapitulatif des expériences d'entraînement à la vapeur d'eau de l'H.E.....	28
Tableau 5 : propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Calendula algeriensis</i>	28
Tableau 6 : Composés identifiés : Temps de rétention, formule brute et le pourcentage	35
Tableau 7 : Evaluation de la zone d'inhibition en fonction de la nature de la souche.....	45
Tableau 8 : Evaluation de la zone d'inhibition en fonction de la nature de la souche.....	48



Liste des planches

PLANCHE A : Structure des triterpénoides isolés de <i>Calendula officinalis</i>	61
PLANCHE A : Structure des différents caroténoïdes isolés du <i>C.officinalis</i>	62
PLANCHE B : Structure des composés phénoliques isolés de <i>C.officinalis</i>	63
PLANCHE C: Structure des stérols isolés de <i>C. officinalis</i>	64
PLANCHE D : Structures des sesquiterpènes isolés de <i>C.arvensis</i>	65
PLANCHE E: Structures des monoterpènes et sesquiterpènes isolés de l'HE de <i>C.officinalis</i> et <i>C.arvensis</i>	66



Liste des abréviations

AcOEt: Acétate d'éthyle

ATCC: American Type Culture Collection

°C: degrés Celsius

CG/SM: chromatographie en phase gazeuse couplée avec le spectrométrie de masse

eV: electron volt

He: Helium

m : mètre

Na₂ SO₄: sulfate de sodum

M.H: Mueller Hinton

mm: millimètre

Na₂SO₄: Sulfate de sodium

OGA : Gélose a base d'oxytetracycline

T_R: Temps de rétention

µm: Micromètre

%: pourcentage

Introduction

Introduction

Personne n'ignore aujourd'hui la richesse et la diversité des plantes médicinales utilisées par 80 % des habitants de notre planète qui se soignent particulièrement par les médecines alternatives de leur pays, car ils n'ont pas accès à la médecine moderne [1].

On assiste depuis plus d'une décennie à une utilisation plus fréquente des plantes médicinales sous formes simples répondant à des normes de qualité (plantes sèches pour préparer les tisanes, huiles essentielles, teinture officinales, extraits fluides, extraits secs).

Les huiles essentielles sont des substances volatiles non grasses sécrétées par les plantes aromatiques comme la lavande, l'eucalyptus ou le thym. Elles sont constituées d'un mélange souvent complexe de molécules organiques variées, comprenant en particulier des terpènes (hydrocarbures) et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones). Elles entrent dans la composition de parfums, de cosmétiques, de produits d'entretien et sont utilisées en aromathérapie [2]. En phytothérapie, elles sont souvent utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne [3].

Toutes les parties de la plante peuvent contenir des huiles essentielles qui possèdent de nombreuses activités biologiques. Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou graines (carvi). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, classées parmi les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante [3].

Par exemple, pour la famille des Lamiacées, les huiles se situent dans les poils sécréteurs, chez les Myrtacées au niveau des poches sécrétrices ou encore des canaux sécréteurs pour les Astéracées [3].

Parmi les milliers de plantes médicinales recensées à ce jour, celles de la famille des astéracées (composées), l'une des plus grandes familles des angiospermes, avec environ 1100 genres et 25000 espèces sont présentes dans pratiquement toutes les régions du globe [4]. Elle est représentée en Algérie à travers 408 espèces et 109 genres. Bon nombre d'espèces sont alimentaires, d'autres produisent des huiles et des teintures, un très grand nombre est cultivé pour l'ornement [3].

Le genre *Calendula* qui fait partie de la famille des astéracées, compte environ 20 espèces. En Algérie, il est représenté par 4 espèces dont 3 au sud. Les espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine alternative pour leurs activités: activité immunostimulante,

activité anti-inflammatoire, activité antivirale, activité antibactérienne, activité antifongique, activité antinéoplasique, activité antioxydante [6]. Les études chimiques des espèces du genre *Calendula*, ont montré leur richesse en, sesquiterpènes, triterpènes, caroténoïdes, et en composés phénoliques notamment les flavonoïdes. Ces derniers sont largement présents dans le règne végétal et représentent une catégorie très importante aux propriétés biologiques multiples [3].

Dans ce contexte et vu l'importance de l'utilisation des espèces du genre *Calendula* en médecine alternative et les résultats significatifs des tests d'activités biologiques obtenus, nous avons jugé utile de mener, dans le cadre de notre mémoire de fin d'études, une étude chimique sur l'espèce *Calendula algeriensis*. Cette espèce endémique pour l'Algérie et le Maroc n'a jamais fait l'objet de travaux antérieurs.

Notre mémoire débutera par une synthèse bibliographique sur le genre *Calendula* suivi d'une partie expérimentale portant sur l'extraction et l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Calendula algeriensis*. Nous terminons le travail expérimental par l'étude des activités microbiologiques de l'huile essentielle.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique



1.1 Systématique et taxonomie du genre *Calendula*

La famille des astéracées est une très grande famille répandue dans le monde entier principalement dans les régions tempérées, parmi les genres appartenant à cette famille, on note le genre *Calendula* qui contient environ 20 espèces, dont *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis* sont les plus connues.

Les plantes appartenant à ce genre sont généralement des plantes herbacées de 50-60 cm de haut. Les fleurs forment des capitules d'un diamètre variant de 3 à 10 cm. Souvent, elles sont toutes ligulées c'est-à-dire qu'elles n'ont pas de "cœur" démarqué comme pour la marguerite. La couleur de la fleur peut être de diverses teintes allant du jaune pâle à l'orange foncé. Les fleurs du souci s'ouvrent et se ferment avec le soleil. La floraison dure de nombreuses semaines et persiste jusqu'aux gelées... c'est d'ailleurs ce qui lui a valu son nom de souci, qui vient du latin *solsequia* (qui suit le soleil) [5].

1.1.1 Noms communs

Le *Calendula* est appelé couramment souci sur le terrain, ou le souci de jardin. En vieil anglais, *calendula* a été connu sous le nom "d'or", et a été associé d'abord avec la Vierge Marie, puis avec la reine Mary, d'où «l'or de Marie» [6].

1.1.2 Nom vernaculaires

Les noms les plus couramment utilisés sont : Atunjaq, djamir, djomaira, feminell, fleur de souci, fleur de tous les mois, bahar, zubaydah [7-8].

1.1.3 Distribution du genre *Calendula*

Le genre *Calendula* est indigène à la zone méditerranéenne. On retrouve des *Calendula* vivaces en Afrique du Nord, en Espagne, en Italie et en Yougoslavie. Les *Calendula* annuels, quant à eux, existent dans les Iles Canaris à l'ouest jusqu'en Inde à l'est, et d'Égypte au sud jusqu'en Iran au nord [9]. Sur 20 espèces; les études chimiques ont porté particulièrement sur les espèces *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis*.

1.1.4 Principales utilisations des espèces appartenant au genre *Calendula*

Les espèces du genre *Calendula* sont utilisées par voie interne pour stimuler le foie et la vésicule biliaire, soulager les douleurs menstruelles et régulariser le cycle féminin, combattre

les infections et les inflammations gastro-intestinales, la gastrite, les spasmes gastro-intestinaux et l'ulcère gastrique.

Par voie externe, elles sont connues dans le traitement des blessures, des infections cutanées, des brûlures, l'eczéma et la conjonctivite.

1.1.5 Systématique et taxonomie des espèces *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis*

1.1.5.1 Classification

Phyllum : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Calendula*

Espèce : *Calendula officinalis*, *Calendula arvensis*

1.1.5.2 Description

Ce sont deux plantes auto-ensemencement herbacées annuelles qui se développent dans presque tous les sols. Elles poussent à une hauteur de 30 à 50 cm avec des tiges ramifiées, anguleuses, velues. Leurs feuilles sont en forme de spatules ou oblongues de couleur orange vif pour *Calendula officinalis* (figure 1) et oblongues de couleur jaune vif pour *Calendula arvensis* (figure 2).



Figure 1 : Fleurs de *Calendula officinalis*

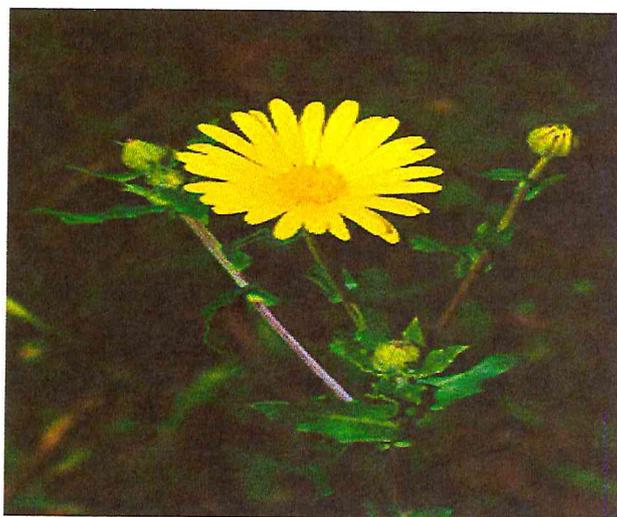


Figure 2 : Fleurs de *Calendula arvensis*

Les espèces *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis* sont assez semblables, seulement les feuilles de *C. arvensis* sont plus étroites et les capitules plus petits.

1.2 Etude chimique du genre *Calendula*

1.2.1 Etude chimique des extraits lipidiques des espèces appartenant au genre *Calendula*

Les extraits lipidiques ont été préparés par solvant tels que : l'acétone, l'éther diéthylique [10, 11], le mélange (n-hexane, dichloromethane) [12], le mélange (éther de pétrole, CHCl₃, MeOH) [13,14], le dichloromethane [15]. Nous avons noté aussi la préparation de certains extraits par l'utilisation du CO₂ supercritique [12, 16, 17,18, 19].

L'étude chimique des extraits lipidiques des espèces appartenant au genre *Calendula* a permis l'isolement de métabolites secondaires appartenant à différentes classes chimiques.

Nous avons noté particulièrement la présence de la classe des terpènes (sesquiterpènes, triterpènes, caroténoïdes), des stéroïdes, des composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines, des tanins) ainsi que d'autres composés de fonctions chimiques diverses notamment les acides gras.

1.2.1.1 Métabolites secondaires isolés du *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis*

L'étude chimique des extraits lipidiques de *Calendula officinalis* a permis l'isolement en particulier des triterpènes et leurs dérivés, des tetraterpènes, des composés phénoliques, des stéroïdes, ainsi que d'autres composés comme les acides gras. Dans le *Calendula arvensis* nous avons noté l'isolement des sesquiterpènes et des triterpènes glucosidiques [13, 14, 35, 36, 37, 38].

1.2.1.1.1 Principaux métabolites isolés de *Calendula officinalis*

1.2.1.1.1.1 Composés terpéniques

Il s'agit en particulier de triterpénoides alcooliques et glucosidiques, des esters de triterpénoides et des tetraterpènes (caroténoïdes) (planche A-annexe) [10, 12, 16, 17, 20-29]. Le tableau1 regroupe des exemples de chaque classe.

Tableau1: Composés terpéniques isolés de *Calendula officinalis*

Classe chimique	Composés isolés	Ref
Esters de triterpenoides	-faradiol-3-O-palmitate -faradiol-3-O-laurate -faradiol-3-O-myristate -maniladiol-3-O-laurate -maniladiol-3-O- myristate - α -amirin - β -amirin	12,16,17 20, 21, 22
Triterpenoides alcooliques	- Taraxasterol - Calenduladiol - Arnidiol - Heliantriol - Ursatriol - Faradiol	10, 12, 23, 24
Triterpenoides glucosidiques	- β -D-galactopyranosyl. - β -D-glucopyranosyl. - oleanolglycoside. - calendulaglycoside-A 6'-O-methyl ester.	17, 23, 24, 25, 26, 27
Tetraterpenes (caroténoides)	-carotène - lycopene - lutéine - flavoxanthin	17, 22 24, 28, 29

1.2.1.1.1.2 Composés phénoliques

Il s'agit en particulier de flavonoïdes, coumarines, tanins et des acides phénoliques de type C6-C1 et C6-C3 (planche B-annexe). Nous présentons dans le tableau 2 des exemples de composés phénoliques isolés de *C. officinalis*

Tableau 2 : Composés phénoliques isolés de *C. officinalis*

Classe chimique	Composés isolés	Ref
Flavonoïdes	- (3'-metoxi-4',3,5,7-tetrahydroxyflavone) isorhamnetin - isorhamnetin-3-O-glycoside - rutine. -quercetin-glycoside	17, 24, 26, 30, 31, 32
Coumarines	- Esculetin - Scopoletin - (7-Hydroxycoumarin) Umbelliferon	24
Tanins	- Catéchol et pyrogalol	24
Acides phénoliques	- Acide Cafféique - Acide Chlorogénique - Acide Coumarique - Acide Ferulique	24, 32

1.2.1.1.1.3 Stéroïdes

Les stéroïdes isolés sont notamment des stérols, en particulier cholestanol, stigmastanol, cholesterol, campesterol, sitosterol (planche C-annexe) [24, 33, 34].

1.2.1.1.1.4 Acides gras

Les principaux acides gras isolés sont : l'acide decanoïque, l'acide laurique, l'acide myristique, l'acide palmitique [24, 33].

1.2.1.1.2 Principaux métabolites isolés de *Calendula arvensis*

Il s'agit en particulier de sesquiterpènes et de triterpènes glucosidiques (planche D -annexe). Nous donnons dans le tableau 3 des exemples de chaque classe.

Tableau 3 : Composés terpéniques isolés de *Calendula arvensis*

Classe chimique	Composés isolés	Réf
Sesquiterpènes glucosidiques	<ul style="list-style-type: none"> - 4-O-(β-D-fucopyranosyl)-4-alloaromadendrole - 2'-(acethyl) fucosyl alloaromadendrole - 2'-(2''-methyl-butanoyl) fucosyl alloaromadendrole - 2'(3''-methyl-2''-pentenoyl) fucosyl alloaromadendrole 	13, 35, 36, 37
Triterpènes glucosidiques	<ul style="list-style-type: none"> - β-D-pyranosyl - 3β-O-(β-D-galactopyranosyl-(1-3)-β-D-glucopyranosyl)oleanoliacide - 28-O-β-D-glucopyranoside - 3β-O-(β-D-galactopyranosyl (1-9)-β-D-glucopyranosyl) oleanoliacide Avec les deux nouveaux triterpénoides - 28-O-β-D-Glycopyranoside-3-β-O-(O-β-D-galactopyranosyle(1 \rightarrow3)-β-D-Glycopyranoside - 3-β-O-(O-β-D-Galactopyranosyle(1 \rightarrow3)-β-D-glycopyranoside) 	14, 38

1.2.2 Etude chimique de la composition de l'huile essentielle des espèces appartenant au genre *Calendula*

L'huile essentielle a été préparée par entraînement à la vapeur d'eau et/ou par hydrodistillation, la plupart des travaux ont été effectués sur l'espèce *Calendula officinalis*.

La composition chimique de l'huile essentielle est constituée en majorité de monoterpènes et de sesquiterpènes. Les principaux composés terpéniques de l'huile essentielle sont : α et β -pinène, limonène, linalool pour les monoterpènes et le δ -cadinène, α -cadinol, 1,3,5-cadinatrie, α -muurolool pour les sesquiterpènes (planche E-annexe) [39, 40, 41, 42].

1.3 Activités biologiques des espèces appartenant au genre *Calendula*

les composés isolés des espèces appartenant au genre *Calendula* sont très actifs biologiquement, nous présentons dans ce qui suit les activités biologiques les plus importantes.

1.3.1 Activité anti-inflammatoire

Une inflammation est un processus physiologique en réponse à des lésions tissulaires résultant d'une infection pathogène microbienne. Une inflammation se manifeste par quatre signes principaux : rougeur, chaleur, gonflement, douleur.

Les espèces appartenant au genre *Calendula* sont capables de diminuer de manière très importante l'œdème et la congestion intervenant suite à une brûlure. Cela est dû à la présence de triterpénoïdes qui inhibent des enzymes lipooxygénases qui participent à la diminution rapide des inflammations [22, 24, 26, 43].

1.3.2 Activité immunostimulante

Un immunostimulant est une substance stimulant le système immunitaire qui assure les défenses de l'organisme. Les espèces appartenant au genre *Calendula* sont considérées comme des immunostimulantes grâce à l'effet des polysaccharides contenus dans ces plantes [44].

1.3.3 Activité antimicrobienne (activité anti-bactérienne, activité antifongique)

Les espèces appartenant au genre *Calendula* possèdent une activité contre les bactéries anaérobies et aérobies facultatives, par exemple, les différents types de *Candida*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* [21, 40].

1.3.4 Activité antivirale

Les espèces appartenant au genre *Calendula* présentent une activité contre les virus, on peut citer comme exemple, le virus d'herpès simplex, le virus d'influenza et le virus de la grippe ainsi que d'autres virus. Cette activité est due notamment à l'effet des sesquiterpènes glucosidiques [36].

1.3.5 Activité antinéoplasique

La néoplasie est un tissu nouvellement formé d'une tumeur bénigne ou maligne, ou bien un cancer. Les espèces du genre *Calendula* présentent une activité contre les tumeurs grâce à l'effet de triterpénoides saponines [24, 26, 45, 46].

1.3.6 Activité antioxydante

Un antioxydant est une substance naturelle ou chimique destinée à ralentir la dégradation des aliments due aux effets de l'oxydation. Les espèces appartenant au genre *Calendula* sont considérées comme des antioxydants grâce à l'effet des composés phénoliques du type flavonoïdes contenu dans ces plantes [30, 32].

1.4 Conclusion

Les études chimiques sur les espèces du genre *Calendula* ont porté particulièrement sur l'espèce *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis*.

L'étude chimique menée sur le *Calendula officinalis* a permis l'isolement de plusieurs métabolites secondaires, notamment :

- Les triterpénoïdes avec 3 classes différentes : glucosidiques, alcooliques et des esters triterpénoïdes.
- Les caroténoïdes sous forme d'hydrocarbures (carotène, lycopène), de xanthophylles (lutéine) et des apocaroténoïdes (flavoxanthin).
- Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines, tanins).
- Les stéroïdes (stérols).

L'huile essentielle de l'espèce *Calendula officinalis* est un mélange de monoterpènes et de sesquiterpènes.

L'étude chimique menée sur le *Calendula arvensis* a permis l'isolement de métabolites secondaires appartenant aux classes chimiques suivantes :

- Les terpènes notamment les Sesquiterpènes et les triterpénoïdes glucosidiques.

L'huile essentielle de l'espèce *Calendula arvensis* est formée également par un mélange de monoterpènes et de sesquiterpènes.

Les résultats obtenus à partir de nombreuses publications scientifiques montrent que le *Calendula officinalis* est plus riche en métabolites secondaires que le *Calendula arvensis*.

Egalement, les deux espèces présentent plusieurs activités biologiques parmi lesquelles : l'activité anti-inflammatoire et Immunostimulante, l'activité antimicrobienne (activité antibactérienne, l'activité antifongique), activité antivirale, l'activité antinéoplasique, l'activité antioxydante.

Chapitre 2

Partie expérimentale



2. Extraction de l'huile essentielle de l'espèce *Calendula algeriensis*

2.1 Introduction

Afin d'isoler de nouvelles substances des plantes pouvant trouver une application thérapeutique et de rendre la stratégie d'isolement moins laborieuse, il convient de sélectionner avec soin les plantes et les extraits à investiguer. Certains critères sont à prendre en considération pour mener à bien son étude [3].

Du choix du matériel végétal dépend en grande partie la réussite du travail, on se base notamment sur :

- utilisations en médecine alternative
- observations du matériel végétal sur le terrain
- aspects botaniques et chimiotaxonomiques
- Travaux antérieurs

Dans ce contexte et vu l'importance de l'utilisation des espèces du genre *Calendula* en médecine alternative et les résultats significatifs des tests biologiques obtenus, nous avons choisis l'espèce : *Calendula algeriensis* pour étude dans le cadre de notre mémoire. Cette espèce endémique pour l'Algérie et le Maroc n'a jamais fait l'objet d'études antérieures.

Les critères de choix de cette espèce, reposent essentiellement sur le fait que :

- Cette espèce appartient au genre *Calendula* de la famille des astéracées dont plusieurs activités biologiques ont été mises en évidence.
- Les espèces de ce genre étant réputées par l'accumulation de métabolites secondaires de différentes classes chimiques telles que: terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes, triterpènes, caroténoïdes), composés phénoliques, stéroïdes.
- Absence de travaux antérieurs sur cette espèce.

2.2 Systématique et taxonomie de l'espèce *Calendula algeriensis*

Phyllum : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Calendula*

Espèce : *Calendula algeriensis*



Figure 3 : Image de l'espèce *Calendula algeriensis*

2.2.1 Description de l'espèce *Calendula algeriensis*

C'est une plante annuelle poilue, à tiges robustes ramifiées, couchées puis dressées, de 20 à 60 cm. Feuilles oblongues de diamètre 2,5 à 4,5 cm. Capitules à fleurs de deux couleurs, s'épanouissant le matin et se refermant avant le coucher du soleil (figure 3).

L'espèce *Calendula algeriensis* est connue sous un nom français le souci bicolore ou souci d'Algérie et la Floraison peut aller de janvier à mai.

2.2.2 Récolte de l'espèce *Calendula algeriensis*

La récolte a été faite le mois de décembre, 2010 au sud Ouest d'Alger dans la région d'Ain Defla, position géographique assurant une parfaite jonction entre le littoral et la région des hauts plateaux ainsi qu'une meilleure liaison entre la région Ouest et celle de l'Est du pays. L'extraction porte uniquement sur les fleurs sèches (figure 4).



Figure 4 : Fleurs sèches de *Calendula algeriensis* utilisées dans l'extraction.

2.2.3 Méthode d'extraction

Nous avons utilisé l'entraînement à la vapeur d'eau pour extraire l'huile essentielle, dans cette méthode la matière végétale n'est pas en contact direct avec l'eau. Le montage expérimental est constitué d'un ballon rempli au deux tiers (2/3) d'eau puis chauffé à ébullition, la vapeur d'eau formée traverse la matière préalablement introduite dans une ampoule à décanter située juste au dessus du ballon.

La vapeur est condensée au niveau du réfrigérant et l'huile essentielle mélangée avec de l'eau est récupérée dans un bécher. L'huile essentielle est séparée par une extraction liquide-liquide à l'aide de l'éther diéthylique (figure 5).

Après avoir récupéré l'hydrolat, on le met dans une ampoule à décanter et on ajoute environ 20ml d'éther diéthylique (immiscible avec l'eau), après agitation et décantation, on obtient alors deux phases, une phase organique (l'huile dans l'éther diéthylique) et une phase aqueuse.

La phase organique est ensuite séparée et filtrée sur le du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) pour éliminer toute trace d'eau. Ensuite après évaporation de l'éther diéthylique, on récupère l'huile essentielle qui est stockée dans un petit flacon préalablement pesé.

Les conditions opératoires de l'extraction de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis* sont les suivants :

Quantité de matière végétale 60 g pour chaque manipulation.

Volume d'eau 800ml.

Temps de la distillation à vapeur : 1h30 à 2h.



Figure 5 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau

2.3 Résultats et discussions de l'extraction de l'huile essentielle

Nous avons effectué plusieurs expériences, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 4

Tableau 4 : Récapitulatif des expériences d'entraînement à la vapeur d'eau de l'H.E

	Masse du produit végétale (g)	Masse de l'huile essentielle (g)	Rendement (%)
08-03-2011	50	0.1405	0.281
05-04-2011	60	0.0979	0.163
11-04-2011	60	0.1123	0.187
12-04-2011	60	0.1454	0.242
19-04-2011	60	0.1603	0.267
21-04-2011	60	0.1288	0.214
02-05-2011	60	0.1296	0.216

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse de l'huile extraite et la masse de la plante sèche. Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\rho = \frac{MV(g)}{MHE(g)} \times 100 \text{ et le rendement moyen est donné par : } \rho_{\text{moy}} = \frac{\sum \rho}{7} = 0.224\%$$

Avec : M_V : masse de la matière végétale sèche

M_{HE} : masse de l'huile essentielle

$$\text{Calcul de l'incertitude absolue : } \Delta \rho = \frac{\rho_{\text{max}} - \rho_{\text{min}}}{\rho_{\text{moy}}} = \frac{0.281 - 0.163}{0.224} = 0.526$$

$$\rho = (0.224 \pm 0.526) \%$$

Le rendement des huiles essentielles des plantes appartenant au genre *Calendula* est généralement de l'ordre 0.13% à 0.97% [47]. Pour l'huile essentielle de *Calendula algeriensis*, nous avons trouvé que le rendement moyen est de 0.22%, la variation du rendement est attribuée aux conditions opératoires, la période de récolte et le lieu de récolte.

Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis* sont regroupées dans le tableau 5.

Tableau 5 : propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis* (fig 6)

Propriétés organoleptiques	
Aspect	Liquide mobile
Couleur	Jaune foncé
Odeur	intense
Masse obtenue	1,2925g
Rendement	0.22%

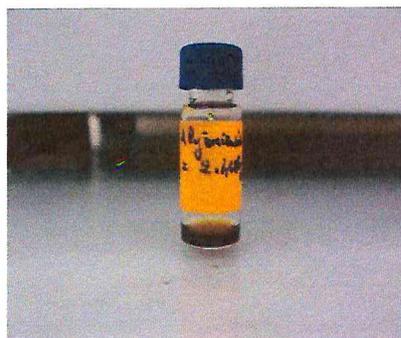


Figure 6 : Huile essentielle de *Calendula algeriensis*

2.4 Analyse de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Introduction

La spectrométrie de masse est utilisée depuis de nombreuses années pour l'élucidation de la structure de composés organiques simultanément avec d'autres techniques spectroscopiques comme l'infra-rouge ou la résonance magnétique nucléaire.

Cependant, jusqu'en 1966, il était généralement nécessaire d'isoler la substance pure par chromatographie gazeuse préparative, ce qui constitue une procédure très longue et nécessitant des quantités relativement importantes de substances.

Le développement important de la spectrométrie de masse dans l'identification des constituants des arômes et des huiles essentielles a été rendu possible grâce au couplage de la chromatographie en phase gazeuse directement avec la spectrométrie de masse.

Simultanément, il devenait possible d'obtenir un spectre de masse interprétable pour des quantités de substance qui allaient du microgramme au nanogramme. Ainsi, grâce à cette innovation importante, la spectrométrie de masse est devenue la technique la plus sensible pour obtenir des données importantes sur la structure de composés organiques inconnus [3,48].

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse est effectuée sur un chromatographe HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972, dans les conditions suivantes :

-Une colonne capillaire de type HP1 (polydiméthylesiloxane 100%), de longueur 30m d'un diamètre de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 μm .

-Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale à 70 eV.

-Le programme de température du four est : 90(10') à 210 (10') à raison de 3 °/mn

-Injection en mode Split : 1/90.

L'échantillon de l'huile essentielle est dilué dans l'AcOEt à 1%.

L'identification est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales de l'appareil (NBS 75k.1, Wiley 7n.1) ainsi que sur les données de la littérature concernant les produits purs isolés. Nous tenons à rappeler que NBS 75k est une banque comprenant les spectres de masse de 75000 molécules, celle de Wiley 7n comprend 250000 molécules.

Après une analyse CG/SM sur l'huile essentielle de *Calendula algeriensis*, nous avons obtenu le chromatogramme présenté dans la figure 7.

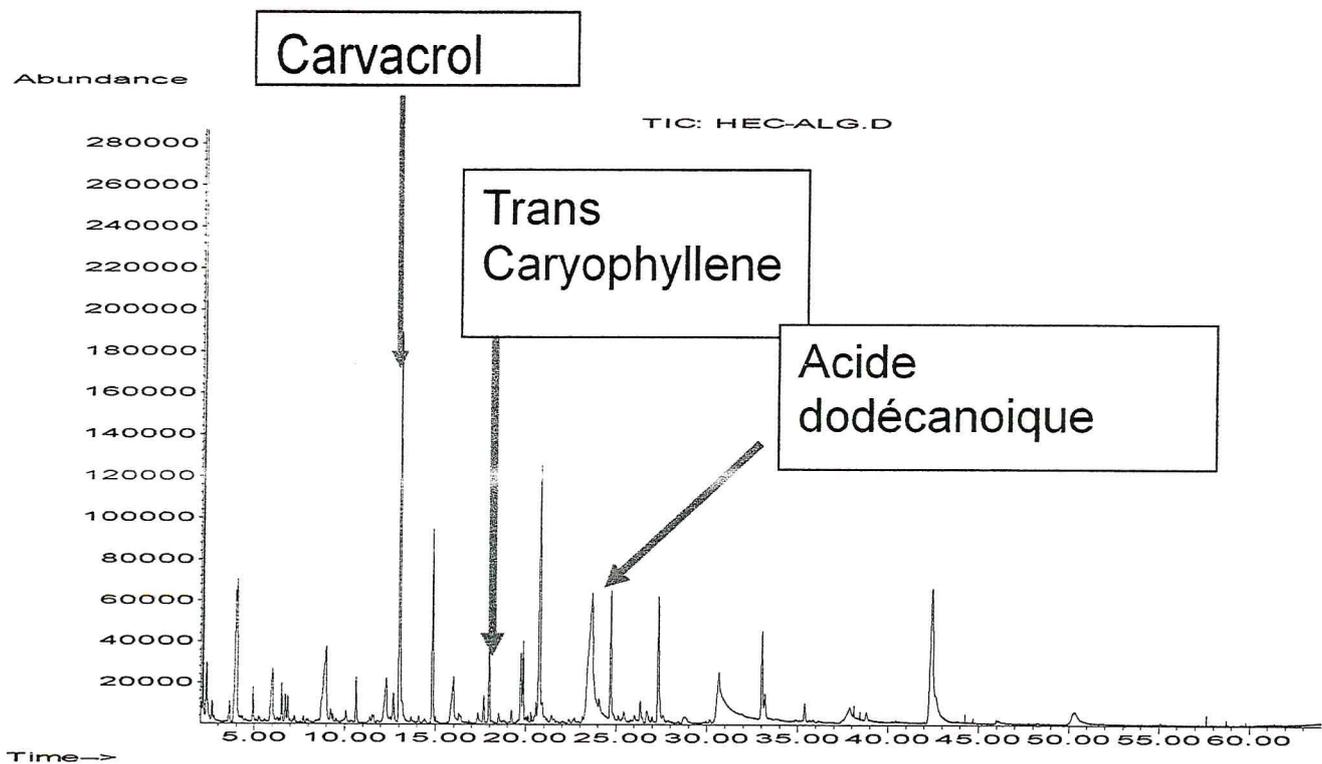
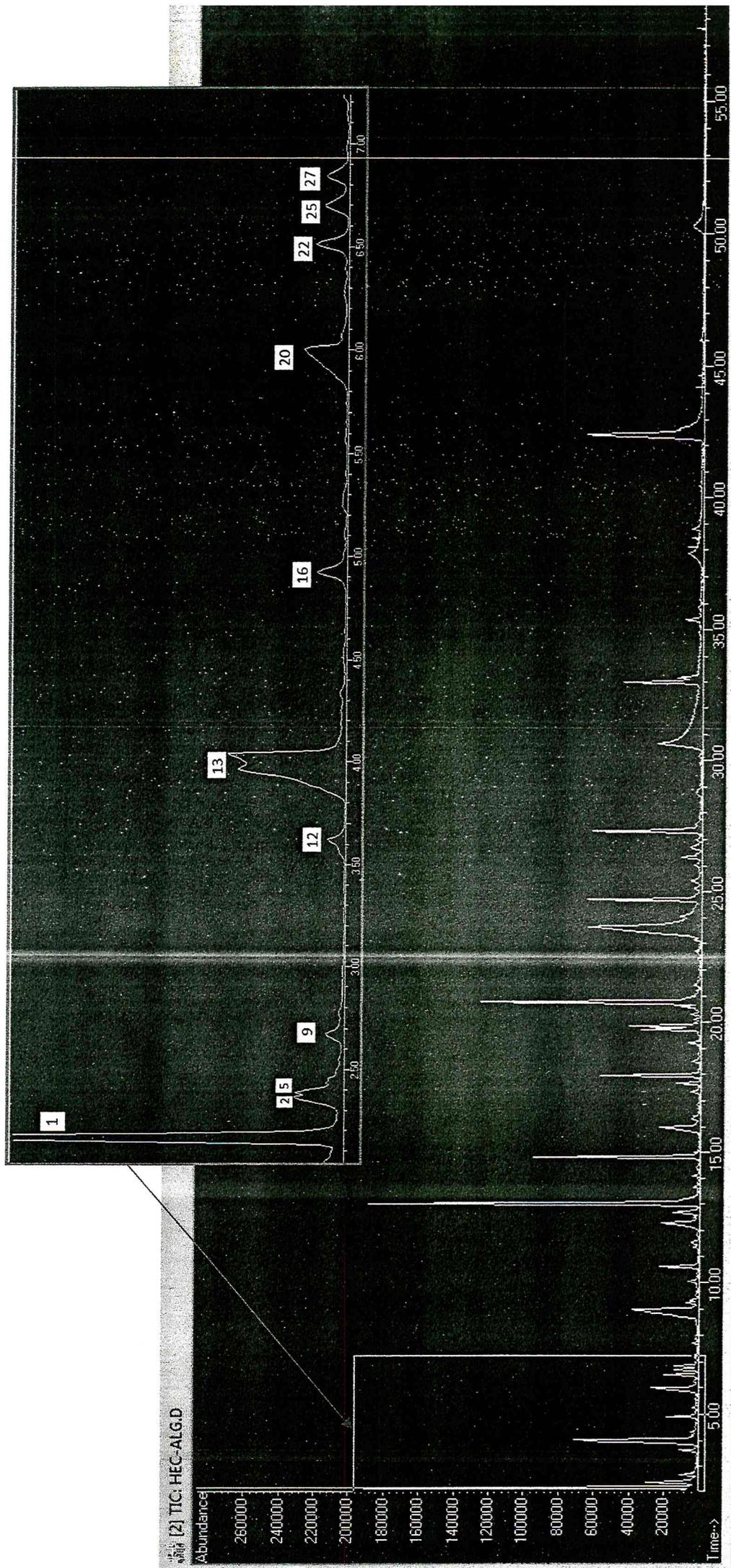
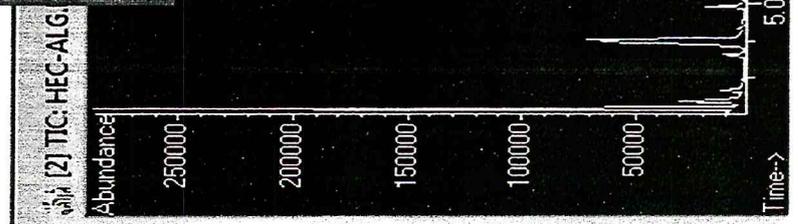
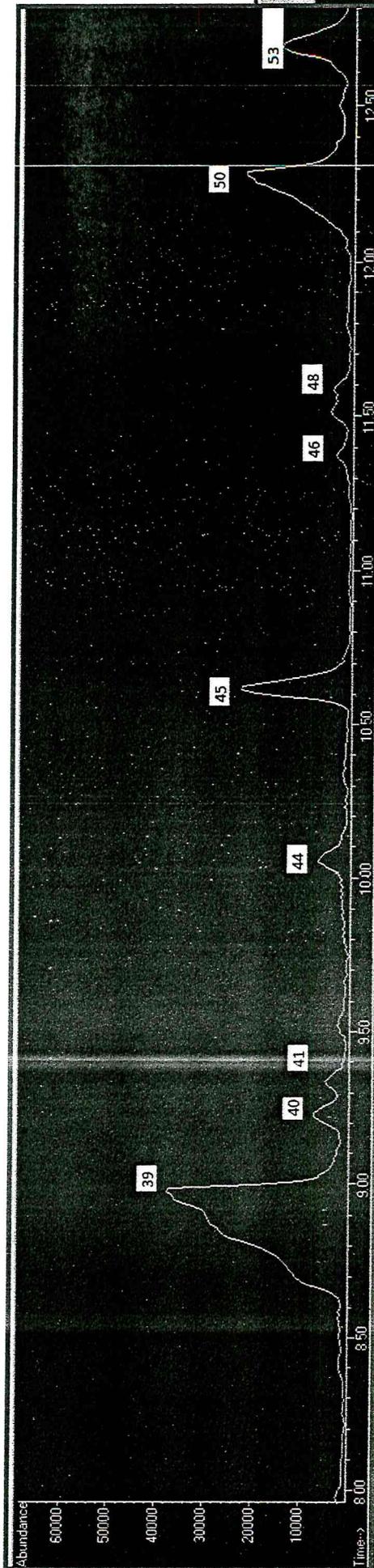


Figure 7 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis*

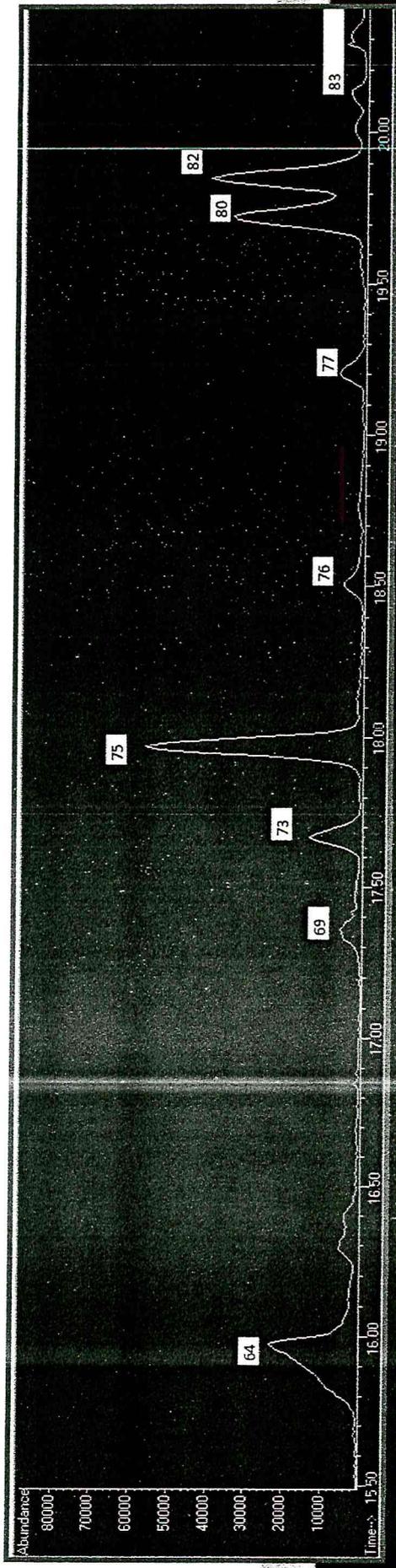
La figure 8 regroupe les différents agrandissements du chromatogramme.

Figure 8 : Différents agrandissements du chromatogramme

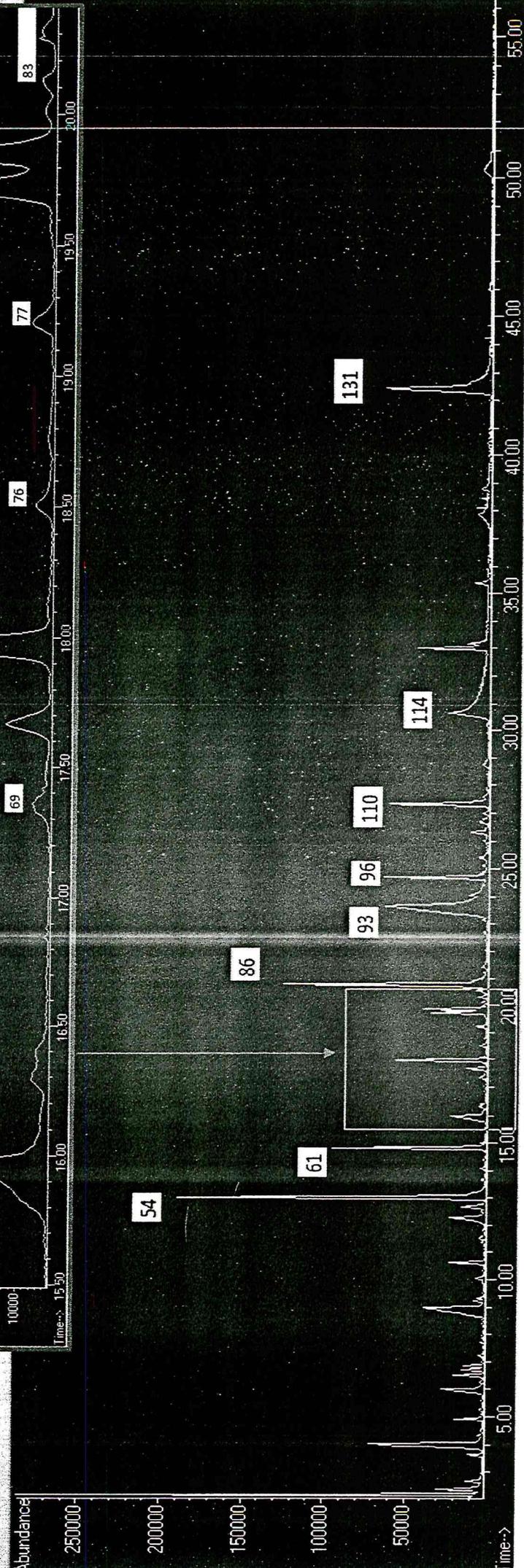


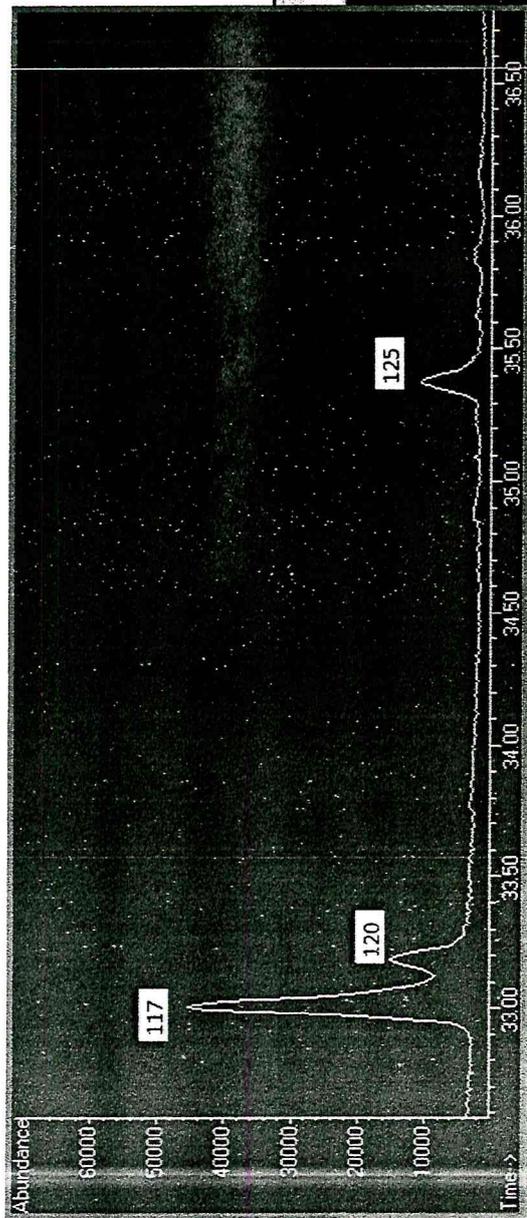


3.72

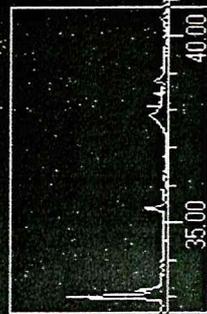
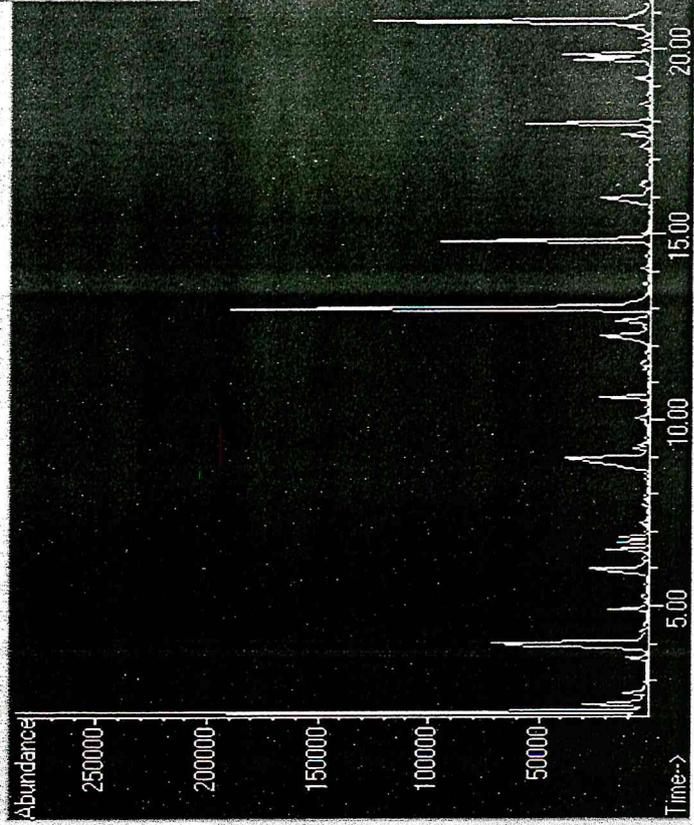


[2] TIC: HEC-ALGD





01/11/11 [2] TIC: HEC-ALGD



Le tableau 6 regroupe les produits identifiés, avec le temps de rétention, la formule brute et le pourcentage correspondant à chaque produit.

Tableau 6 : Composés identifiés : Temps de rétention, formule brute et le pourcentage

N° de composé	T _R (min)	Nom de composé	Formule	pourcentage %
1	2.163	4-methylpent-4-en-2-one (mesityloxyde)	C ₆ H ₁₀ O	6.62
2	2.344	2-furancarboxaldehyde (furfural)	C ₅ H ₄ O ₂	1.71
3	2.367	3-methyl acidebutanoïque (acide isovalérique)	C ₅ H ₁₀ O ₂	< 0.01
4	2.390	4-methyl-4-hydroxy-pentan-2-one (alcool diacetone)	C ₆ H ₁₂ O ₂	< 0.01
5	2.424	2-methyl acide butanoïque	C ₅ H ₁₀ O ₂	0.24
6	2.503	1,6,2,3-dianhydro-4-Oacetyl-β-D-gulopyranose	C ₈ H ₁₀ O ₅	< 0.01
7	2.548	2,2-Diisopropyltetrahydrofurane	C ₁₀ H ₂₀ O	< 0.01
8	2.560	Hexan-2-ol	C ₆ H ₁₀ O	< 0.01
9	2.673	Acide pentanoïque	C ₅ H ₁₀ O ₂	0.25
10	2.707	Acide butanoïque	C ₄ H ₈ O ₂	< 0.01
11	2.775	Acide-4-oxo-butan-2-oïque	C ₄ H ₄ O ₃	0.053
12	3.625	benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	0.40
13	3.999	Acide hexanoïque	C ₆ H ₁₂ O ₂	3.40
14	4.339	(E,E)- hexa di-2-ene-4-al	C ₆ H ₈ O	0.14
15	4.905	Benzene acetaldehyde	C ₈ H ₈ O	0.62
16	4.928	phenyloxirane	C ₈ H ₈ O	0.68
17	5.109	2-methyl-buta-1,3-diène	C ₅ H ₈	0.059
18	5.238	Phenol	C ₆ H ₆ O	0.16
19	5.563	benzophenone	C ₈ H ₈ O	0.066
20	5.902	Acide heptanoïque	C ₇ H ₁₄ O ₂	1.93
21	6.288	3-hexyne	C ₆ H ₁₀	0.13
22	6.402	Cis-cyclopent-4-ene-1,3-diol	C ₅ H ₈ O ₂	0.057
23	6.514	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0.65
24	6.560	Hotrienol	C ₁₀ H ₁₆ O	< 0.01
25	6.696	Benzene ethanol	C ₈ H ₁₀ O	0.53
26	6.798	1,3,5-cycloheptatriène	C ₇ H ₈	< 0.01
27	6.843	3,5,5-trimethylcyclohex-2-ene-1-one (isophorone)	C ₉ H ₁₄ O	0.47
28	6.860	2-cyclopenten-1-one	C ₅ H ₆ O	< 0.01
29	7.002	3-methyl-2,3-dihydrofurane	C ₅ H ₈ O	0.063
30	7.183	2-ethyl acide butanoïque	C ₆ H ₁₂ O ₂	0.069
31	7.217	2H-pyran-2-one (coumalin)	C ₅ H ₄ O ₂	< 0.01
32	7.228	Ketoisaphorone	C ₉ H ₁₂ O ₂	0.14
33	7.262	1-ethoxy but-1-ene-3-yne	C ₆ H ₈ O	< 0.01
34	7.274	4-penten-1-ol	C ₅ H ₁₀ O	< 0.01

35	7.704	2-methyl propen-1-one	C ₄ H ₆ O	0.09
36	7.863	(2Z,4E)hexa-2,4-dien-1-ol	C ₆ H ₁₀ O	0.059
37	7.965	2-methyl propen-1-one	C ₄ H ₆ O	< 0.01
38	7.976	2-methylene cyclohexanol	C ₇ H ₁₂ O	0.069
39	8.894	Acide octanoïque	C ₈ H ₁₆ O ₂	4.95
40	9.234	α , α -4-trimethyl-3-cyclohexene-1-methanol(camphene)	C ₁₀ H ₁₈ O	0.31
41	9.325	3,5-dimethyl phenol	C ₈ H ₁₀ O	0.16
42	9.359	1(2-furaylcyclopropyl)ethanone	C ₉ H ₁₀ O ₂	< 0.01
43	10.027	4-Propyl-4-cyclopentene-1,3-diene (oxide d'isopropyl)	C ₈ H ₁₀ O ₂	< 0.01
44	10.084	(exo)-1-(hydroxymethyl)-2-vinyl-2-methylcyclopentane	C ₉ H ₁₆ O	0.44
45	10.617	pulegone	C ₁₀ H ₁₆ O	0.97
46	11.376	3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene ou β - myrcene	C ₁₀ H ₁₆	0.14
47	11.387	Gamma-cis-sesquicyclogeraniol	C ₁₅ H ₂₀ O	< 0.01
48	11.580	Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	0.05
49	11.591	2,3-dimethyl-2-butene	C ₆ H ₁₂	< 0.01
50	12.282	Acide nonanoïque	C ₉ H ₁₈ O ₂	1.76
51	12.384	Acide octanoïque	C ₈ H ₁₆ O ₂	< 0.01
52	12.396	3,4-dihydro-5-methyl dihydrofuran-2-one	C ₅ H ₈ O ₄	0.05
53	12.724	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	0.85
54	13.019	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	9.84
55	13.166	1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)ethanone(Acetophenone, o-Acetyl-p-cresol)	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.59
56	13.223	4-hydroxy-2-methylacetophenone	C ₉ H ₁₀ O ₂	< 0.01
57	13.359	8,8-dimethyl-4-methylene-1-oxaspiro[2,5]oct-5-ene	C ₁₀ H ₁₄ O	< 0.01
58	14.107	3-methyl-6-(1-methylethylidene)2-cyclohexen-1-one (Piperitenone; Pulespenone; 3-Terpinolenone)	C ₁₀ H ₁₄ O	0.17
59	14.141	(+) - (1S, 5S)-2(10)-3-pinadien-4-ylacetate	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	< 0.01
60	14.401	Gamma-dodecalacetone	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0.17
61	14.821	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	4.27
62	14.945	Acide-2-methyl-methylester benzene acetique	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	< 0.01
63	15,002	6-methyl-5-(1-methylethyl)5-hepten-3-yn-2-one	C ₁₁ H ₁₆ O	< 0.01
64	15.943	Acide décanoïque	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1.91
65	16.260	3,4-dihydroxy tetrahydro-2-furanone	C ₄ H ₆ O ₄	0.14
66	16.384	1(7)4,8-O-menthatriene	C ₁₀ H ₁₄	< 0.01
67	16.396	4-acetyl-3-carene	C ₁₂ H ₁₈ O	0.16
68	16.441	(-)-elma-1,3,11(13)trien-12-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	< 0.01
69	17.359	Acetate de lyratyle	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	0.30

70	17.393	2-methylene cyclohexanol	C ₇ H ₁₂ O	< 0.01
71	17.518	5-methyl-2(5H)-furanone	C ₅ H ₆ O ₂	< 0.01
72	17.620	Acetate de terpineol	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	< 0.01
73	17.665	α-ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	0.50
74	17.914	(E,E)-α-farnesene	C ₁₅ H ₂₄	0.02
75	18.005	Trans-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	2.25
76	18.504	Acetate de geranyl	C ₁₃ H ₂₂	0.28
77	19.189	α-humulene	C ₁₅ H ₂₄	0.08
78	19.240	linalylacetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.33
79	19.671	4-(2,2,6-trimethyl-7-oxabicyclo[4,1,0]hept-1-yl)-3-buten-2-one(beta-ionone-5,6-epoxide)	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	< 0.01
80	19.716	Trans-β-ionon-5,6-epoxide	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	1.64
81	19.818	4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-3-but-2-one	C ₁₃ H ₂₀ O	< 0.01
82	19.852	β-ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	1.72
83	20.135	α-murolene	C ₁₅ H ₂₄	0.22
84	20.339	(3-methyl butyl)-oxirane	C ₇ H ₁₄ O	< 0.01
85	20.543	3,4-dimethyl-3-hexene	C ₈ H ₁₆	0.40
86	20.736	5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4H)benzofuranone	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	7.55
87	21.178	Epoxyde de trans-Z-α-bisabolene	C ₁₅ H ₂₄ O	0.55
88	21.439	Oxyde de trans-carvone	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	0.16
89	22.402	(-)-curcuhydroquinone	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	0.094
90	22.424	Oxyde de trans-limonene	C ₁₀ H ₁₆ O	< 0.01
91	23.127	Allyl-O-tolyether	C ₁₀ H ₁₂ O	< 0.01
92	23.138	(2E, 4E, 6Z, 8Z)-2,4,6,8-undecatetraene	C ₁₁ H ₁₆	< 0.01
93	23.388	Acide dodecanoique	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	11.69
94	24.317	α-D-glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.51
95	24.475	Methyl-α-D-ribofuranoside	C ₆ H ₁₂ O ₅	0.1
96	24.702	Dilapiole	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	2.60
97	24.747	Apiol	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	< 0.01
98	24.849	Acide decanedioique	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	< 0.01
99	25.110	E-farnesene	C ₁₅ H ₂₄	< 0.01
100	25.133	2,3-dihydro-4-oxo-β-ionone	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	< 0.01
101	25.144	alloaromdendrene	C ₁₅ H ₂₄	< 0.01
102	25.382	2-methyl-6-methylene-3,7-octadien-2-ol ou bien anitol	C ₁₀ H ₁₆ O	< 0.01
103	25.439	ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.34
104	25.484	(Z)-cis-α-bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	< 0.01
105	25.994	Gamma-elemene	C ₁₅ H ₂₄	< 0.01
106	26.017	(+)-2-acetyl-2-carene	C ₁₂ H ₁₈ O	< 0.01
107	26.266	Z-3,7-dimethyl-6,7-epoxy-2-en-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	< 0.01
108	26.345	Oxyde de bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0.6
109	26.663	Oxyde de (-)-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄ O	0.52
110	27.320	α-bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	3.10

111	27.467	Z-citral	C ₁₀ H ₁₆ O	< 0.01
112	27.501	(-)-elma-1,3,11(13)-trien12-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	< 0.01
113	27.569	β -simensol	C ₁₅ H ₂₂ O	0.28
114	30.538	Acide tetradecanoïque	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	3.10
115	32.838	D-mannoheptulose	C ₇ H ₁₄ O ₇	< 0.01
116	32.861	α-D-galactopyranoside	C ₇ H ₁₂ O ₅	< 0.01
117	32.952	2,6-heptadione	C ₇ H ₁₂ O ₂	< 0.01
118	33.008	2-pentadecanone	C ₁₅ H ₃₀ O	2.30
119	33.099	1-méthyl-6,7-dioxabicyclo[3,2,1]octane	C ₇ H ₁₂ O ₂	< 0.01
120	33.167	Delta-3-tetradecenol	C ₁₄ H ₂₈ O	0.68
121	33.235	Oxyrane de tetracyl	C ₁₆ H ₃₂ O	< 0.01
122	33.779	Méthyl-3,3-anhydro-α-D-galactopyranoside	C ₇ H ₁₂ O ₅	< 0.01
123	33.790	2,4,6,8-tetraméthyl-1-undécène	C ₁₅ H ₃₀	< 0.01
124	35.354	heptadécane	C ₁₇ H ₃₆	< 0.01
125	35.388	nonadécane	C ₁₉ H ₄₀	0.50
126	35.445	1-(2-hydroxy éthoxy)tridécane	C ₁₅ H ₃₂ O ₂	< 0.01
127	37.881	Acide n-hexadécanoïque	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.87
128	38.685	Isobutyl formate	C ₅ H ₁₀ O ₂	< 0.01
129	38.776	2-méthyl-octadécane	C ₁₉ H ₄₀	< 0.01
130	38.810	tétradécane	C ₁₄ H ₃₀	0.3
131	42.425	Hénicosane	C ₂₁ H ₄₄	7.67
132	50.120	2-décyl-oxyéthanol	C ₁₂ H ₂₆ O ₂	<0.01
133	50.2440	pentadécane	C ₁₅ H ₃₂	1.08

2.4.1 Résultats et discussions de l'analyse par CG/SM

L'examen du tableau 6, montre que la composition chimique de l'huile essentielle est dominée par les acides gras saturés et leurs dérivés. On constate la présence de la série des acides gras allant de l'acide butanoïque à l'acide hexadécanoïque. On note également la présence d'alcane lourds sous forme d'hydrocarbures et d'hydrocarbures oxygénés tels que les aldéhydes et les cétones.

La figure 9 montre la représentation de chaque classe dans la composition chimique de l'huile essentielle.

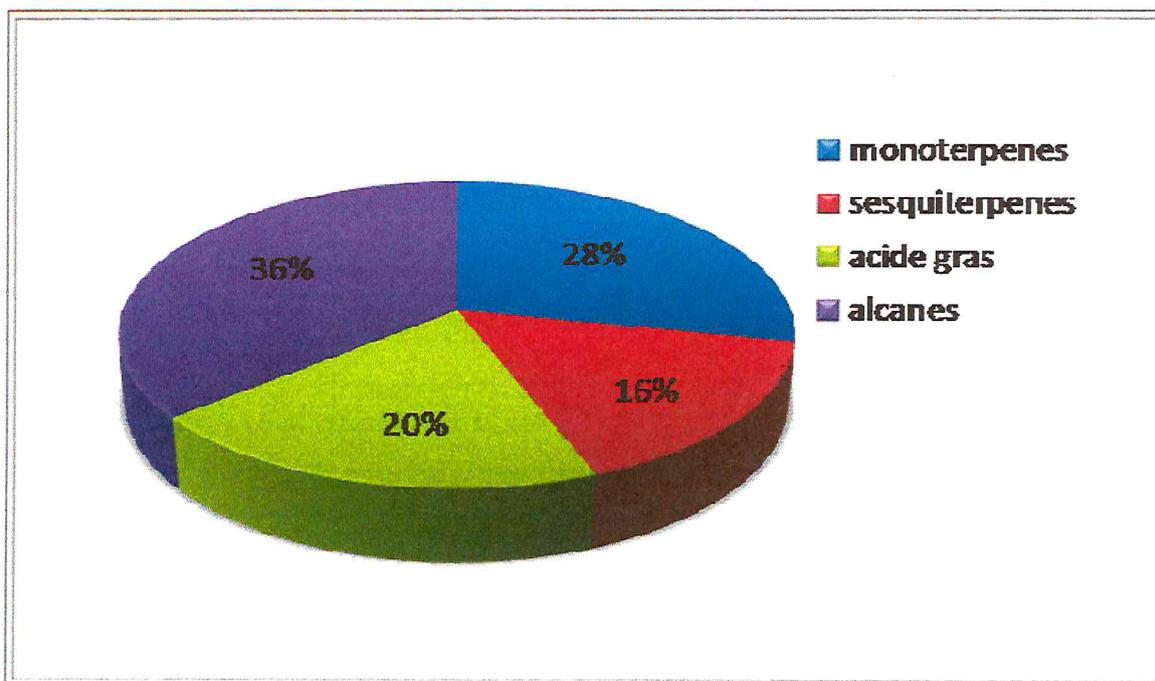


Figure 9 : Représentation de chaque classe dans la composition chimique de l'huile essentielle.

Les composés terpéniques constituent une partie importante de l'huile essentielle. Ils sont représentés par les monoterpenes oxygénés tels que le linalool, le carvacrol, l'eugenol, la pulegone, le β -myrcène, le thymol, l'anitol, le dilapiole, et les sesquiterpenes hydrocarbonés tels que la trans caryophyllene, l' α -humulene, l' α -murolene, le E-farnesene, l'alloomdendrene, et les sesquiterpenes oxygénés tels que l'époxyde de trans-Z- α -bisabolone, le α -bisabolol, le β -simensol, l'oxyde de caryophyllene.

Les monoterpenes sont représentés par les monoterpenes oxygénés en particulier le carvacrol qui représente comme spectre de masse le suivant (figure 10)

Abundance

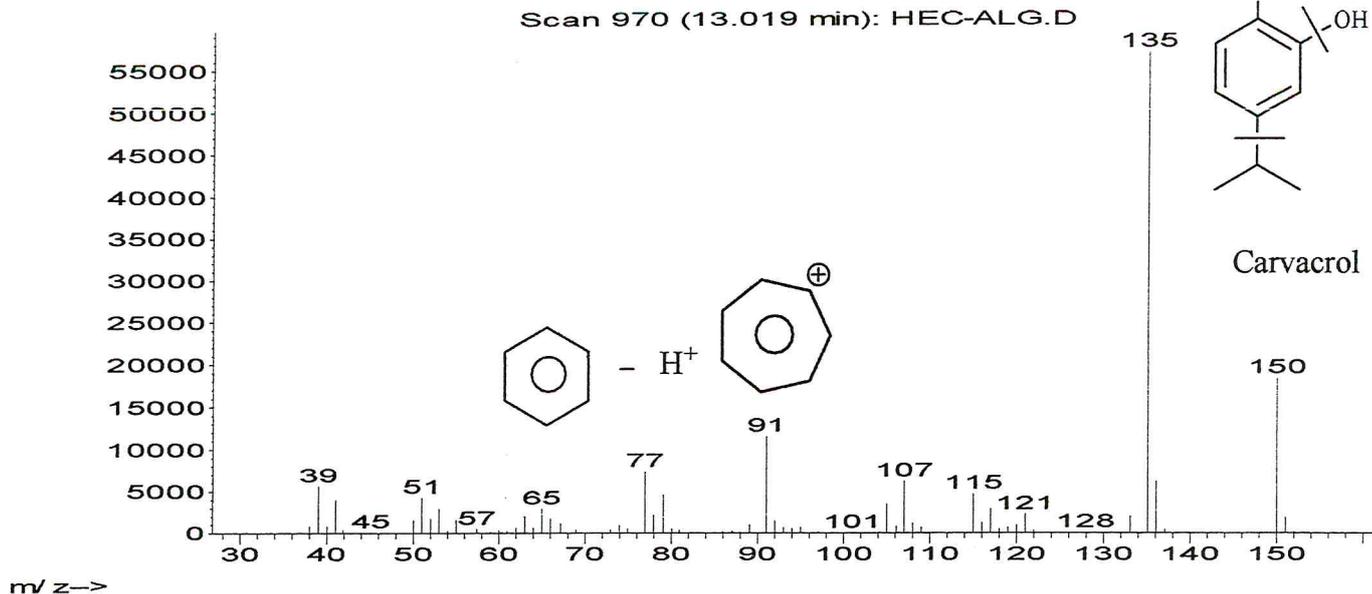


Figure 10 : Spectre de masse de carvacrol

Le carvacrol présente un pic de masse à 150, et un pic de base à 135 qui correspond à un départ de méthyle, on vérifie les autres fragmentations, à 91 on a un départ d'OH avec un réarrangement qui conduit à la formation du cation de tropyllum, et à 77 on a un cycle benzène moins un proton.

Les sesquiterpènes sont représentés par les sesquiterpènes hydrocarbonés tel que la trans caryophyllène qui représente comme spectre de masse le suivant (figure 11).

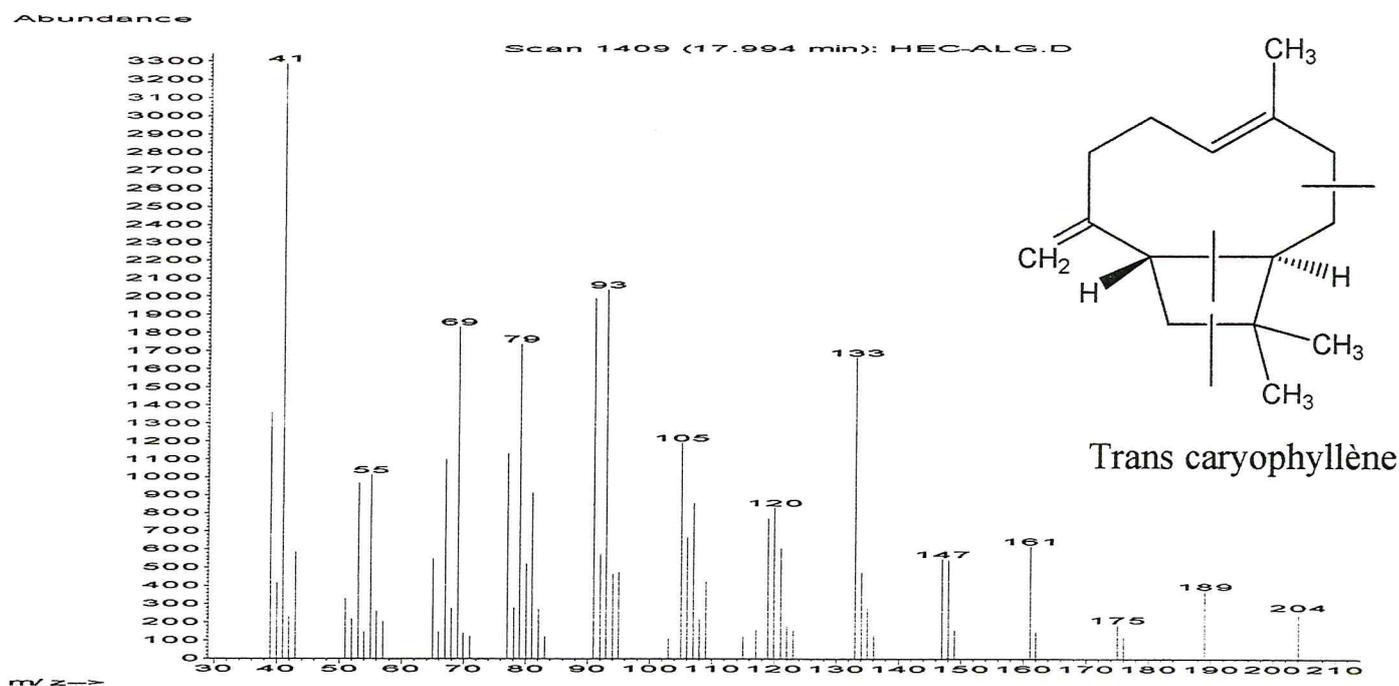


Figure 11: Spectre de masse de la Trans caryophyllène.

La Trans caryophyllène présente un pic de masse à 204 et un pic de base à 41, on vérifie les autres fragmentations, à 69 on a le départ de l'unité isoprénique, et à 133 correspond à $C_{10}H_{13}$

Pour les acides gras on a l'acide dodécanoïque comme produit majoritaire qui a comme spectre de masse le suivant (figure 12)

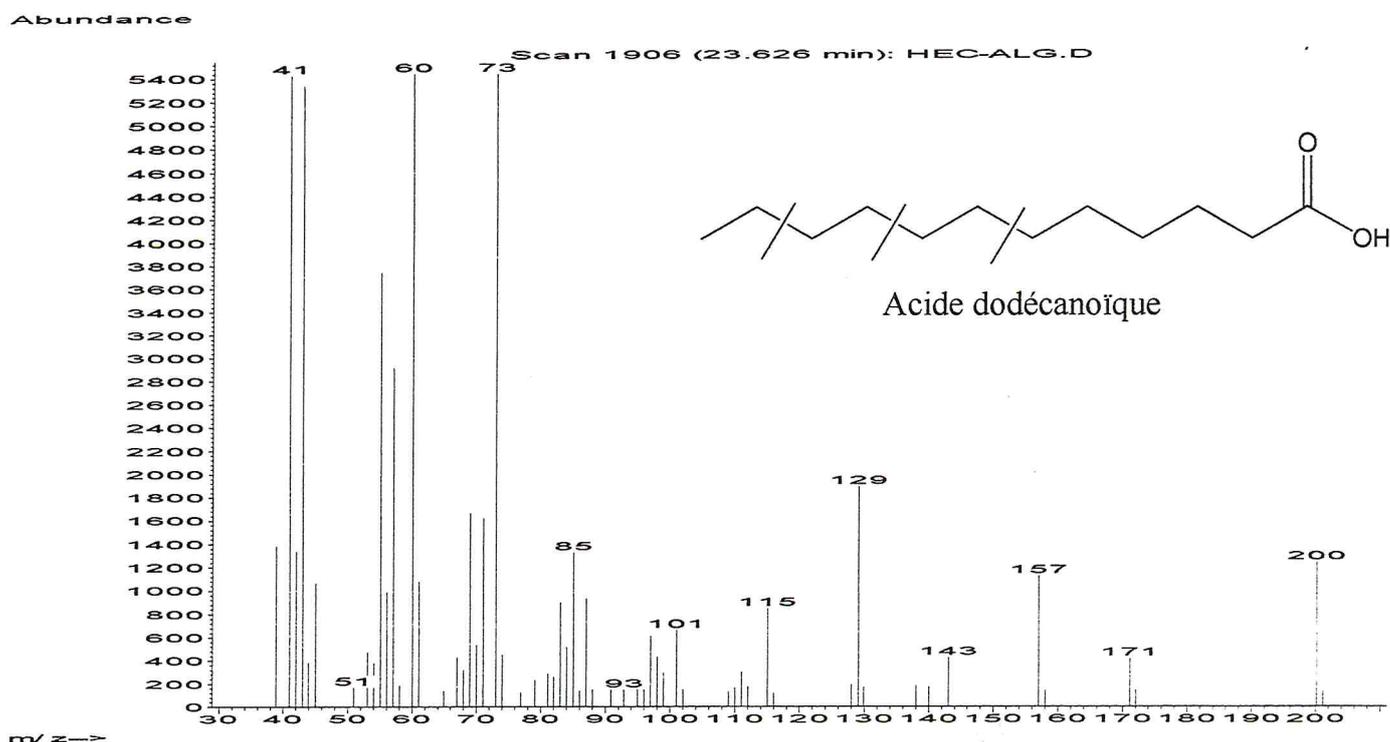


Figure 12 : Spectre de masse de l'acide dodécanoïque.

L'acide dodécanoïque a un pic de masse à 200 et un pic de base à 60 qui correspond à $C_2H_4O_2$ (réarrangement de MC Laffery), on vérifie les autres fragmentations, à 171 on a le départ d'un éthyle, à 157 le départ d'un propyle, à 143 le départ d'un butyle ainsi de suite.

Chapitre 3

Tests d'Activités Microbiologiques



3. Tests d'activités microbiologiques

a- L'effet bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît [49].

b- L'effet antifongique

Les antifongiques sont des substances qui manifestent un effet fongicide ou fongistatique. Ils sont efficaces sur les levures, les champignons. Ces composés sont efficaces contre les dermatophytes et les moisissures. Les antifongiques sont éventuellement bactéricides [49].

3.1 Matériels, réactifs chimiques, microorganismes et milieux de cultures

Les analyses antimicrobiennes ont été réalisées sur l'huile essentielle de *Calendula algeriensis* au niveau du laboratoire de microbiologie de l'hôpital FRANTZ FANON et l'hôpital FEROUJA.

Tout le matériel, les réactifs chimiques, les microorganismes et les milieux de cultures utilisés sont conformes aux normes d'analyses, ils nous ont été fournis par ce laboratoire.

3.1.1 Microorganismes étudiés

Dans cette étude, les microorganismes utilisés sont : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (les deux sont de Gram+), *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (les deux sont de Gram-). Quatre souches fongiques (*Candida tropicalis*, *Candida SP*, et deux autres levures) ont été utilisées et choisies pour leur résistance naturelle à divers types d'agents antimicrobiens.

Les différentes souches bactériennes sont des lots nommées « American Type Culture Collection (ATCC) », elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance. En revanche, les quatre souches fongiques citées sont prélevées des urines des patients.

3.1.2 Milieux de cultures: Mueller-Hinton, OGA (Gélose a base d'oxytétracycline).

3.1.3 Matériels et Solvants: Eau distillée, eau physiologique stérilisée, disques des huiles essentielles préparés a partir du papier buvard.

3.1.4 Préparation du milieu Mueller Hinton (M.H)

Une masse de 26 g d'agar nutritif est pesée puis dissoute dans 1l d'eau distillée, la solution obtenue est ensuite stérilisée à l'autoclave. Le milieu est refroidi, ensuite coulé (environ 25ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri jusqu'à solidification), les boîtes sont séchées sous laminoir (flux à air stérile).

3.2 Méthodes d'analyses

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Calendula algeriensis* a été testée par la méthode de diffusion sur disque vis-à-vis des microorganismes étudiés.

3.2.1 Test d'activité antibactérienne

3.2.1.1 Préparation des suspensions bactériennes

Nous avons prélevé sur une gélose nutritive quelques colonies de la bactérie à étudier à l'aide d'un fil de platine appelé anse Pasteur (figure 13) (cette méthode d'ensemencement s'appelle repiquage) et émulsionnées dans un tube en verre contenant 5 ml de l'eau physiologique, on mélange jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.

Avant de commencer ce prélèvement il faut stériliser l'anse, pour cela on doit la tenir verticalement sur le bec Bunsen, on place la boucle métallique dans la flamme, on attend jusqu'à ce qu'elle devienne rouge. La maintenir 5 secondes puis choisir une colonie de bactéries bien visible et la prélever avec la boucle métallique (figure 13).



Figure 13 : Prélèvement des colonies et flambage de l'anse

3.2.1.2 Ensemencement

On trempe un écouvillon stérile dans cette suspension, puis on étale sur le milieu Mueller-Hinton dans des boîtes Pétri déjà préparées. Il faut noter que toute l'opération s'est faite dans la zone stérile du bec Bunsen.

On dépose à la pince flambée sur le Mueller-Hinton ensemencée de la boîte Pétri des disques de papier buvard imbibés d'huile, on appui légèrement afin de faciliter l'adhérence.

On retourne les boîtes Pétri (pour éviter que l'eau de condensation dans la boîte Pétri perturbe la surface du milieu gélosé) et on les place dans cette position dans l'étuve à la température de 37°C, l'observation s'effectue après 24h (figure 14).

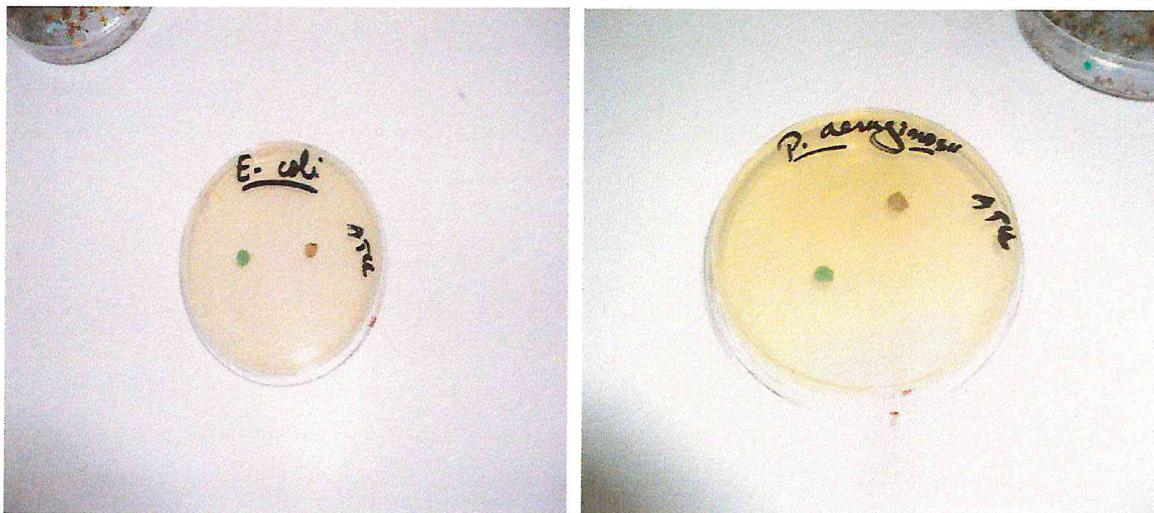


Figure 14 : Disposition des disques.

3.2.2 Résultat et discussion du pouvoir antibactérien

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de diffusion en puits en utilisant le milieu Muller-Hinton. L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits après 24h d'incubation à la température adéquate pour le développement du germe. Les résultats du test de l'effet antibactérien sont résumés dans le tableau 7

Tableau 7 : Evaluation de la zone d'inhibition en fonction de la nature de la souche

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Staphylococcus aureus	12
Echerichia coli	11
Enterococcus faecalis	8
Pseudomonas aeruginosa	- - -

L'huile essentielle de *Calendula algeriensis* présente une activité modérée dont les diamètres de zones d'inhibition n'ont pas dépassé les 20mm, l'activité la plus élevée a été remarqué contre la souche *Staphylococcus aureus* (12mm) et la souche *Echerichia coli* (11mm), une zone moyenne est obtenue avec la souche *Enterococcus faecalis* (8mm) (figure 15).



Figure 15 : Résultats du test d'activité antibactérienne.

Par contre nous avons remarqué que la souche *Pseudomonas aeruginosa* s'est montrée insensible à l'action de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis* (figure 16).

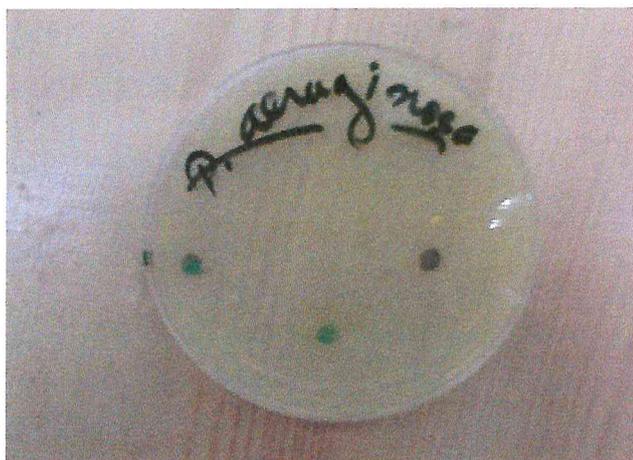


Figure 16 : Résultat de la souche *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.3 Activité antifongique

3.2.3.1 Préparation des suspensions

A partir d'une gélose sabouraud nous avons prélevé quelques colonies à partir des souches à étudier à l'aide d'une pipette pasteur et émulsionnées dans un tube en verre contenant 5 ml de l'eau physiologique, suivi d'un mélange jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

Avant de commencer ce prélèvement, il faut stériliser la pipette pasteur et refaire l'opération après chaque utilisation.

3.2.3.2 Ensemencement

Pour cela nous avons préparé quatre boîtes Pétri de milieu MH et quatre autres boîtes Pétri de milieu OGA. Ensuite, on verse environ 15 μ l de chaque suspension dans les deux milieux différents, réparti de façon uniforme pour assurer la répartition totale de la suspension dans la boîte Pétri, on laisse les boîtes Pétri pendant 10mn pour qu'elles se sèchent ensuite on dépose à la pince flambée sur le milieu MH et OGA ensemencée de la boîte Pétri des disques de papier buvard imbibés d'huile, on appui légèrement afin de faciliter l'adhérence.

On retourne les boîtes Pétri (pour éviter que l'eau de condensation dans la boîte Pétri perturbe la surface du milieu gélosé) et on les laisse dans cette position sur les paillasse à la température ambiante 25°C, l'observation s'effectue après 48h (figure17).

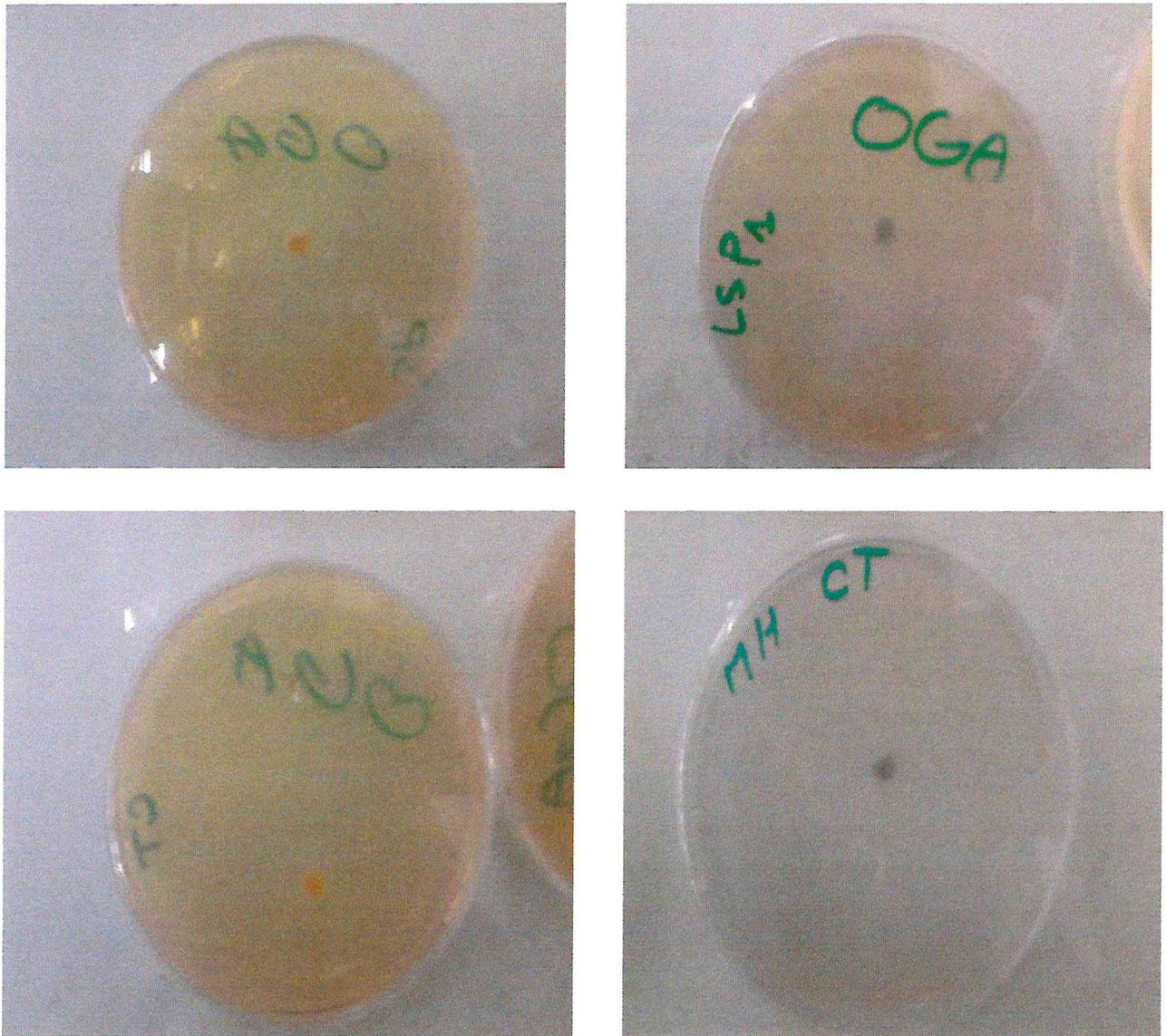


Figure 17 : Disposition des disques

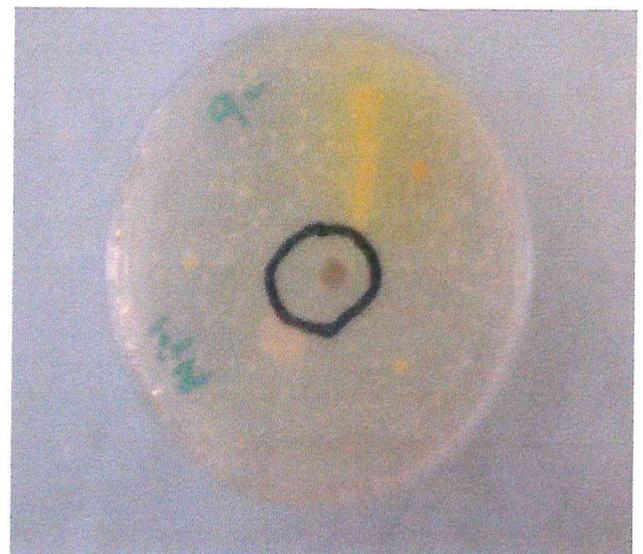
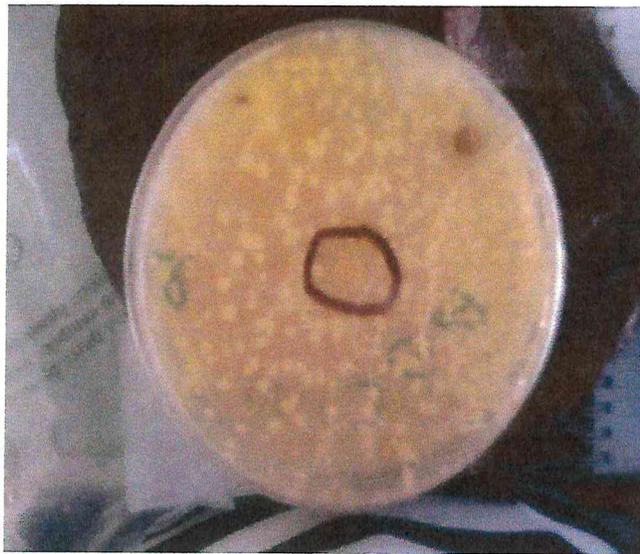
3.2.3.3 Résultat et discussion du pouvoir antifongique

L'évaluation *in vitro* de l'activité antifongique a été réalisée par la technique de diffusion en puits en utilisant le milieu Muller-Hinton et le milieu Gélose a base d'oxytetracycline (OGA). L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits après 48h d'incubation à la température adéquate.

L'huile essentielle de *Calendula algeriensis* montre une activité antifongique modérée contre le candidas SP et la levure, par contre nous avons remarqué que le candidas tropicalis s'est monté insensible à l'action de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis* (figure 18). Les résultats du test de l'effet antifongique sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Evaluation de la zone d'inhibition en fonction de la nature de la souche

Souches étudiées	Milieu MH (Diamètre de la zone d'inhibition (mm))	Milieu OGA (Diamètre de la zone d'inhibition (mm))
Candida tropicalis	---	---
Candida SP	23	18
Levure 1	---	12
Levure 2	---	---



Candida Sp dans le milieu OGA

Candida Sp dans le milieu MH



Levure 1 dans le milieu OGA

Figure 18 : Résultats du test d'activité antifongique.

Conclusion

Conclusion

Le présent travail consiste en une étude chimique et microbiologique de l'huile essentielle d'une plante médicinale algérienne endémique à savoir le *Calendula algeriensis*.

L'étude chimique des fleurs sèches de *Calendula algeriensis* a permis suite à une analyse par CG/SM d'étudier la composition chimique de l'huile essentielle. Cette dernière est dominée par les acides gras saturés et leurs dérivés. On constate la présence de la série des acides gras allant de l'acide butanoïque (0.24%) à l'acide hexadécanoïque (0.87%) avec l'acide dodécanoïque (11.69%) comme produit majoritaire. On note également la présence d'alcane lourds sous forme d'hydrocarbures et d'hydrocarbures oxygénés tels que les aldéhydes et les cétones. La présence de ces produits est couramment rencontrée dans les huiles essentielles de plantes terrestres. L'huile essentielle renferme également une partie importante de produits terpéniques représentés par les monoterpènes et les sesquiterpènes.

Les principaux monoterpènes rencontrés sont le carvacrol (9.84%), le 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl(2H)benzofuranone (7.55%), l'eugénol (4.27%), le dilapiol (2.60%), la β ionone (1.72%). La classe des sesquiterpènes est représentée en particulier par le α -bisabolol (3.10%) et la trans caryophyllène (2.25%).

L'huile essentielle du *Calendula algeriensis* a manifesté une activité modérée antibactérienne vis-à-vis des souches *Staphylococcus aureus* et *Echerichia coli* et une faible activité vis-à-vis de la souche *Enterococcus faecalis*, également, elle a montré aussi une certaine activité vis-à-vis des candidas SP et de deux levures mais par contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* et le candidas *tropicalis* se sont montrés insensibles à l'action de l'huile essentielle de *Calendula algeriensis*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] J. Kühnau, Wld. Rev. Nutr. Diet. Vol. 24, pp 117-191, 1976.
- [2] O. TOUAFEK, Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud Algériens. Thèse doctorat. Université Mentouri- Constantine, faculté des sciences exactes, département de chimie, Avril 2010.
- [3] T. MALLEM. Etude phytochimique de l'exsudat et des huiles essentielles de l'espèce *Inula crithmoides*. Thèse de magister. Université Mentouri Constantine, 2004.
- [4] R. SEGHIRI, Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*, thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine, 1999.
- [5] J. MALAURIE, Terre mère - Fiches sur les plantes, Ed CNRS, 2008.
- [6] J. Kathi. Kemper, MD, MPH, *Calendula (Calendula officinalis)*, The Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research, pp 1-13, 1999.
- [7] KR. Kirtikar, BD. Major Basu. Indian Medicinal Plants, Deharadun, India, International Book Distributor, Vol. II, pp 1413-1414, 1993.
- [8] CP. Khare. Encyclopedia of Indian Medicinal Plants. Germany, Springer-Verlag Publisher, pp 116-117, 2004.
- [9] J. Duval., Ecological Agriculture Projects, McGill University. Novembre 1993, pp 350.
- [10] K. BOGUSLAW. Pentacyclic triterpenetriols from *Calendula officinalis*. Phytochemistry, 24(12), 3066-3067, 1985.
- [11] R. STEVENSO. Some Constituents of *Calendula officinalis*. Journal of natural product, Vol 26, pp 5228-5230, 1961.
- [12] L. DANIELSKI, L. CAMPOS, L. BRESCIANI, H. HENSE, A. ROSENDO. B. YUNES S. Ferreira Marigold (*Calendula officinalis L.*) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile Chemical Engineering and Processing, 46, pp 99-106, 2007.
- [13] A. AHMED. JAKVPOVIC, J. TOM, Sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. Journal of Natural Products, 56, pp 1821-1829, 1993.
- [14] C. PIZZA, Z. ZHONG-LIANG, N. TOMMAS, Plant metabolites. Triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. Journal of Natural Products, 50(5), pp 927-931, 1987.
- [15] H. NEUKIRCH, M. D'AMBROSIO, J. DALLA, A. GUERRIERO, Simultaneous Quantitative Determination of Eight Triterpenoid Monoesters from Flowers of 10 Varieties of *Calendula officinalis L.* and Characterisation of a New Triterpenoid Monoester. Phytochemical analysis. Anal. 15, pp 30-35, 2004.

- [16] M. HAMBUEGER, S. ADLER, D. BAUMANN, A. FORG, B. WEINREICH Purification préparatoire des esters anti-inflammatoires principaux de triterpénoïde de Souci (*Calendula officinalis*) fitoterapia, 74, pp 328–338, 2003.
- [17] A. Förg, G. Leupold, H. Parlar, B. Weinreich, S. Grüner, F. Otto, Supercritical Fluid Extraction of *Calendula officinalis* L in Combination with Adsorptive Clean-up, journal of Eng. Life Sci. 2, pp 79-82, 2002.
- [18] C. SINDHU, Phytochemical screening of *Calendula officinalis* linn leaf extract by TLC. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy (IJRAP), 1(1), pp 131-134, 2010.
- [19] L. PETROVI, I. LEPOJEVI, V. SOVILJ, D. ADAMOVI, V. TEEVI, An investigation of CO₂ extraction of marigold (*Calendula officinalis* L.). Journal Serbian of Chemistry Society (JSCS), 72(4), pp 407–413, 2007.
- [20] Z. KASPRZYK, B. WILKOMIRSKI, structure of new a triterpenetriol from *Calendula officinalis* flowers. Phytochemistry, 12, pp 2299- 2300, 1973.
- [21] M. Silvio. Lavagna, D. Secci, P. Chimenti, L. Bonsignore, A. Ottaviani, B. Bizzarri, Efficacy of Hypericum and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean. Il Farmaco, 56, pp 451–453, 2001.
- [22] K. CHANDRAN PREETHI, G. KUTTAN, R. KUTTAN, Activité anti-inflammatoire de l'extrait de fleur du *Calendula officinales* et son mécanisme possible d'action. Indian journal of Experimental biology, 47, pp 113-120, February 2009.
- [23] Z. WQJCIECHOWSKI, M. BOCHE&KA-HRYNIEWICZ, B. KUCHARCZAK, Z. KASPRZYK, sterol and triterpene alcohol esters from *Clendula officinalis*. Phytochemistry, 11, pp 1165- 1168, 1971.
- [24] D. Mooney, E. Antignac, E. Dufour, I. Bark, V. Srinivasan, G. Nohynek, Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of *Calendula* flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. Food and chemical toxicology, 47, pp 1246–1254, 2009.
- [25] E. VIDAL-OLLIVIER, G. BALANSARD, R. FAURE, A. BABADJAMIA, Revised structure of triterpenoid saponins from the flowers of *Calendula officinalis*. Journal of natural products, 52(5), pp 1156-1159, 1989.
- [26] M. Ukiya, T. Akihisa, K. Yasukawa, H. Tokuda, T. Suzuki, Y. Kimura, Anti-Inflammatory, Anti -Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flower. Journal of Natural Products, 69, pp 1692-1696, 2006.
- [27] A. Szakiel, W. Janiszowska, The mechanism of oleanolic acid monoglycosides transport into vacuoles isolated from *Calendula officinalis* leaf protoplasts. Plant physiology and biochemistry, 40, pp 203–209, 2002.

- [28] S. KISHIMOTO, T. MAOKA, K. SUMITOMO, A. OHMIYA. Analysis of carotenoids in composition in petals in *Calendula* [*C. officinalis*] biotechnol 69(11), pp 2122-2128, 2005.
- [29] E. Bako, J. Deli, G. Toth, HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. Journal of biochemical and biophysical methods, 53, pp 241–250, 2002.
- [30] M. Albulescu, N. Alexa, C. Cojan. *Calendula officinalis* flowers source of extract with antioxidant activity. Annals of West University of Timisoara Series Chemistry, 13(2), pp 169-176, 2004.
- [31] A. Bilia, M. Bergonzi, S. Gallori, G. Mazzi, F. Francesco Vincieri, Stability of the constituents of *Calendula*, Milk-thistle and Passion flower tinctures by LC-DAD and LC-MS, journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 30, pp 613–624, 2002.
- [32] S. Gordan, C. Cetkovi, M. Sonja Djilas, M. Jasna Canadanovi. C. Brunet, T. Vesna Tumbas, Antioxidant properties of marigold extracts. Food research international 1 (37), pp 643–650, 2004.
- [33] G. ADLER, Z. KASPRZYK, Free sterols, sterol ester, glucosides, acylated glucosides and water-soluble complexes in *Calendula officinalis*. Phytochemistry, Pergamon press .14, pp 627-634, 1974.
- [34] G. ADLER, Z. KASPRZYK, the incorporation of mevalonate -[2-¹⁴C] into the sterol fractions of *Calendula officinalis*. Phytochemistry, 14, pp 723-726, 1974.
- [35] C. PIZZA, N. TOMMAS. Sesquiterpene glucosides based on the al loromadendrane skeleton from *Calendula arvensis*. Phytochemistry, 27(7), pp 2205-2208, 1988.
- [36] N. TOMMAS, C. PIZZA. Structure and in vitro antiviral activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula*. Journal of Natural Products, 53(4), pp 830-835, 1990.
- [37] COSMO, N. TOMMAS. Plants metabolites. A new sesquiterpene glucoside from *Calendula arvensis*. Journal of Natural Products. 50(5), pp784-789, 1987.
- [38] R. CHEMLI, A. BABADJAMIAY R. FAURE, K. BOUKEF, G. BALANSARD, E. VIDAL, arvensid A and B, triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. Journal of Phytochemistry, 26(6), pp1781-1788,1987.
- [39] Z. Cristina Gazim, C. Moraes Rezende, S. Regina Fraga, B. Prado Dias Filho, C. Nakamura, D. Aparicio Garcia Cortez, Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. Brazilian journal of pharmaceutical sciences. 44(3), pp 391-395, 2008.
- [40] Z. Cristiane Gazim, C. Rezende, S. Fraga, T. Estivaleti Svidzinski, D. Aparicio Garcia Cortez, Activité antifongique d'huile essentielle de *Calendula officinale* L (ASTERACEAE) s'élevant au BRÉSIL. Journal brésilien de microbiologie, 39, 61-63, 1517-8382, 2008.

- [41] N.Y. Naguib, M.Y. Khalil, El Sherbeny. A Comparative Study on the Productivity and Chemical Constituents of Various Sources and Species of *Calendula* Plants as Affected by Two Foliar Fertilizers. *Journal of applied sciences research*, 1(2), pp 176-189, 2005.
- [42] J. Paolini, T. Barboni, J. Desjobert, N. Djabou, A. Muselli, J. Costa, Composition chimique, Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. *Biochemical systematics and Ecology*, 38, pp 865–874, 2010.
- [43] M. Fronza, B. Heinzmann, M. Hamburger, S. Laufer, I. Merfort, Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of ethnopharmacology*, 126, pp 463–467, 2009.
- [44] J. VARLJEN, A. LIPTAK, H. WAGNER, Structural analysis of rhamnorabinogalactan and arabinogalactans with Immunostimulating activity from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*, 28(9), pp 2379-2383, 1989.
- [45] E. Jiménez-Medina, A. Garcia-Lora, L. Paco, I. Algarra, Antonia, Collado, F. Garrido, A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *Journal of Biomed Central*, 6(119), pp 1-14, 2006.
- [46] R. Elias, M. Meo, E. Vidal-Ouivier, M. Laget, G. Balansard, G. Dumenil, Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L. *Mutagenesis*, 5(4), pp 327-331, 1990.
- [47] B. Muley, S. Khadabadi, N. Banarase, Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (5), pp 455-465, 2009.
- [48] J. PAOLINI. Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux astéracées endémiques de Corse : *Eupatorium*, *cannabinu*. *Corsicum* et *Doronicum*. Thèse de doctorat. Université de CORSE PASCAL PAOLI, Faculté des sciences et techniques, 2010.
- [49] N. BOUDJEMAA, L'effet antibactérien de *Nigella sativa*, these de doctorat, faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre de l'université KASDI MERBAH – OUARGLA, 1999.
- [50] F. Leduc, Les médecines douces: alternatives ou compléments à la médecine traditionnelle, *Santé mentale au Québec*, 2, pp 160-174, 1986.
- [51] Brian M. Tissue, COURS DE CHROMATOGRAPHIE (Master de Chimie 1ère année) Faculté des Sciences d'Orsay, université HALLAM, 2009.
- [52] M. EL ATYQY, *Microbiologie générale*, pp 1-10, 2007.

Annexes

Annexes

1- Médecine alternative : médecine qui diffère de la médecine officiellement reconnue et qui emploie d'autres formes de thérapeutiques : phytothérapie. Médecine douce qui exclut l'utilisation de tout produit pharmaceutique plus précisément qui n'utilisent pas de substances synthétiques pharmaceutiques, ni de chirurgie elle se base dans ses traitements sur l'utilisation exclusive de moyens naturels [50].

2- Mode split/splitless : L'injecteur standard (95% des appareils en sont équipés) d'un chromatographe avec colonne capillaire est du type "split/splitless". C'est à dire que l'on peut ajuster la quantité de produit passant dans la colonne par rapport à la quantité injectée dans le chromatographe. Cet ajustement se fait à l'aide d'une vanne. Si on injecte un microlitre de produit (1 μl) et que seulement 0,01 μl rentre dans la colonne, on a un "split" de 100 et 0,99 μl de la solution a été évacué à l'extérieur via la vanne de "split".

En revanche, si l'on dispose d'un produit très minoritaire ou très dilué dans un solvant, on peut choisir de l'injecter en mode "splitless", dans ce cas tout le produit injecté se retrouve dans la colonne. Il faut dans ce cas baisser la température du four vers 20-30°C sous la température d'ébullition du solvant et dans certain cas couper ou déconnecter le détecteur pendant l'élution du solvant [51].

3- Les microorganismes constituent un groupe très diversifié, ils existent à l'état de cellule isolée ou en groupe. Ils sont aussi désignés sous le nom de « microbes » qui est un terme générique et non scientifique visant les bactéries, levures, moisissures, algues, protozoaires et virus, pathogènes ou non. Familièrement, le mot « microbe » désigne un micro-organisme responsable d'une maladie [52].

4- Les bacteries (Bacteria) sont des micro-organismes vivants unicellulaires procaryotes. Elles mesurent quelques micrometres de long (generalement de 0,5 a 5 μm de longueur) et peuvent presenter differentes formes : des formes spheriques (coques), des formes allongees ou en batonnets (bacilles) et des formes plus ou moins spiralees (Spirilles).

5- En fonction de leur paroi cellulaire, les bactéries peuvent être divisées en deux groupes : les Gram positifs (Gram+) et les Gram négatifs (Gram-). Cette différenciation est basée sur la structure et la composition chimique de la paroi cellulaire mise en évidence grâce à la

coloration de Gram. Les bactéries à coloration de Gram⁺ possèdent une paroi cellulaire épaisse alors que les bactéries à coloration de Gram⁻ ont une paroi fine [52].

6- Les champignons sont des organismes eucaryotes apparentés aux végétaux, mais qui s'en distinguent, en particulier, par leur mode de nutrition non photosynthétique.

Les champignons ont des formes de vie très variées. Les plus simples sont unicellulaires, mais la plupart sont pluricellulaires. Ils se nourrissent des matières organiques de leur environnement en sécrétant des enzymes qui « digèrent » les divers composés organiques qui les entourent et les réduisent en petites molécules solubles [52].

6.1 Moisissures: On trouve des moisissures dans deux grands groupes de champignons, les zygomycètes (champignons inférieurs) et les ascomycètes (champignons supérieurs). Chez les premiers, les hyphes (les filaments qui constituent le mycélium) ne sont pas cloisonnés ; ils le sont chez les seconds [52].

6.2 Levures : Les levures sont des champignons généralement unicellulaire (certaines levures sont cependant capables d'arborer un aspect pseudo pluricellulaire) aptes à provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales [52].

Pseudomonas aeruginosa

C'est une bactérie rependue dans la nature. Il vit dans l'eau et sur le sol, on le trouve aussi dans l'environnement hospitalier, surtout dans les endroits humides de lavabos, savons liquides, humidificateur, solution d'antiseptiques (chlorhexidine chlorure de benzelkonium, cétrimide notamment). *Pseudomonas aeruginosa* se trouve dans le tube digestif et plus rarement dans la saline [49].

***Escherichia coli* (colibacille)**

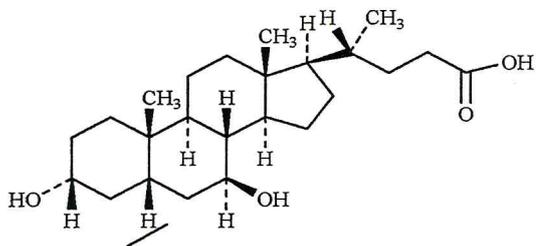
Bacille à gram négatif apparentant à la famille des Entérobactérie .E coli se développe sur gélose ordinaire. Indole⁺, urée-fermente le lactose, gazogène, mais ne produit pas d'acétine.

E. coli est une hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux.

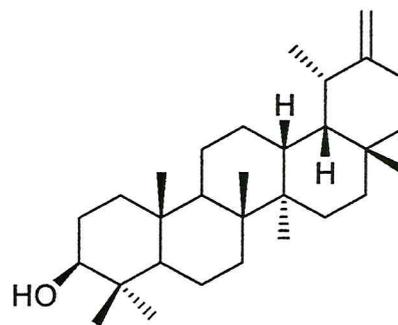
Chez l'homme, il est présent à raison de 10⁸ à 10¹⁰ bactéries /g de selles, densité cependant très inférieure à celle des anaérobies qui constituent la flore dominante. La présence d'*E. coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale [49].

Staphylococcus aureus

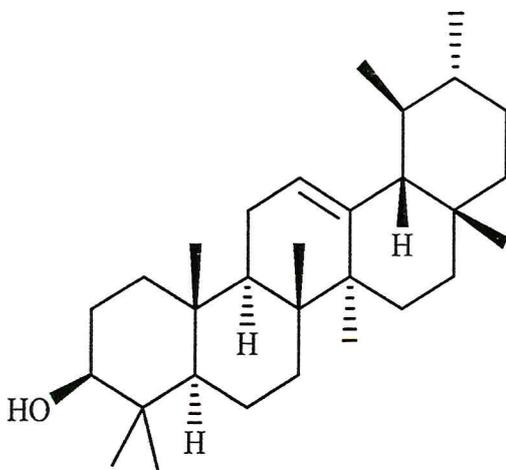
C'est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. On le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles au niveau du Périnée ou des aisselles [49].



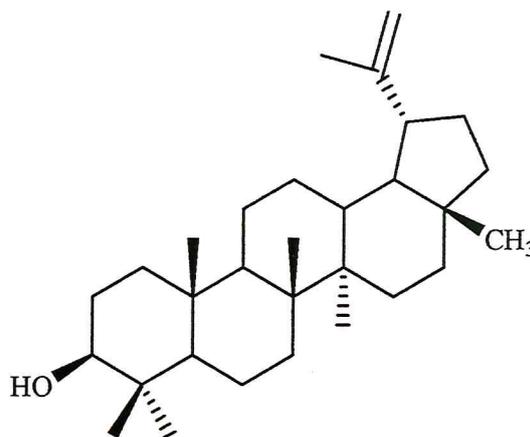
B1: α -amirin



B2: Taraxasterol

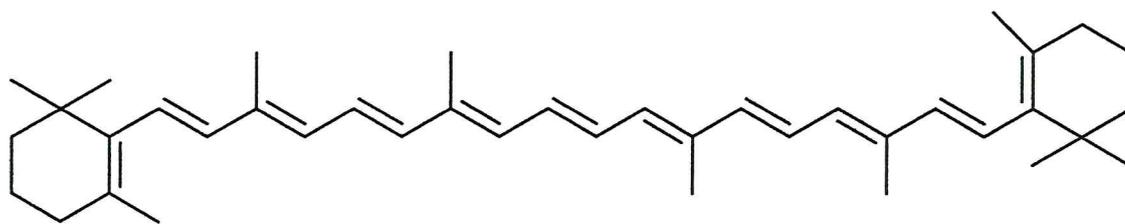


B3: Ursadiol

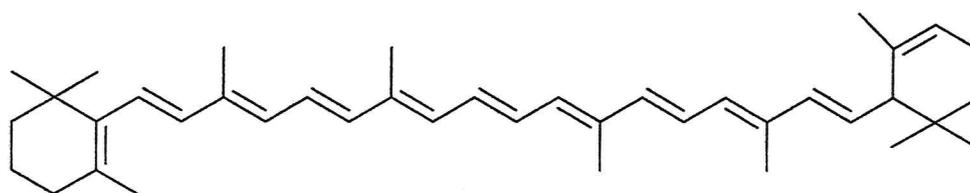


B4: Lupeol

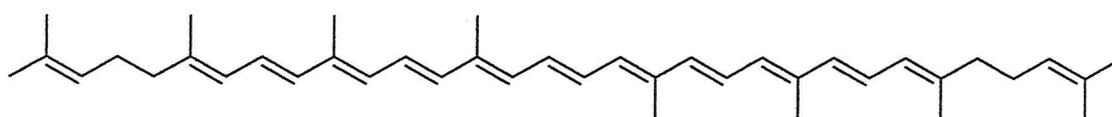
PLANCHE A : Structure des triterpenoides isolés de *C. officinalis*



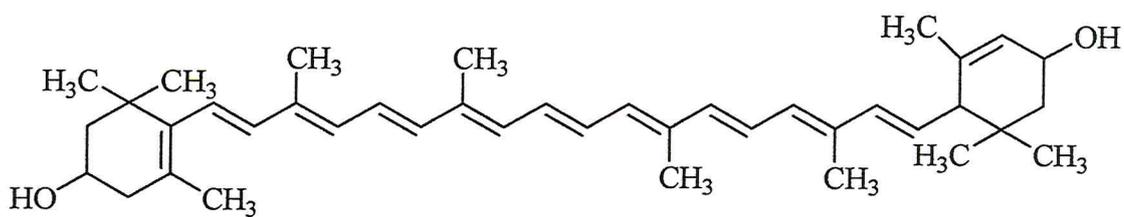
β -Carotene



α -Carotene

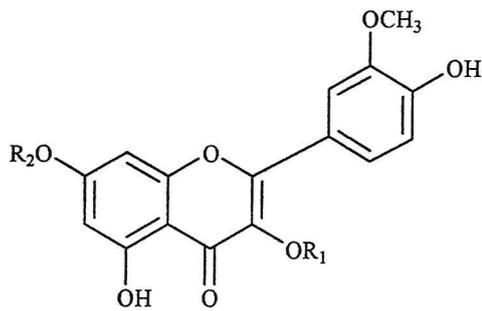


Lycopene

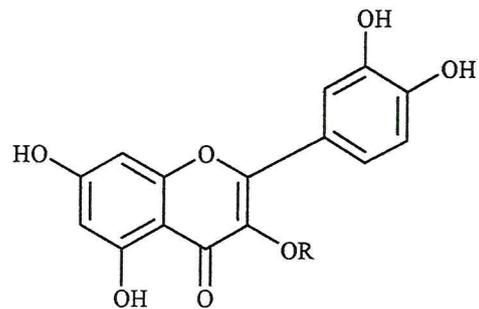


Lutein

PLANCHE A : Structure des différents caroténoïdes isolés du *C. officinalis*

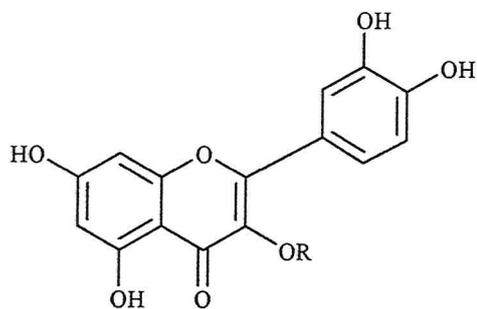


D1: Rutine



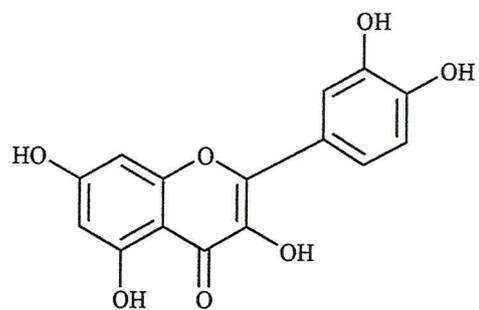
D2: R= Glu

Quercetin 3O-glucoside



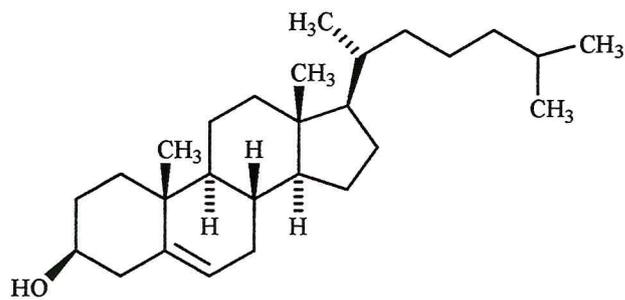
D3: R= Rha(1 → 6) glu

Quercetin 3-O-rutinoside

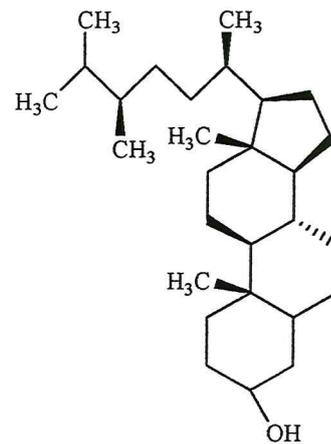


D4: Quercetine

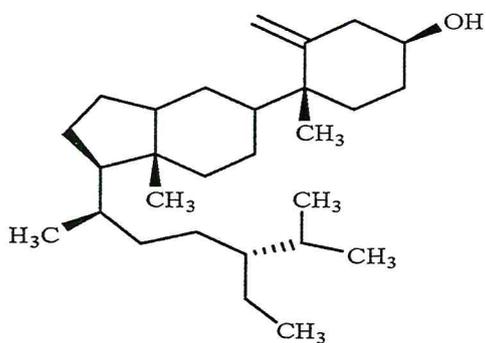
PLANCHE B: Structure des flavonoides isolés du *C. officinalis*



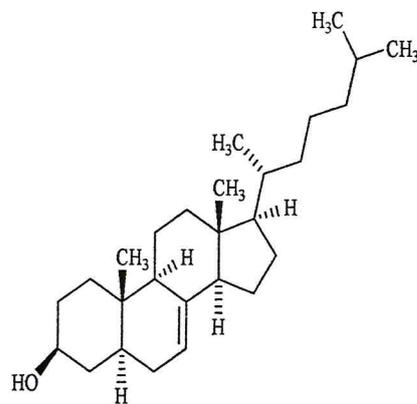
E1: Cholestanol



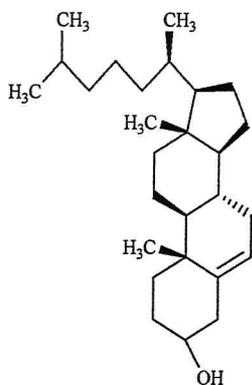
E2: Campestanol



E3: Stigmastanol

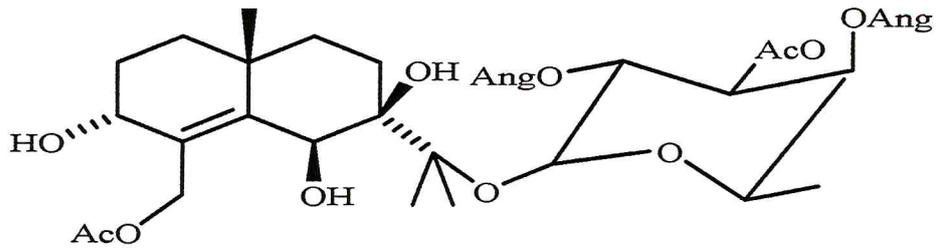


E4: Cholest-7-en-β-ol

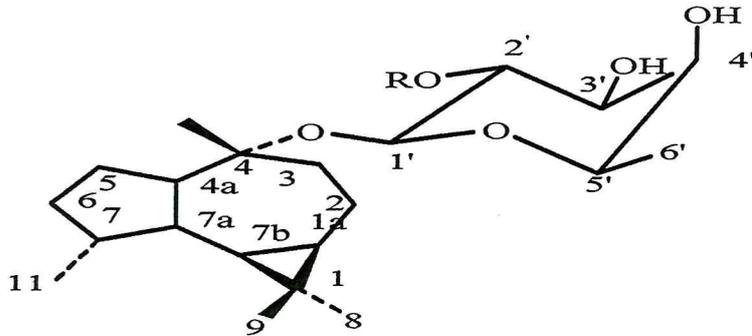


E5: Cholesterol

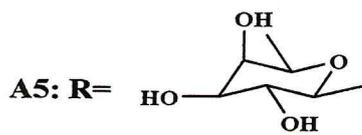
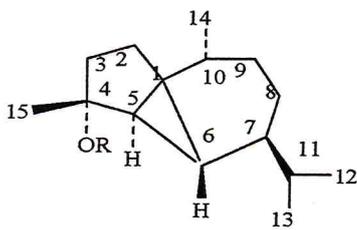
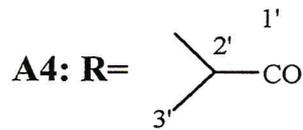
PLANCHE C : Structure des différents stérols isolés du *C.officinalis*



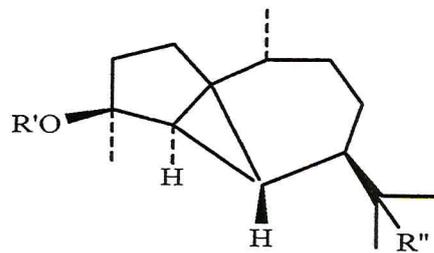
A1



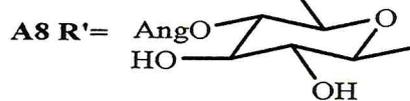
A2: R=Ac
A3: R=H



A6: R=H

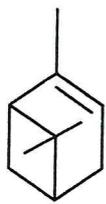


A7: R'=H, R''=OH

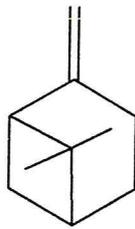


R''=H

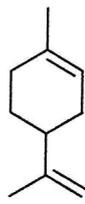
PLANCHE D : Structure des sesquiterpènes glycosidiques isolés de *C. arvensis*



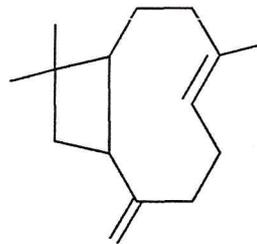
α -pinene



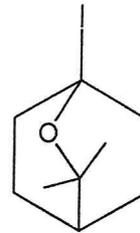
β -pinene



Limonene



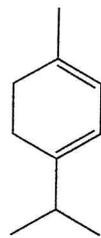
Caryophyllene



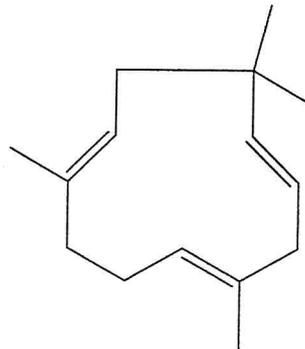
1,8 Cineol



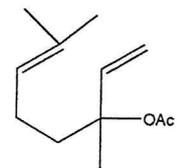
γ -terpinene



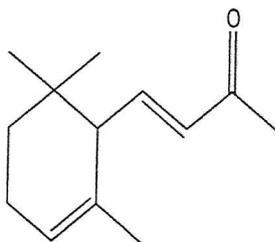
α -terpinene



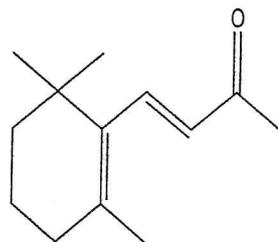
α -Humulene



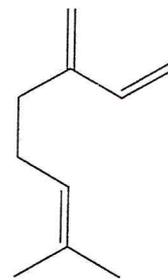
Acétate de linalyle



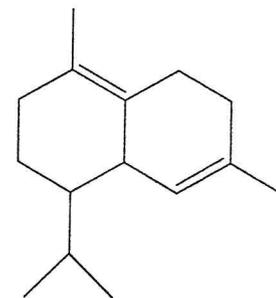
α -ionone



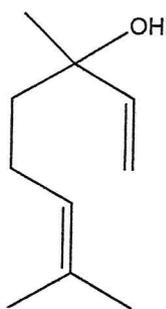
β -ionone



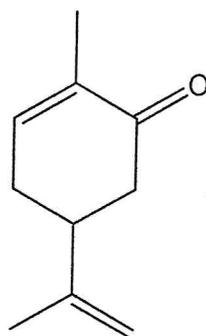
Myrcene



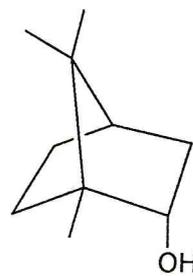
δ -Cadinene



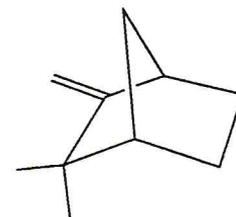
Linalol



Carvone



Borneol



Camphene

PLANCHE E: Structures des monoterpènes et sesquiterpènes isolés de l'HE de *C. officinalis* et *C. arvensis*.