

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

CHEBBOUB Boubeker

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option Chimie des substances naturelles

Titre

**Extraction et analyse de l'huile essentielle de *Calendula arvensis*
Détermination de l'activité antimicrobienne**

Soutenue le 04 juillet 2011, devant le jury composé de :

O. MOHAMMEDI	Pr.	Président	Université de Blida
A. BADIS	MCA.	Examineur	Université de Blida
N. BOUZIDI	MCB.	Examineur	Université de Blida
M. EL HATTAB	MCA.	Promoteur	Université de Blida

Dédicace

Je dédie ce modeste mémoire à ma chère mère paix à son âme, à mon père. Qu'ils trouvent ici ma gratitude et mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.

A mon frère Mahrez

A mes sœurs:

Ahlem, Faiza, Hizia et ma petite Fatima.

A mes deux neveux:

Ilias et Houd.

Toute ma famille surtout : Ma grande mère Fatma, Djamel, Leila, Laina, Abdelfetah, Faycel, Farid, Allal et Brahim.

A tous ceux que j'aime, et m'aiment

Remerciements

Tout d'abord, je remercie ALLAH le tout puissant qui ma éclairés le chemin et ma dotés d'un grand courage afin d'accomplir ce travail.

Le travail qui fera l'objet de ce mémoire à été réalisé au laboratoire de chimie des substances naturelles, a l'université Saad DAHLEB de Blida.

Je tien à remercier :

Dr EL HATTAB M., pour l'honneur d'avoir proposé ce thème et pour avoir dirigé ce travail ainsi que pour ses aides et ses conseils.

M^{me} le Professeur MOHAMMEDI O. de l'Université de Blida, d'avoir accepté de présider ce jury.

Au membre de jury qui nous à fait honneur en examinant ce travail :

Mr BADIS A., Maitre de conférences à l'université de Blida.

M^{me} BOUZIDI N., Maitre de conférences à l'université de Blida.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de tous les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble : Amira, Asmaa, Djaouida, Hanane M., Hanane Z., Ibtissame, Karima, Leila, Nassima, Sara K., Sarah L., Soraya et Zahida.

Mes vifs remerciements à mes meilleurs amis : Réda, Taki, Massi, Ghano, Mohamed, Abdennour, Yacine, Mourad, Fethi, Abdellah, Amine et Ahmed.

Enfin, que tous ceux qui nous ont ouvert leur porte et offert leur amitié soient assurés de nous reconnaissance.

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude phytochimique de l'huile essentielle de l'espèce *Calendula arvensis* et la détermination de son activité antimicrobienne. L'huile essentielle a été extraite par entraînement à la vapeur d'eau avec un rendement de 0,074%. L'huile essentielle a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM), l'identification a été effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k. La composition chimique de l'huile essentielle est dominée par les composés terpéniques et nous avons noté également la présence d'acides gras. Les principaux produits sont : α -cadinol (11,892%), le Tau-muurolol (9,614 %), le 7-acétyl-2-hydroxy-2-isopropyl bicyclo [4.3.0] nonane (9,388%) et l'acide dodecanoïque (8,168%).

Les tests d'activité antimicrobienne ont été effectués sur quatre souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Echerichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'huile essentielle a été également testée sur la levure *Candida albicans*. Les résultats obtenus ont révélé que cette l'huile essentielle a une activité antibactérienne vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus*, cependant, les autres souches sont insensibles à l'action de l'huile essentielle. Enfin, l'huile essentielle montre une activité antifongique envers la levure *Candida albicans*.

Mots clés : *Calendula arvensis*, huile essentielle, composition chimique, activité antimicrobienne

Abstract

The objective of this work is a phytochemical study of the essential oils of the species *Calendula arvensis* and determination of its antimicrobial activity.

The extraction of the essential oil is made by the drive with the steam with an output of 0,074%. For to analyze this essential oil one used the GC/MS (gas chromatography coupled with the mass spectrometry). This analysis is shown that the essential oil of *Calendula arvensis* is dominated by the majority compounds according to: α - cadinol (11,892%), the Tau-muurolol (9,614%), the 7-acétyl-2-hydroxy-2-isopropyl bicyclo [4.3.0] nonan (9,388%) and dodecanoic acid (8,168%).

The antimicrobic activities of this essential oil are tested on four bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Echerichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. More one tested this essential oil on the yeast *Candida albicans*. The results obtained shown that this essential oil is presented an antibacterial activity with the strain *Staphylococcus aureus*; on the other hand the other strains are insensitive with the action of essential oil. The latter is presented an antifongic activity with the yeast *Candida albicans*.

Key words: *Calendula arvensis*, essential oil, chemical composition, antimicrobial activity

ملخص

الهدف من هذا العمل هو الدراسة الكيمائية النباتية للزيت الأساسي للنبته كالونديلا أرفنسييس (الجمرة)، و تحديد نشاطها المضاد للميكروبات. تم استخراج هذا الزيت الأساسي عن طريق تمرير بخار الماء و تقطيره مع مردود 0,074%. لتحليل هذه الزيت استعملنا الكروماتوغرافيا الطور الغازي مع مطيافية الكتلة. تم تحديد الهوية على أساس قواعد البيانات الطيفية وايلى 7 ن و ن ب س 75 ك. أظهر هذا التحليل أن الزيت الأساسي للنبته كالونديلا أرفنسييس يتكون أساسا من التربين. كما لاحظنا أيضا وجود الأحماض الدهنية. المركبات الأساسية هي: ألفا-كدينول (11,892%)، توميرولول (9,614%)، 7-اسيتيل-2-ايدروكسي-2-ايزوبروبيل بيبيكلو [0.3.4] نونان (9,388%) و الحمض دوديكانويك (8,168%).

تم اختبار النشاطات المضادة للميكروبات للزيت الأساسي على أربعة سلالات بكتيرية: ستافيلوكوكيس أوريوس، اونتيروكوكيس فاكاليس، ايشيريشيا كولي و بسودوموناز ايريجينوزا. كما تم اختبار هذا الزيت على الخميرة كونديدا البيكانس. أثبتت النتائج المتحصل عليها أن الزيت الأساسي للنبته كالونديلا أرفنسييس يظهر نشاط ضد بكتيري مع السلالة ستافيلوكوكيس أوريوس، أما باقي السلالات فإنها غير حساسة لفعالية هذا الزيت. أخيرا، الزيت الأساسي يظهر نشاط ضد الفطريات مع الخميرة كونديدا ألبيكانس.

الكلمات المفتاحية: كالونديلا أرفنسييس، الزيوت الأساسية، المكونات الكيمائية، النشاط المضاد للميكروبات.

Table des Matières

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I: Synthèse bibliographique

Introduction	3
I. Systématique et taxonomie du genre <i>Calendula</i>	4
I.1 Description	4
I.2 Noms communs.....	4
I.3 Noms vernaculaires	5
I.4 Parties utilisés.....	5
I.5 Distribution.....	5
I.6 Etude chimique des espèces du genre <i>Calendula</i>	5
I.6.1 Etude chimique des extraits lipidiques.....	5
I.6.2 Etude chimiques des huiles essentielles d'espèces du genre <i>Calendula</i>	8
I.7 Activités microbiologiques des métabolites isolés du genre <i>Calendula</i>	8
I.7.1 Activité immunostimulante	8
I.7.2 Activité anti-inflammatoire	9
I.7.3 Activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique).....	9
I.7.4 Activité antinéoplasique : Antimutagenique	9
I.7.5 Activité antioxydante	9
I.7.6 Activité antivirale.....	9
Conclusion.....	10

Chapitre II : Extraction et analyse de l'huile essentielle

Introduction	11
II.1 Systématique et taxonomie de l'espèce <i>Calendula arvensis</i>	11
II.1.1 Description.....	12
II.1.2 Nom latin	12
II.1.3 Nom vernaculaire Arabe	12
II.1.4 Nom Targai ou Berbère	12

II.1.5 Distribution	13
II.2 Extraction de l'huile essentielle	13
II.3 Extraction liquide-liquide	14
II.4 Résultats et discussion	14
II.5 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).....	17
II.5.1 Conditions opératoires	17
II.5.2 Identification des produits de l'huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i>	17
II.5.3 Résultats et discussion	22

Chapitre III : Tests d'activités microbiologiques

III. Tests d'activités microbiologiques	27
III.1 Activité antibactérienne.....	27
III.1.1 Microorganismes étudiés.....	27
III.1.2 Milieu de culture.....	27
III.1.3 Méthode d'analyse.....	28
III.1.3.1 Préparation des suspensions bactériennes	28
III.1.3.2 Ensemencement.....	28
III.2 Activité antifongique	29
III.2.1 Microorganismes étudiés.....	29
III.2.2 Milieu de culture.....	29
III.2.3 Méthode d'analyse.....	29
III.2.3.1 Préparation des suspensions	29
III.2.3.1 Ensemencement.....	29
III.3 Résultats et discussion.....	30
III.3.1 Activité antibactérienne.....	30
III.3.2 Activité antifongique	32
Conclusion.....	33

Liste des figures

Figure 1 : Fleur de <i>Calendula arvensis</i>	4
Figure 2 : Fleur de <i>Calendula officinalis</i>	4
Figure 3 : Matière fraîche des fleurs de <i>Calendula arvensis</i>	12
Figure 4 : Matière sèche des fleurs de <i>Calendula arvensis</i>	12
Figure 5 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.....	13
Figure 6 : Extraction liquide-liquide.....	14
Figure 7 : Huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i>	16
Figure 8: Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i>	21
Figure 9 : Représentation de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i>	22
Figure 10 : Spectre de masse de l' α -cadinol.....	24
Figure 11 : Spectre de masse de l'eugénol.....	25
Figure 12 : Spectre de masse de l'eugénol.....	26
Figure 13 : Disposition des disques.....	28
Figure 14 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i>	30
Figure 15 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	31
Figure 16 : Activités antifongique de l'huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i> (<i>Candida albicans</i>).....	32

Liste des tableaux

Tableau 1: Sesquiterpènes glucosidiques isolés de l'extrait de <i>Calendula arvensis</i>	Annexes
Tableau 2: Différents triterpènes isolés de l'espèce de <i>Calendula officinalis</i> et de <i>Calendula arvensis</i>	Annexes
Tableau 3: Caroténoïdes isolés de <i>Calendula officinalis</i>	Annexes
Tableau 4 : Acides phénoliques isolés de l'espèce <i>Calendula officinalis</i>	Annexes
Tableau 5 : Composés flavoniques isolés à partir de <i>Calendula officinalis</i>	Annexes
Tableau 6 : Stérols isolés de <i>Calendula officinalis</i>	Annexes
Tableau 7: Acides gras isolés de <i>Calendula officinalis</i>	Annexes
Tableau 8: Composés identifiés dans l'huile essentielle des espèces du genre <i>Calendula</i>	Annexes
Tableau 9 : Activités biologiques effectuées sur certaines espèces appartenant au genre <i>Calendula</i>	Annexes
Tableau 10 : Bilan des différentes expériences effectuées par entraînement à la vapeur d'eau.....	15
Tableau 11 : Propriétés organoleptique de l'huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i>	16
Tableau 12 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Calendula arvensis</i>	18
Tableau 13 : Evaluation de la zone d'inhibition en fonction de la nature de la souche.....	30

Liste des abréviations

AcOEt: Acétate d'éthyle

ATCC: American Type Culture Collection

°C: degrés Celsius

CHCl₃: chloroforme

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

cm: centimètre

CO₂: dioxyde de carbone

eV: electron volt

He: Helium

MeOH: Methanol

MgSO₄: sulfate de magnésium

M.H: Mueller Hinton

mm: millimètre

Na₂SO₄: Sulfate de sodium

T_R: Temps de rétention

µm: Micromètre

%: pourcentage

Introduction

Introduction

Les huiles essentielles ou essences aromatiques sont des composés odorants et volatils nés de l'alchimie de la Vie. Le soleil en est l'artisan primordial de ce miracle par le phénomène que l'on appelle " photosynthèse ". Ce phénomène de photosynthèse est à la base de toute vie végétale. Il s'agit d'une véritable matérialisation d'énergie solaire et cosmique. La plante aromatique, un outil de transformation privilégié et l'alambic du distillateur, le moyen pour nous en faciliter l'usage [1].

En effet, les huiles essentielles sont généralement extraites par distillation à la vapeur d'eau. Contenue dans les micropoches de la plante, l'essence aromatique de la plante est libérée par la chaleur, entraînée par la vaporisation des éléments les plus volatils et ultérieurement condensée sous forme liquide. À condition que sa pureté soit totale et qu'elle ait été distillée suivant les règles de l'art, l'huile essentielle est donc composée exclusivement de molécules aromatiques... [2]. On peut extraire les huiles essentielles de diverses familles botaniques, elles se localisent dans toutes les parties de la plante (écorces, feuilles, tiges, fleurs) [3]. Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y aurait 17500 espèces aromatiques [4].

Parmi les familles de plantes aromatiques figure la famille des *Asteraceae* avec 25000 espèces, c'est la famille la plus importante des phanérogames. C'est aussi l'une des familles les plus répandues, c'est pourquoi son étude prédomine celle des Dicotylédones. C'est une famille répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées. Les premières *Astéraceae* sont apparues à l'oligocène, soit il y a environ 20 millions d'années, dans cette famille des *Asteraceae* figure le genre *Calendula* [5].

Le *Calendula* s'appelle souvent le souci par le layperson. Malheureusement ce nom peut le mener pour être confondu avec le souci, une herbe avec différentes propriétés médicinales. Elle s'appelle également les *Caltha officinalis*, *Mary gowles*, *Oculus christi*, *Souci de pot*, *Pot marygold*, *Ruddes* [5]. Les parties employées sont les fleurs exclusivement, ils sont rapidement séchés dans un bon courant d'air chaud [6]. Dans le genre *Calendula*, il existe plusieurs espèces, parmi lesquelles on rencontre le *Calendula arvensis*. C'est une espèce herbacée annuelle, fleurissant toute l'année, avec des fleurs jaunes. Cette plante est très répandue en Algérie, elle se trouve dans les champs, les vignes

et les lieux incultes [7]. Les études pharmacologiques ont confirmé que *Calendula arvensis* présente une large gamme des effets biologiques, certains pourraient être très intéressants pour un possible développement futur [8].

Toutes ces raisons, nous ont poussés à choisir cette espèce comme sujet d'étude chimique. Notre mémoire est réparti en trois chapitres :

- Synthèse bibliographique, portant sur les travaux antérieurs effectués sur le *Calendula arvensis*.
- Etude chimique de l'huile essentielle et analyse.
- Tests d'activités microbiologiques.

Chapitre I
Synthèse
bibliographique

Introduction

En général les plantes appartenant au genre *Calendula* sont des plantes auto-ensemencement annuels qui se développe dans presque tous les sols. Elles poussent à une hauteur de 30 à 60 cm avec de multiples tiges ramifiées. Ses feuilles sont en forme de spatules, sessiles, espacées de petites dents sur les bords, et la feuille est couverte de très courts poils fins.

Calendula a capitule unique situé sur un réceptif vert en forme de couronne. La partie intérieure de l'inflorescence se compose de jaune-orange et de fleurs tubulaires. Comme les pétales tombent souvent, une couronne circulaire de semences reste en vue [9]. Cultivé par les Egyptiens, les Grecs, les Hindous et les Arabes, *Calendula* a grandi dans les jardins européens et a été utilisée en médecine depuis le 12^{ème} siècle. Son nom vient du latin, le mot calendes, le premier jour de chaque mois, en raison de sa longue période de floraison. *Calendula* était prises pour traiter les fièvres, de promouvoir la menstruation et de traiter le cancer. Plus important encore, les fleurs ont été utilisées dans les extraits, teintures, baumes ; elles sont appliquées directement sur la peau pour aider à guérir les plaies et à calmer l'inflammation et la peau endommagée [10].

En Europe, les feuilles sont considérées comme résolvantes et diaphorétique tandis que les fleurs sont utilisées comme stimulant, antispasmodique et emménagogue [11]. En Angleterre, la décoction des fleurs a été utilisée comme une boisson pour pousser le traitement de la rougeole et la variole, et les jus de fruits frais comme un remède à la jaunisse, la constipation et la suppression du flux menstruel [12]. En Inde, les fleurons sont utilisés dans des pommades pour le traitement des plaies, d'herpès, les ulcères, les engelures, des lésions cutanées, des cicatrices, purification du sang. Les feuilles en perfusion sont utilisées pour le traitement des varices externe [10-12].

I.3 Noms vernaculaires

Les noms les plus utilisés sont : Atunjaq, djamir, djomaira, feminell, fleur de souci, fleurs de tous les mois, garden marigold, bahar, zubaydah [11,12].

I.4 Parties utilisés

Les parties les plus utilisées sont : les feuilles, les tiges, les racines, les fleurs. Les fleurs sont les mieux indiquées parce qu'elles sont rapidement séchées à la nuance, dans un bon courant d'air chaud [5].

I.5 Distribution

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'Egypte au sud jusqu'en Iran au Nord [15]. L'espèce se trouve dans les Champs, les vignes, les lieux incultes et les jardins [7].

I.6 Etude chimique des espèces du genre *Calendula*

I.6.1 Etude chimique des extraits lipidiques

Il faut noter que la plupart des travaux ont été effectués sur *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis*. Les extraits lipidiques ont été préparés par extraction par solvant tels que l'acétone, l'éther diéthylique [16], le mélange (n-hexane, dichloromethane) [17], le mélange (éther de pétrole, CHCl₃, MeOH) [17,18], le dichloromethane [19]. Nous avons noté aussi l'utilisation du CO₂ supercritique dans l'extraction [20-23].

L'étude chimique des extraits des espèces appartenant au genre *Calendula* a permis l'isolement d'un certain nombre de métabolites secondaires appartenant à différentes classes chimiques. Il faut noter particulièrement la présence de la classe des terpènes (sesquiterpènes, triterpènes), des stéroïdes et des composés phénoliques [8].

I.6.1.1 Métabolites secondaires isolés des espèces du genre *Calendula*

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

Il faut noter particulièrement la présence de la classe des terpènes (sesquiterpènes, triterpènes, tetraterpènes), des composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, coumarines, tanins), des stérols et d'autres constituants [8].

I.6.1.1.1 Composés terpéniques

Les composés terpéniques isolés sont particulièrement des sesquiterpènes, des triterpènes et des tetraterpènes (Caroténoïdes) [8].

I.6.1.1.1.1 Sesquiterpènes

Des sesquiterpènes glucosidiques ont été particulièrement rencontrés dans l'extrait de *Calendula arvensis* tels que : le 4-O-(β -D-fucopyranosyl)-4-alloaromadendrole et le 4-O-(β -D-fucopyranosyl)-4-épi-cubebol [17, 24-26] (Tableau 1, Planche A - Annexes).

I.6.1.1.1.2 Triterpenes

Le genre *Calendula* est caractérisé par la présence de triterpenoïdes dans l'extrait de *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis*.

Concernant le *Calendula officinalis*, il faut noter l'isolement des esters de triterpenoïdes tels que le faradiol-3-O-myristate et le maniladiol-3-O-laurate [16, 20, 21, 27-32] et triterpenoïdes alcooliques tels que le taraxasterol et l'ursadiol [16, 32-34].

Il faut noter aussi la présence des triterpenoïdes glucosidiques dans les extraits de *Calendula officinalis* et *Calendula arvensis* tels que : le β -D-galactopyranosyl et le β -D-pyranosyl [18, 21, 35, 36] (Tableau 2, Planche B - Annexes).

I.6.1.1.1.3 Tetraterpènes (Caroténoïdes)

Dans le genre *Calendula* on remarque la présence de caroténoïdes dans l'extrait de *Calendula officinalis* sous formes d'hydrocarbures (carotène, lycopène), des xanthophylles (lutéine) et d'apocaroténoïdes (bixine, crocine) [21, 27, 33, 37, 38] (Tableau 3, Planche C - Annexes).

I.6.1.1.2 Composés phénoliques

I.6.1.1.2.1 Acides phénoliques

Ils ont été isolés dans l'extrait de l'espèce *Calendula officinalis*. Parmi ces composés on note la présence de l'acide Caféique et l'acide Coumarique [33, 39] (Tableau 4 - Annexes).

I.6.1.1.2.2 Flavonoïdes

Ces composés phénoliques sont isolés à partir de nombreuses plantes appartenant à la famille des astéracées, on remarque leur présence seulement dans le *Calendula officinalis* et sous forme de deux classes: hétérosides de quercetol (Isoquercitrin) et hétérosides d'isorhamnetol (Isorhamnetin) [21, 33, 35, 39-41] (Tableau 5, Planche D - Annexes).

I.6.1.1.2.3 Coumarines

On remarque leur présence dans les espèces appartenant au genre *Calendula* en particulier l'extrait de *Calendula officinalis*, les principaux coumarines isolés sont: l'esculetin, le scopoletin et l'umbelliféron (7-Hydroxycoumarin) [33].

I.6.1.1.2.4 Tanins

On constate leur isolement dans l'extrait de *Calendula officinalis*. Les tanins isolés sont le catéchol et le pyrogallol [33].

I.6.1.1.3 Stérols

On constate leur isolement dans l'extrait de *Calendula officinalis*. Les principaux stérols sont : le cholestanol, le campestanol et le stigmastanol [33, 34, 42] (Tableau 6, Planche E - Annexes).

I.6.1.1.4 Autres constituants

Dans les espèces appartenant au genre *Calendula*, nous avons remarqué la présence d'autres composés tels que les acides gras. Ces derniers ont été isolés à partir de l'extrait

de *Calendula officinalis*. On peut citer dans ce cadre : l'acide decanoïque, l'acide undecanoïque et l'acide laurique [33, 43] (Tableau 7 - Annexes).

I.6.2 Etude chimiques des huiles essentielles d'espèces du genre *Calendula*

Il faut noter que les huiles essentielles étudiées ont été préparées par entraînement à la vapeur d'eau ou par hydrodistillation. La plupart des travaux ont été effectués sur l'espèce *Calendula officinalis* [23, 43-45]. La composition chimique globale de cette dernière est un mélange de monoterpènes et de sesquiterpènes. Quelques travaux sur l'espèce *Calendula arvensis* ont aussi été relevés [46] (Tableau 8, Planche F - Annexes).

Concernant le *Calendula officinalis*, les principaux composés de l'huile essentielle sont : l' α -ionone, l' α -humulène, le 1,8-cinéole.....etc [23, 42, 44, 47].

L'huile essentielle de *Calendula arvensis*, renferme comme principaux composés: l' α -cadinène(15,1%), l' α -cadinol(12,4%), le linalool..... [48].

I.7 Activités microbiologiques des métabolites isolés du genre *Calendula*

Les composés isolés des espèces du genre *Calendula* sont très actifs biologiquement, les activités biologiques les plus importantes sont notamment l'activité anti-inflammatoire et antimicrobienne [8] (Tableau 9 – Annexes).

I.7.1 Activité immunostimulante

Les plantes appartenant au genre *Calendula* sont considérées comme des immunostimulants naturels, cela est dû à la présence de polysaccharides [8, 45].

I.7.2 Activité anti-inflammatoire

Les triterpènes contenus dans les plantes appartenant au genre *Calendula* empêchent l'activité de lipoxigénase, ce qui leur confère la propriété d'anti-inflammatoires naturels [8, 27, 30, 33,35, 45].

I.7.3 Activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique)

Les plantes du genre *Calendula* présentent un large spectre de l'activité antimicrobienne, cette activité a été vérifiée vis à vis de l'*Escherichia coli*, *Staphylocoque*, *Bacillus klebsiella* *Pneumonie*, *Proteus morgani*etc [8, 27, 39].

I.7.4 Activité antinéoplasique : Antimutagenique

Les saponines isolées des plantes du genre *Calendula* sont considérées comme des antimutageniques [8, 31-33].

I.7.5 Activité antioxydante

Les composés phénoliques isolés des plantes appartenant au genre *Calendula* sont responsables de l'activité antioxydante [8, 26, 39].

I.7.6 Activité antivirale

Les plantes appartenant au genre *Calendula* présentent une activité antivirale, en particulier, contre le virus de l'herpès, le virus HIV, le virus de la grippe grâce à l'effet des sesquiterpènes glucosidiques contenus dans ces plantes [8, 26].

Conclusion

L'objectif de cette synthèse bibliographique est de répertorier l'ensemble des travaux chimiques menés sur les espèces *Calendula arvensis* et *Calendula officinalis*. Ces espèces sont connues par leurs richesses en métabolites secondaires présentant diverses activités biologiques.

L'étude chimique effectuée sur les extraits lipidiques de *Calendula officinalis* ont permis l'isolement de plusieurs métabolites secondaires tels que:

- Les terpènes : il s'agit notamment des triterpènes qui sont répartis en 3 classes différentes: glucosidiques, alcooliques et des esters triterpenoïdes, des tetraterpénoïdes (caroténoïdes) présent sous les différentes classes, à savoir, les hydrocarbures (carotène, lycopène), les xanthophylles (lutéine) et les apocaroténoïdes (bixine, crocine).
- Les composés phénoliques : il s'agit notamment des flavonoïdes, d'acides phénoliques, de coumarines et de tanins.
- Autres composés, tels que : les acides gras, les stérols.....

L'étude chimique menée sur les extraits lipidiques de *Calendula arvensis* ont permis l'isolement de métabolites secondaires appartenant à la classe des terpènes, il s'agit notamment des sesquiterpènes glucosidiques et des triterpènes glucosidiques.

L'huile essentielle de *Calendula officinalis* et de *Calendula arvensis* est constituée notamment d'un mélange de monoterpènes et de sesquiterpènes.

Les espèces appartenant au genre *Calendula* présentent plusieurs activités biologiques parmi lesquelles: l'activité anti-inflammatoire, l'activité immunostimulante, l'activité antimicrobienne (l'activité antibactérienne et l'activité antifongique) et l'activité antivirale.

Chapitre II
Extraction et
analyse de l'huile
essentielle

Introduction

Notre étude chimique porte sur l'huile essentielle de l'espèce *Calendula arvensis* ce choix est motivé par le fait que les espèces du genre *Calendula* sont douées d'activités microbiologiques très intéressantes [8].

L'espèce sèche nous a été fournie par un herboriste qu'il a importé d'Espagne, l'espèce a été identifiée par le Dr. MAHMOUDI qui l'utilise en phytothérapie.

La partie expérimentale est consacrée à l'étude chimique de l'huile essentielle de *Calendula arvensis* et aux tests d'activités antimicrobiennes, elle comprend trois parties :

- 1- Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau.
- 2- Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) et identification des différents constituants de l'huile essentielle.
- 3- Étude de quelques activités microbiologiques de l'huile essentielle. Il s'agit en particulier de l'activité antibactérienne et antifongique.

II.1 Systématique et taxonomie de l'espèce *Calendula arvensis* [7]

- ❖ Phylum: Plantae
- ❖ Division: Magnoliophyta
- ❖ Classe: Magnoliopsida
- ❖ Sous-classe: Asteridae
- ❖ Ordre: Asterales
- ❖ Famille: *Asteraceae*
- ❖ Genre: *Calendula*
- ❖ Espèce : *Calendula arvensis*

Une photographie de la matière fraîche et sèche des fleurs de l'espèce *Calendula arvensis* est donnée par les figures 3 et 4.



Figure 3 : Matière fraîche des fleurs de *Calendula arvensis*



Figure 4 : Matière sèche des fleurs de *Calendula arvensis*

II.1.1 Description

C'est une plante herbacée annuelle à tiges de 30 à 50 cm, ascendante ou diffuse, à rameaux étalés pubescentes. Feuilles caulinaire oblongues-lancéolées, acuminées, à bords étroitement scarioux, achaines. Extérieurs arqués, épineux sur le dos, les intérieurs roulés en anneau, lisses ou épineux, capitules assez grands, solitaires terminant les rameaux ; fleurs jaunes [7].

Elle est connue sous un nom commun, le souci des champs. La période de la floraison s'étale du mois de mars au mois de juin [7].

II.1.2 Nom latin

Calendae, les Calendes : plante fleurissant toute l'année [7].

II.1.3 Nom vernaculaire Arabe

Boukrourous, Djemra, Gmredj, Razehima[7].

II.1.4 Nom Targai ou Berbère

Aouiout, Guizgaren, Tousslat[7].

II.1.5 Distribution

Le *Calendula arvensis* est indigène à la zone méditerranéenne. On la retrouve en Afrique du Nord, en Espagne, en Italie et en Yougoslavie. Elle se trouve dans les champs, les vignes, les lieux incultes [7].

II.2 Extraction de l'huile essentielle

L'extraction d'huile essentielle est réalisée par entraînement à la vapeur d'eau dans un montage à l'échelle laboratoire (figure 5), comprenant un ballon rempli au deux tiers d'eau surmonté d'une ampoule à décanter contenant le *Calendula arvensis*. Le ballon est porté à ébullition, les vapeurs formées traversent la matière végétale contenue dans l'ampoule à décanter. Cette dernière est reliée à un réfrigérant permettant de condenser les vapeurs issues de l'ampoule à décanter. L'hétéro-azéotrope eau-huile condensé est récupéré dans un bécher. La durée de l'extraction est fixée à 3 h pour une masse de plante de 60 g (les fleurs de *Calendula arvensis*).



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

II.3 Extraction liquide-liquide

Le mélange eau-huile essentielle est soumis à une extraction liquide –liquide avec de l'éther diéthylique. On obtient deux phases distinctes, une phase organique contenant l'huile essentielle dans l'éther et une phase aqueuse, cette dernière est soumise de nouveau à une extraction liquide-liquide avec de l'éther diéthylique afin d'épuiser au maximum l'huile essentielle soluble dans l'eau. Trois extractions successives sont effectuées, les phases organiques obtenues sont mélangées en une seule. Cette dernière est filtrée sur du $MgSO_4$ ou du Na_2SO_4 afin d'éliminer toutes traces d'eau (séchage). La phase organique filtrée est ensuite distillée à la pression atmosphérique pour éliminer l'éther (distillation à l'aide d'un rotavapeur). Le montage de l'extraction liquide-liquide est donné par la figure 6.

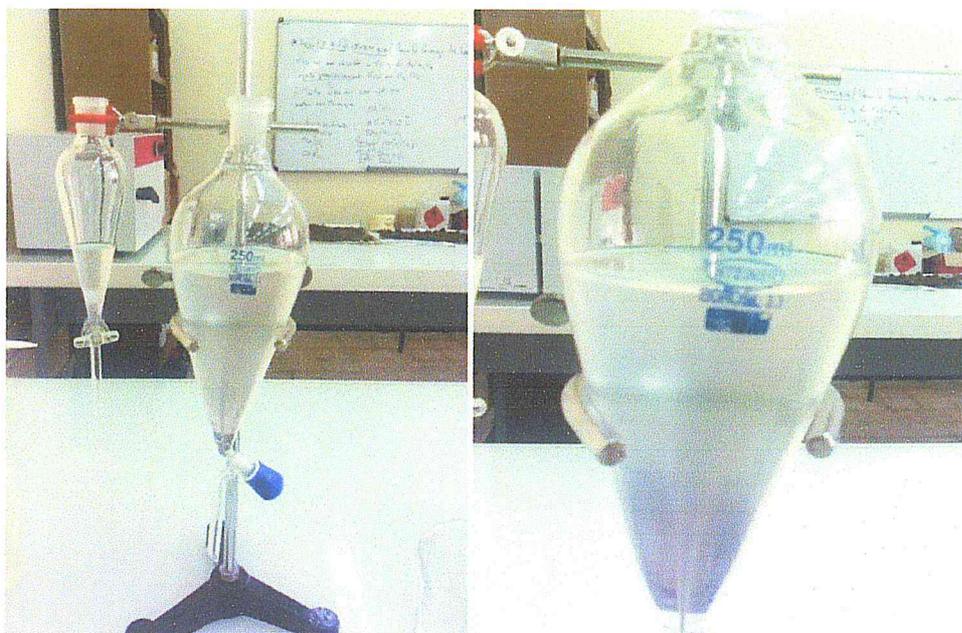


Figure 6 : Extraction liquide-liquide

II.4 Résultats et discussion

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse de l'huile extraite et la masse de la plante sèche à traiter [49]. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\eta(\%) = m_{HE} / m_V \times 100$$

η : Rendement de l'huile essentielle en %

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle en g

m_V : Masse de la plante en g

Les expériences préliminaires ont montré que le rendement en huile essentielle est faible, nous avons été dans l'obligation d'effectuer plusieurs opérations d'entraînement à la vapeur d'eau (13 fois) pour récupérer la quantité d'huile essentielle nécessaire pour la réalisation des différentes analyses et des tests d'activités. Nous présentons dans le tableau 10, un bilan des différentes expériences effectuées par entraînement à la vapeur d'eau.

Tableau 10 : Bilan des différentes expériences effectuées par entraînement à la vapeur d'eau

Date de manipulation	Masse de la matière sèche(g)	Volume de l'eau distillée (ml)	Volume Récupérée (ml)	Masse de l'huile (g)	Rendement %
16/03/2011	50	700	400	0,0470	0,094
04/04/2011	60	800	500	0,0320	0,053
	60	800	500	0,0340	0,056
05/04/2011	60	800	500	0,0359	0,059
10/04/2011	60	800	500	0,0351	0,058
14/04/2011	60	800	500	0,0313	0,052
18/04/2011	60	800	500	0,0323	0,053
24/04/2011	60	800	500	0,0413	0,068
27/04/2011	60	800	500	0,0410	0,068
28/04/2011	60	800	500	0,0712	0,118
	60	800	500	0,0631	0,105
03/05/2011	60	800	500	0,0457	0,076
04/05/2011	60	800	500	0,0632	0,105

Le rendement moyen calculé est de 0,074 %. Nous constatons que le rendement varie d'une limite inférieure de 0,052 % à une limite supérieure de 0,118 %.

Autrement dit, dans les mêmes conditions opératoires, les rendements obtenus sont très différents. Cette fluctuation est attribuée à des paramètres d'ordre opératoire (débit de vapeur, remplissage de la matière végétale, Echantillonnage, extraction liquide-liquide, séchage,.....). Le tableau 10 pourrait être d'une grande utilité dans l'étude statistique de l'entraînement à la vapeur d'eau. L'huile essentielle obtenue est conservée à froid et à l'abri de la lumière dans un flacon hermétique (figure 7).



Figure 7 : Huile essentielle de *Calendula arvensis*

Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle sont données dans le tableau 11.

Tableau 11 : Propriétés organoleptique de l'huile essentielle de *Calendula arvensis*

Aspect	Couleur	Odeur
Liquide légèrement visqueux	Jaune foncé	caractéristique

L'huile essentielle a un indice de réfraction mesuré à 30 °C de 1,6139. Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre de type Abbé.

II.5.3 Résultats et discussion

L'examen du Tableau 12 montre que la composition chimique de l'HE est dominée par les terpènes et leurs dérivés (55.55%). Ces derniers sont sous forme de monoterpènes et de sesquiterpènes, il s'agit notamment du : 4-terpinéol, linalool, carvacrol, δ -cadinene, α -cadinol et l'oplopenone.

La composition de l'huile essentielle révèle également la présence d'une série d'acides gras représentant (8.64%), il s'agit en particulier de l'acide dodecanoïque, l'acide hexanoïque et l'acide octanoïque. On note aussi la présence d'une fraction de composés oxygénés représentant plus de (7.40%). D'autres composés oxygénés ont été également identifiés, il s'agit de : le 5-méthyle furfural, l'epoxyethyl Benzene, le 6,10,14-triméthyl-2-pentadecanone. Ces composés oxygénés sont couramment rencontrés dans les huiles essentielles. La répartition des différentes classes chimiques de l'huile essentielle sont représentés par la figure 9.

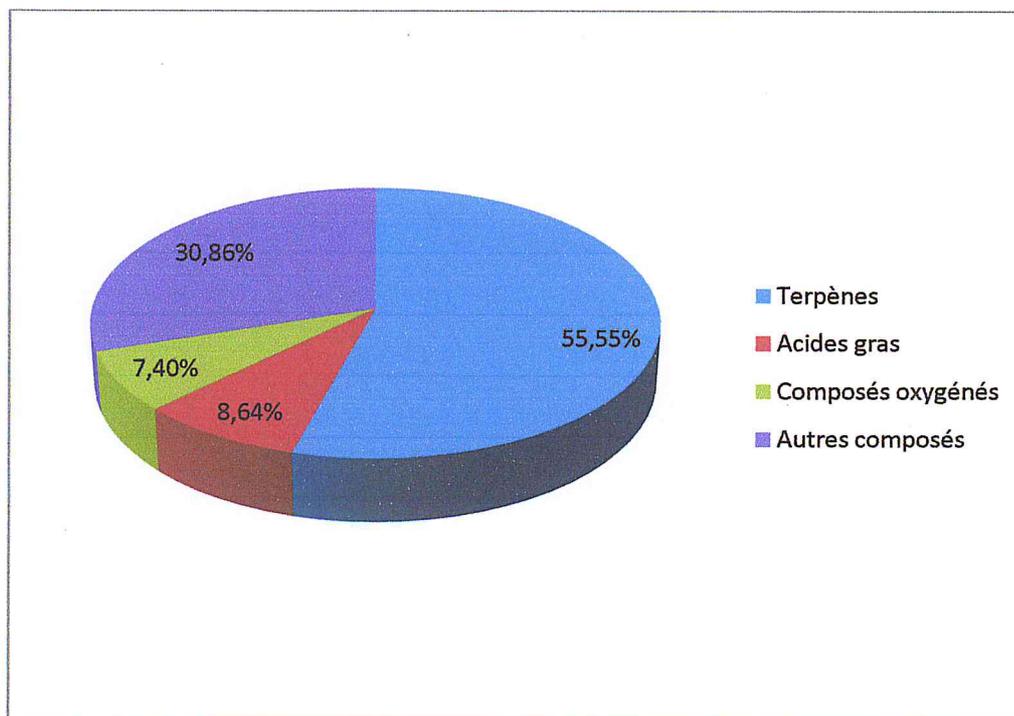


Figure 9 : Représentation de la composition chimique de l'huile essentielle de *Calendula arvensis*

Les composés majoritaires présents dans l'huile essentielle de *Calendula arvensis* sont : le α -cadinol (11,892%), le Tau-muurolol (9,614 %), le 7-acétyl-2-hydroxy-2-isopropyl bicyclo [4.3.0] nonane (9,388%) et l'acide dodecanoïque (8,168%).

Les composés identifiés sont similaire à ceux obtenus sur la même espèce récoltée en Corse [48].

Les spectres de masses de quelques composés (l' α -cadinol, l'eugénol et l'acide dodecanoïque) sont donnés par les figures 10, 11 et 12.

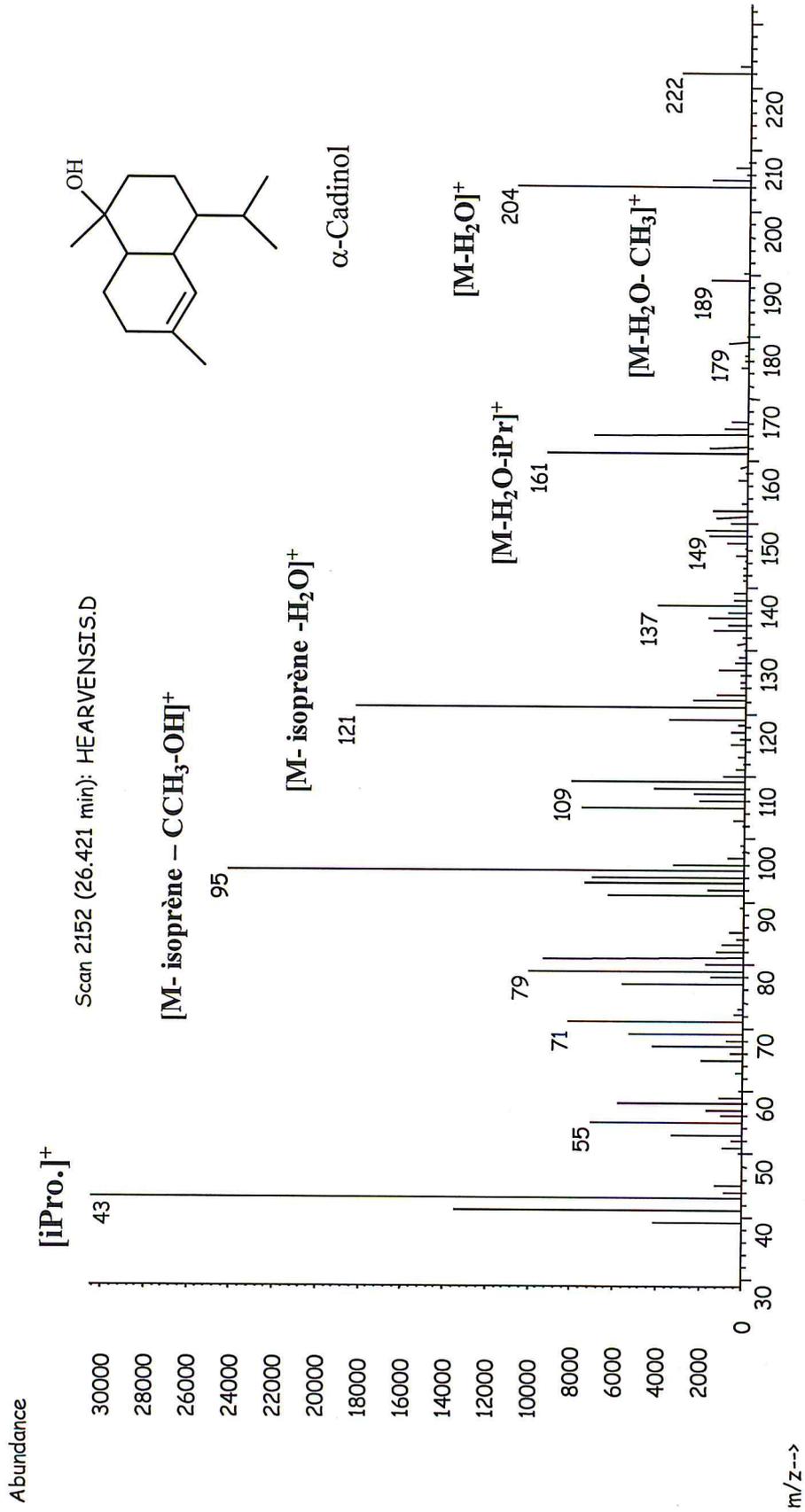


Figure 10 : Spectre de masse de l' α -cadinol

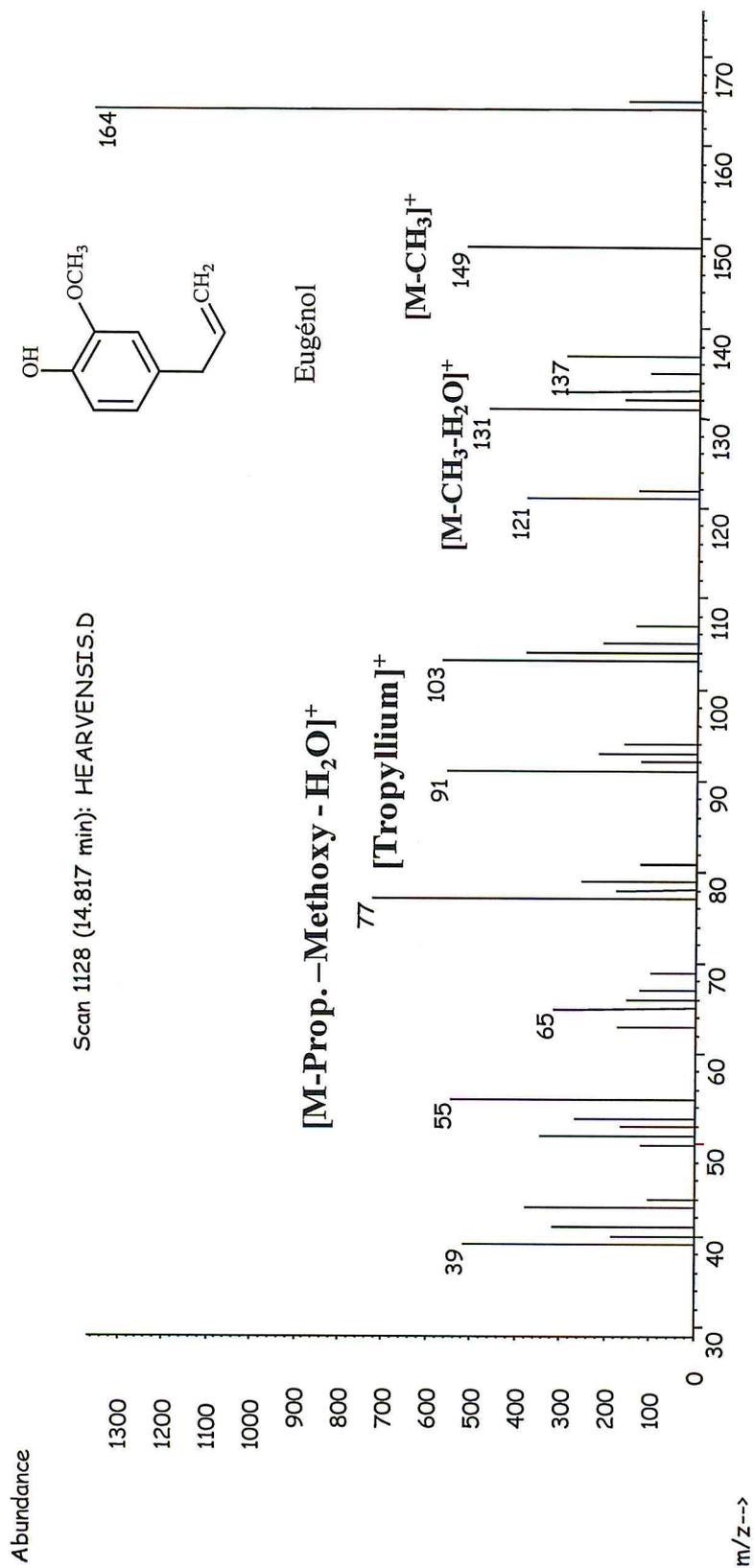


Figure 11 : Spectre de masse de l'eugénol

Abundance

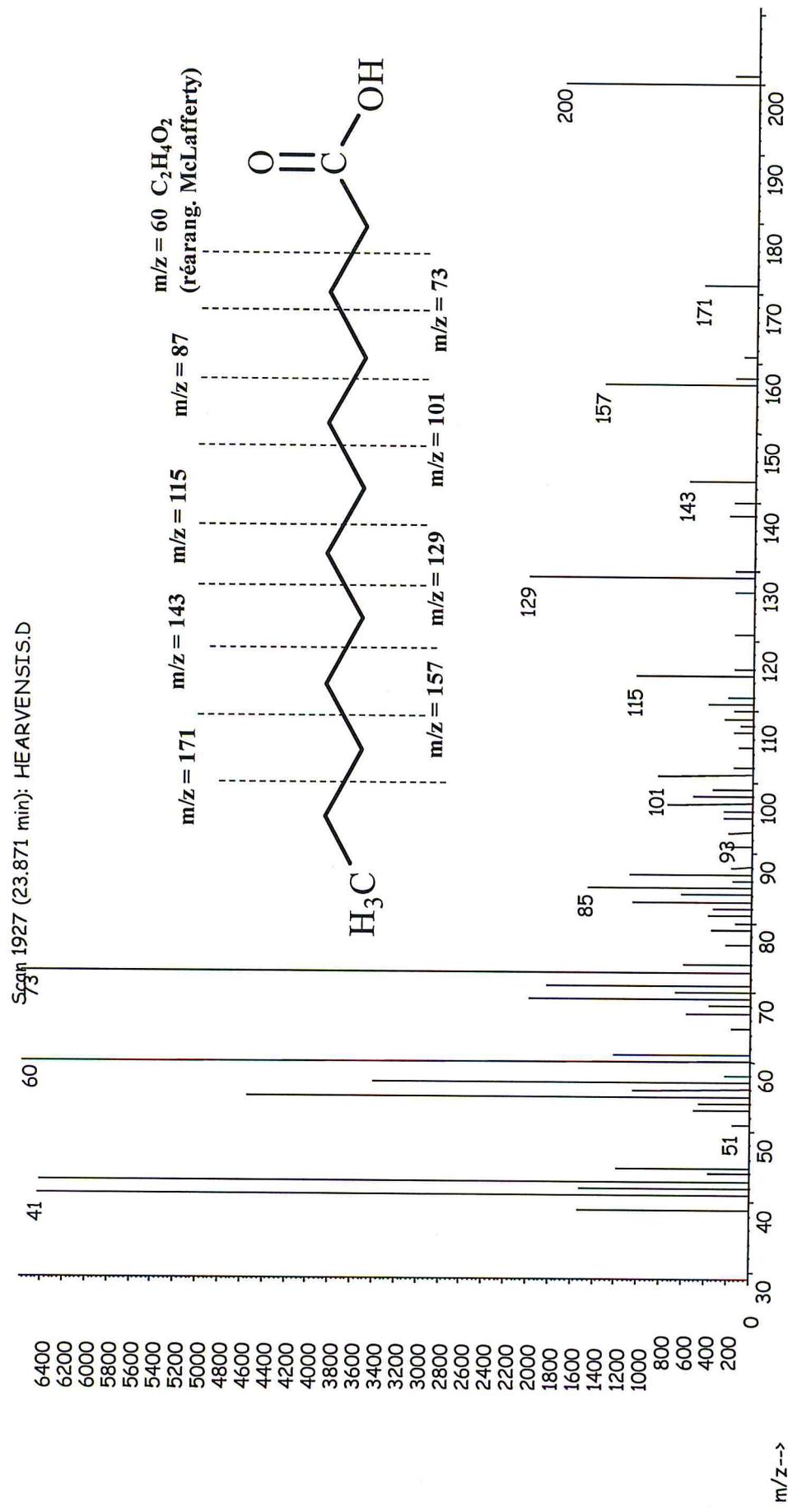


Figure 12 : Spectre de masse de l'eugénol

Chapitre III
Test d'activité
microbiologique

III. Tests d'activités microbiologiques

Nous avons réalisé deux types de tests d'activités : antibactérienne et antifongique (activité antimicrobienne). Pour les bactéries, les tests ont été réalisés par la méthode de diffusion sur disque [50]. Cette méthode a été aussi appliquée pour les levures.

Les méthodes de diffusion sont les plus utilisés par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégné des huiles essentielles à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pur de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les huiles essentielles diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture [51].

III.1 Activité antibactérienne

Les différents tests ont été réalisés au sein de laboratoire de microbiologie de l'hôpital Frantz Fanon de Blida.

III.1.1 Microorganismes étudiés

Les microorganismes utilisés sont : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (les deux souches sont de Gram+), *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (les deux sont de Gram-).

Les différentes souches bactériennes sont des lots nommées « ATCC : American Type Culture Collection ». Elles sont entretenues par repiquage sur la gélose nutritive favorable à leur croissance.

III.1.2 Milieu de culture

Nous avons utilisé le milieu de culture Mueller Hinton (M.H). Ce dernier est été préparé comme suit : une masse de 26 g d'agar nutritif est pesée puis dissoute dans 1 l d'eau distillée, la solution obtenue est ensuite stérilisée à l'autoclave. Le milieu est refroidi, ensuite coulé (environ 25 ml de milieu préparé dans chaque boîte pétri jusqu'à solidification), les boîtes sont séchées sous laminoir (flux à air stérile).

III.1.3 Méthode d'analyse

III.1.3.1 Préparation des suspensions bactériennes

A partir de la gélose nutritive nous avons prélevé quelques colonies des souches à étudier à l'aide d'une anse Pasteur (fil de platine) et émulsionnées dans un tube en verre contenant 5 ml de l'eau physiologique, suivi d'une agitation pour obtenir une suspension homogène.

III.1.3.2 Ensemencement

On trempe un écouvillon dans cette suspension, on ensemence sur la totalité de la boîte pétri afin d'assurer la répartition totale de la suspension, ensuite à l'aide d'une pince flambée sur le milieu Muller Hinton. On dépose les disques de papier buvard imbibés d'huile essentielle en appuyant légèrement afin de faciliter l'adhérence. On retourne les boîtes pétri pour éviter que l'eau de condensation dans la boîte pétrie perturbe la surface du milieu gélosé. On les place dans cette position dans l'étuve à 37°C pendant 24h (figure 13).

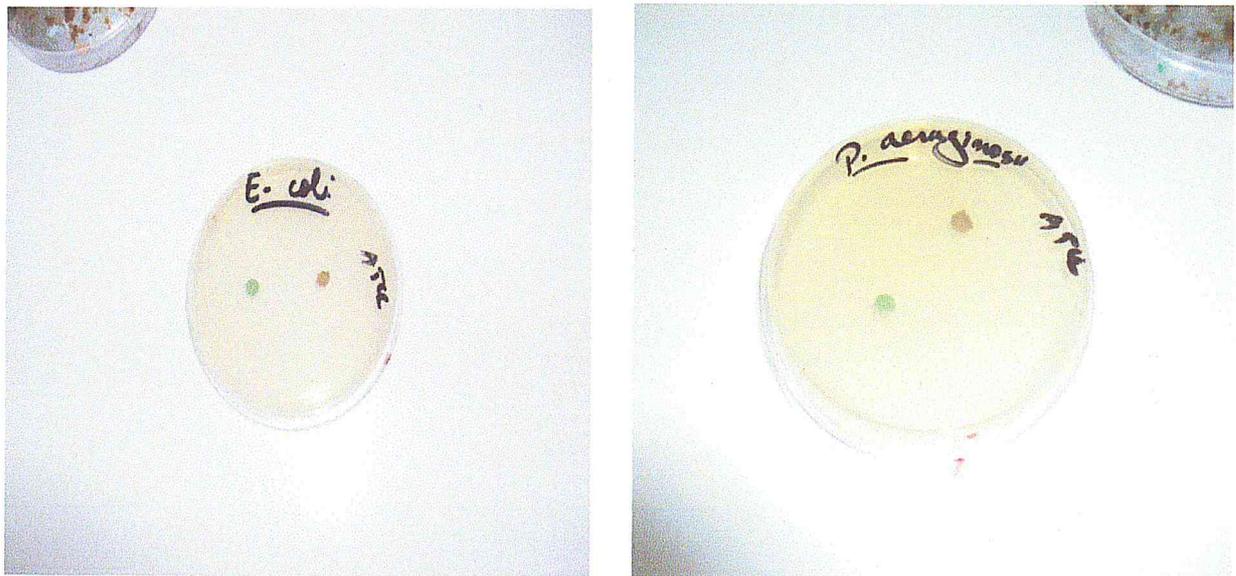


Figure 13 : Disposition des disques

III.2 Activité antifongique

Les expériences ont été réalisées au sein de l'unité de la bactériologie de laboratoire central de l'Établissement Public Hospitalier de Boufarik.

III.2.1 Microorganismes étudiés

Il s'agit d'un test antifongique réalisé sur une seule levure (*Candida albicans*) qui est pathogène.

III.2.2 Milieu de culture

On a utilisé le même milieu de culture que l'activité antibactérienne (Mueller-Hinton).

III.2.3 Méthode d'analyse

III.2.3.1 Préparation des suspensions

A l'aide d'une pipette pasteur, nous avons prélevé quelques colonies qu'on a émulsionné dans un tube en verre contenant 5ml de l'eau physiologique. Après agitation, nous obtenons une suspension homogène.

On mesure ensuite la densité de la suspension bactérienne, il faut que la densité soit égale à 0.5 Mc Ferland.

III.2.3.1 Ensemencement

A l'aide d'un écouvillon on ensemence la gélose M.H (Muller Hinton)

- On imprègne le disque dans l'huile essentielle, suivi d'un léger séchage,
- On applique les disques sur la gélose,
- Après cette étape on fait l'incubation pendant 24h à 48h pour la levure *Candida albicans* à 37° C.

III.3 Résultats et discussion

III.3.1 Activité antibactérienne

Les résultats du test de l'effet antibactérien sont résumés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Evaluation de la zone d'inhibition en fonction de la nature de la souche

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12
<i>Escherichia coli</i>	---
<i>Enterococcus faecalis</i>	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	---

Un effet inhibiteur de l'huile essentielle sur le développement du Gram positif «*Staphylococcus aureus*» a été constaté avec un diamètre d'inhibition égal à 12 mm (figure 14).



Figure 14 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Calendula arvensis*

Concernant les trois autres souches testés (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (figure 15) et *Enterococcus faecalis*), on a remarqué une absence de la zone d'inhibition.

Cette absence de zone est probablement due à la résistance des souches vis à vis de l'huile essentielle.



Figure 15 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Calendula arvensis* (*Pseudomonas aeruginosa*)

III.3.2 Activité antifongique

Concernant l'activité antifongique réalisée sur la levure *Candida albicans*. On a obtenu un diamètre d'inhibition important (17 mm). Cette valeur exprime la sensibilité de cette levure pathogène vis à vis de l'huile essentielle de *Calendula arvensis* (figure 16).



Figure 16 : Activités antifongique de l'huile essentielle de *Calendula arvensis* (*Candida albicans*)

Donc, l'huile essentielle de *Calendula arvensis* montre une bonne activité antifongique contre la levure *Candida albicans*.

Conclusion

Conclusion

Notre travail a porté sur l'étude chimique de l'huile essentielle de *Calendula arvensis* ainsi qu'à la détermination de quelques activités microbiologiques.

L'extraction de l'huile essentielle de *Calendula arvensis* a été effectuée par entraînement à la vapeur d'eau et a mené à un rendement moyen (0,074 %), cette valeur est assez faible comparativement à d'autres huiles essentielles.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) a permis la séparation et l'identification de la composition chimique de l'huile essentielle. Cette dernière est constituée principalement de terpènes (monoterpènes et sesquiterpènes) avec un pourcentage global de (55,55%). On relève également la présence des acides gras (8,64%), de composés oxygénés (7,40%) et d'autres composés.

Les tests d'activités (antibactériens et antifongiques) effectués sur cette huile essentielle ont montré que cette dernière a une action inhibitrice sur la bactérie *Staphylococcus aureus* et la levure *Candida albicans*. Par contre, les bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* se sont révélées assez résistantes.

En vue de la valorisation de cette espèce, il convient d'envisager une étude plus approfondie, telle que l'étude saisonnière et géographique et leurs influences sur sa diversité chimique. Egalement, on peut envisager l'étude chimique des extraits lipidiques afin d'isoler des structures originales, éventuellement bioactives.

Références bibliographiques

Références bibliographique

- [1] C. Jean-Pierre, Les huiles essentielles des plantes, Praticien de santé, Heilpraktiker, jpchapuis@nabio.ch.
- [2] B. Dominique, la feuille verte, quoi de neuf à l'académie, Académie Herboliste, www.academieherboliste.com-info@academieherboliste.com, 514, pp 274-4240, Mai 2010.
- [3] H.BELKOU, F. BEYOUND, Z.TALEB BAHMED, Approche de la composition biochimique de la Menthe verte (*Mentha spicata L.*) dans la région de Ouargla ; mémoire. DES, Université de Ouargla, p. 7- 8, 11-12, 2005.
- [4] D.BENKADA, Isolation des huiles essentielles de *Mentha suaveolens*, ehrh (Bous Domrane) de la région de Tlemcen et leurs analyses par différents méthodes chromatographiques mise en évidence du composé majoritaire «la pulégone », Thèse. Magister.Univ. Tlemcen, pp 42-76, 1990.
- [5] J-L. Guignard, Botanique: systématique moléculaire, 12^{ème} édition, pp205- 206, pp 212-214.
- [6] G. Daniel, *Calendula*, herb of the year 2008, Medicinal uses of *Calendula*, Medical herbalist RH (AHG), International Herb Association, 2008.
- [7] B. AEK, Plantes médicinales d'Algérie, office des publications universitaires, p 284, septembre 2005.
- [8] B.P. Muley, S.S. Khadabadi, N.B. Banarase, Phytochemical Constituents and Pharmacological, Activities of *Calendula officinalis* Linn (*Asteraceae*): A Review Tropical, Journal of Pharmaceutical Research, 8 (5), pp 455-465, October 2009.
- [9] *Calendula officinalis*. Monographic.
- [10] J.Kathi. Kemper, MD, MPH). *Calendula (Calendula officinalis)*, Longwood Herbal Task Force, 1999: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>.
- [11] KR. Kirtikar, B.D. Major Basu, Indian Medicinal Plants, Deharadun, India, International Book Distributor, 2, pp 1413-1414, 1993.

- [12] C.P. Khare, Encyclopedia of Indian Medicinal Plants. Germany, Springer-Verlag Publisher, pp 116-117, 2004.
- [13] Editorial Boards. PDR for Herbal Medicines. 2nd edition, Montvale, Thomson-Medical Economics, pp 118-120, pp 497-500, 2003.
- [14] V.W. Ben-Erik, W. Michael, Medicinal Plants of the Worlds, Times Edition, pp 74-2, 2004.
- [15] J. Duval, Ecological Agriculture Projects, McGill University. p 350, November 1993.
- [16] D.Leandro, 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.
- [17] A. Ahmed, J. Jakvpovic, J.Tom, Sesquiterpene glycosides from *calendula arvensis*. Journal of Natural Products, 56, pp 1821-1829, 1993.
- [18] P.Cosimo, Z. Zhong-Liang, D. Tommas, Plant metabolites. Triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. Journal of Natural Products, 50(5), pp 927-931, 1987.
- [19] N.Hannes, D.A. Michele, D.V. Josef, G. Antonio, 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.
- [20] M. Hamburger, S. Adler, D. Baumann, A. Förg, B. Weinreich, Purification préparatoire des esters anti-inflammatoires principaux de triterpénoïde de Souci (*Calendula officinalis*). Fitoterapia, 74, pp 328-338, 2003.
- [21] F. Alexander, L. Günther, P. Harun, W. Bernd, G. Sabine, O. Frank, Supercritical Fluid Extraction of *Calendula officinalis* L. in Combination with Adsorptive Clean-up. Journal of Eng. Life Sci. 2, pp 79-82, 2002.

- [22] G. S. Chakraborty, Phytochemical Screening of *Calendula officinalis* linn leaf extract by TLC. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy (IJRAP), 1(1), pp 131-134, 2010.
- [23] P. Lidija, L. Ika, S. Verica, A. Duan, T. Vele, An investigation of CO₂ extraction of marigold (*Calendula officinalis* L.). Journal Serbian of Chemistry Society (JSCS), 72(4), pp 407-413, 2007.
- [24] C. Pizza, N. Tommas. Sesquiterpene glucosides based on the alloromadendrane skeleton from *Calendula arvensis*. Phytochemistry, 27(7), pp 2205-2208, 1988.
- [25] C. Pizza, N. Tommas. Plants metabolites. A new sesquiterpene glucoside from *Calendula arvensis*. Journal of Natural Products. 50 (5), pp 784-789, 1987.
- [26] C. Pizza, N. Tommas, Structure and in vitro antiviral activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula*. Journal of Natural Products, 53 (4), pp 830-835, 1990.
- [27] K. Chandran Preethi, G. Kuttan, R. Kuttan. Activité anti-inflammatoire de l'extrait de fleur du *Calendula officinalis* et son mécanisme possible d'action. Indian journal of Experimental Biology, 47, pp 113-120, February 2009.
- [28] J. Kühnau, Wld. Rev. Nutr. Diet, 24, pp 117-191, 1976.
- [29] 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.
- [30] M. Silvio. Lavagna, S. Daniela, C. Paola, B. Leonardo, O. Antonio, B. Bruna, Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean. IL Farmaco, 56, pp 451-453, 2001.
- [31] K. Zofia, W. Bogustaw, Structure of a new Triterpene Triol from *Calendula officinalis* flowers. Phytochemistry, 12, pp 2299- 2300, 1973.

- [32] K. BOGUSLAW, Pentacyclic triterpenetriols from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*, 24(12), pp 3066-3067, 1985.
- [33] 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.
- [34] A. Grazyna, K. Zofia, The incorporation of Mevalonate [$2\text{-}^{14}\text{C}$] into the Sterol fractions of *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*, 14, pp 723-726, 1974.
- [35] U. Motohiko, A. Toshihiro, Y. Ken, T. Harukuni, S. Takashi, K. Yumiko. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of *Marigold (Calendula officinalis)* Flower. *Journal of Natural Products*, 69, pp 1692-1696, 2006.
- [36] 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.
- [37] B. Eszter, D. Jozsef, T. Gyula, HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 53, pp 241-250, 2002.
- [38] S. Kishimoto, T. Maoka, K. Sumitoma, A. Ohmiya. Analysis of carotenoide in composition in petals in *Calendula [Calendula officinalis]*. *Biotechnology*, 69(11), pp 2122-2128, 2005.
- [39] S. Gordana, C. Cetkovi, M. Sonja Djilas, M. Jasna Canadanovi. C.Brunet, T.Vesna Tumbas, Antioxidant properties of marigold extracts. *Food research international*, 37, pp 643-650, 2004.
- [40] A. Mariana, A. Natalia, C. Carmen, *Calendula officinalis* flowers source of extract with antioxydant activity. *Annals of West University of Timisoara Series Chemistry*, 13(2), pp 169-176, 2004.

- [41] A. Bilia, M. Bergonzi, S. Gallori, G. Mazzi, F. Francesco Vincieri, Stability of the constituents of *Calendula*, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS, journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 30, pp 613-624, 2002.
- [42] G. Z. Cristiane; M. R. Claudia; R. F. Sandra; I. E. S Terezinha.;D. C. Aparicio Garcia, Activité antifongique d'huile essentielle de *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*) s'élevant au Brésil. Journal brésilien de microbiologie, 39, pp 61-63, pp 1517-8382, 2008.
- [43] A. Grazyna, K. Zofia. Free sterols, steryl ester, glucosides, acylated glucosides and water-soluble complexes in *Calendula officinalis*. Phytochemistry, Pregaman press. 14, pp 627-634, 1974.
- [44] N.Y. Naguib, M.Y. Khalil, S.E. 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 applaid sciences research, 1 (2), pp 176-189, 2005.
- [45] V. Jadranka, L. Andras, W. Hildebert, Structural analysis of a Rhamnoarabinogalactan and Arabinogalactans with Immunostimulating activity from *Calendula officinalis*. Phytochemistry, 28 (9), pp 2379-2383, 1989.
- [46] F.M. Helaly, A. A. Ahmed, M. A. Abd El-Ghaffar. Natural rubber base matrix containing *Calendula officinalis* plant as a source of molluscicidal saponin. Journal of controlled realese, 57, PP 1-7, 1999.
- [47] Z. Cristina, M. R. Claudia, R. F. Sandra, 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.
- [48] P. Julien, B. Toussaint, D. Jean-Marie, D. Nassim, M. Alain, C. Jean, Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. Biochemical Systematics and Ecology, 38, pp 865-874, 2010.

[49] P. Caree, précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. Et fils, 1953.

[50] J.N Joffin, G. Leyral, Microbiologie Technique, Dictionnaire des techniques, Collection biological technique, 3^{eme} édition, CNDP, p 312, 2001.

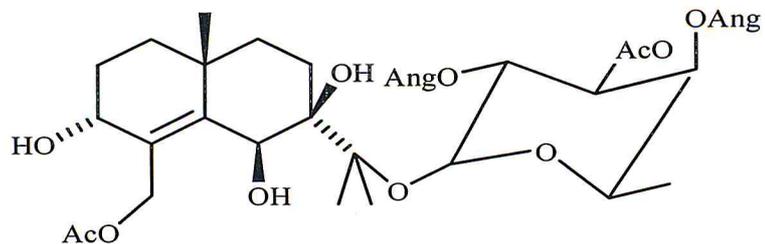
[51] V. Guérin-Faublée, G. Carret, l'antibiogramme : principe, méthodologie, intérêt et limites, journées nationales GTV-INRA, pp 5-12, 1999.

[52] 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.

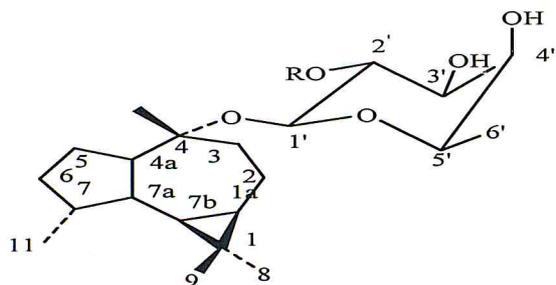
Annexes

Tableau 1: Sesquiterpènes glucosidiques isolés de l'extrait de *Calendula arvensis*

Nom de l'espèce	composés isolés	Planches	Réf
		A	
<i>Calendula arvensis</i>	-3 α ,7 β -dihydroxy-5 β , 6 β -epoxyeudesm-4(15)-ene-11-(O- β -D-fucopyranoside-2'4'-diangelate-3'-methylbutyrate). -3 α ,7 β -dihydroxy-5 β , 6 β -epoxyeudesm-4(5)-ene-11-(O- β -D-fucopyranoside-2'4'-diangelate-3'-acetate)	A1	17
	4-O-(β -D-fucopyranosyl)-4-alloaromadendrole 2'-(acethyl) fucosyl alloaromadendrole 2'-(2''-methyl-butanoyl) fucosyl alloaromadendrole 2'-(3''-methyl-2''-pentenoyl) fucosyl alloaromadendrole	A2 A3	24
	epicubebol glycoside 2'-(2''-methylpropanoyl)fucosyl alloaromadendrol 2'-(hydroxyl)fucosyl alloaromadendrol 2'-(acetyl)fucosyl alloaromadendrol	A4	26
	-(4-0-(β -D-fucopyranosyl)-4-epi-cubebol) (3) -4-epi-cubebol (2) - 11-hydroxy-cubebol (5). -methyl B-D- Fucopyranoside (4)	A5 A6 A7 A8	25

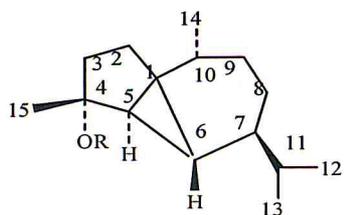
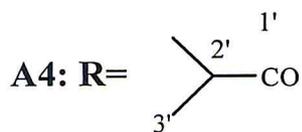


A1



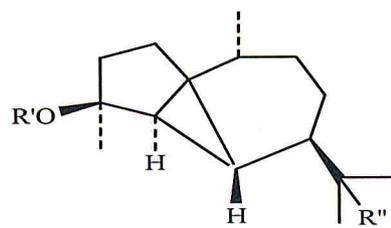
A2: R=Ac

A3: R=H



A5: R=

A6: R= H



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

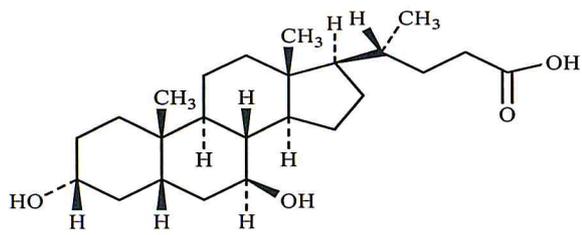
A8 R'=

R''= H

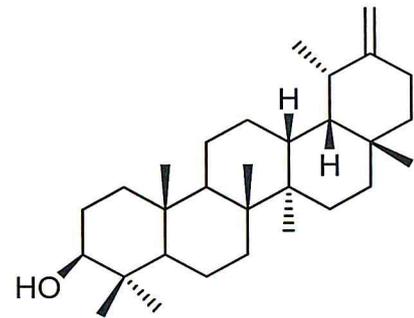
PLANCHE A : Structure des sesquiterpènes glycosidiques isolés de *Calendula*

Tableau 2: Différents triterpènes isolés de l'espèce de *Calendula officinalis* et de *Calendula arvensis*

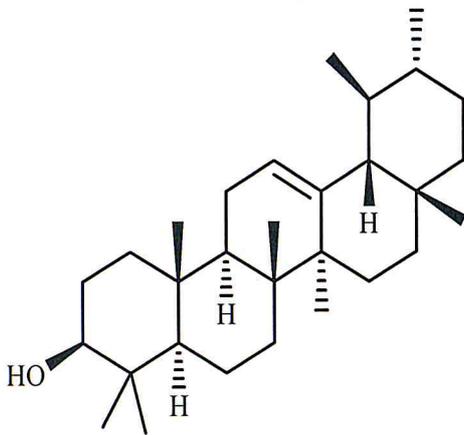
Nom de l'espèce	Classe	Composés isolés	planche B	Ref
<i>Calendula officinalis</i>	Esters de triterpenoides	Faradiol-3-O-myristate	B1	20,21,28
		Maniladiol-3-O-laurate		
		α -amirin		16,20,30,31
		Faradiol ψ -taraxasterol		
	Triterpenoides alcooliques	Myristate de faradiol Monoester de Faradiol		29
		Faradiol β -amyrin		27
		Olean-12-ene-3 β , 16 β , 28-triol triacetate	B2 B3 B4	32
Ursa-12-ene,3, 16, 21-triolacetate	16			
Taraxasterol	34			
Ursadiol	33			
<i>Calendula officinalis</i>	Triterpenoides glucosidiques	β -D-galactopyranosyl.		36
		β -D-glucopyranosyl.		
<i>Calendula arvensis</i>	Triterpenoides glucosidiques	β -D-pyranosyl		18
<i>Calendula officinalis</i>		28-O- β -D-glucopyranoside		
		Oleanolglycoside		21
<i>Calendula officinalis</i>	Triterpenediol-3-monoesters	Triterpenediol-3-monoesters		
		Calendulaglycoside A 6'-O-n-butyl ester (3) Calendulaglycoside B (4) Calendulaglycoside B6'-O-n-butyl ester (5)		35



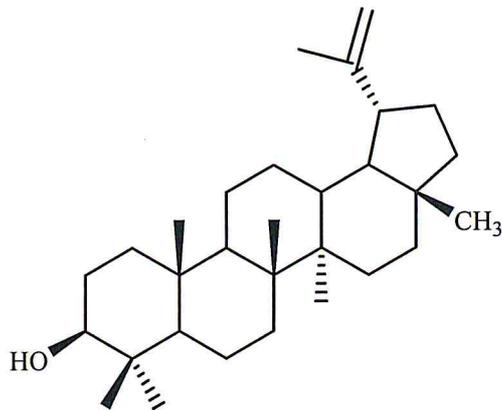
B1: α -amirin



B2: Taraxasterol



B3: Ursadiol

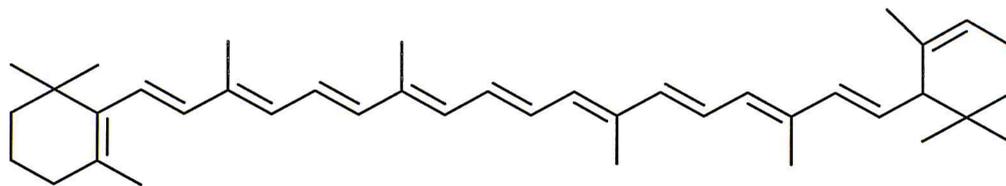


B4: Lupeol

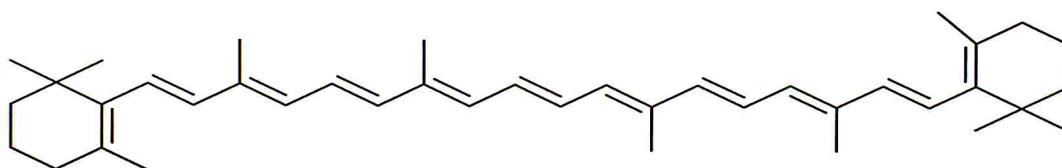
PLANCHE B : Structure des triterpènes isolés de *Calendula officinalis*

Tableau 3: Caroténoïdes isolés de *Calendula officinalis*

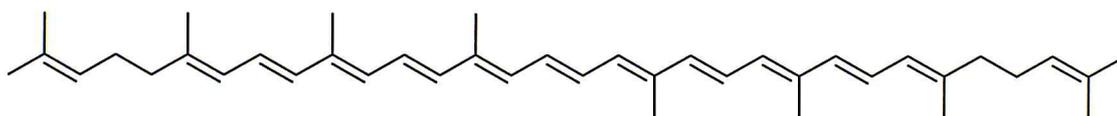
Nom de l'espèce	Composés isolés	Planche C	Réf
<i>Calendula officinalis</i>	β-carotene		21
	Lycopene, β-Carotene Calenduladiol		27
	Lycopene Flavoxanthin Lutein Citroxanthin Rubixanthin Auroxanthin Mutaxanthin		33
	Flavoxanthine α-carotene β-carotene α-cryptoxanthin β-cryptoxanthin Z-cryptoxanthin Lycopene Lutéine	C1 C2 C3 C4	37
	(5Z,9Z)-lycopene (5'Z)-γ-carotene (5'Z,9'Z)-rubixanthin α-carotene Lutein-5,6-epoxide Flavoxanthin Lutein Antheraxanthin β-carotene δ-carotene γ-carotene		38



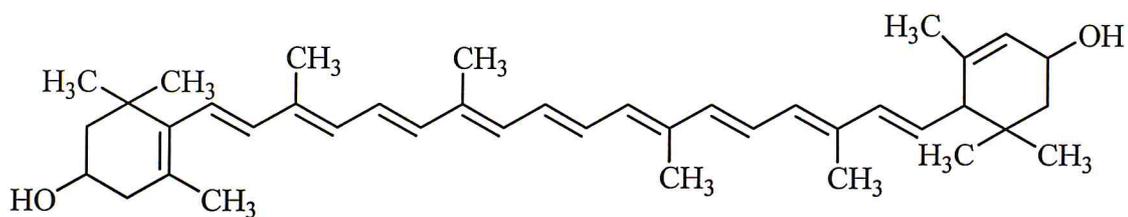
C1: α -Carotene



C2: β - Carotene



C3: Lycopene



C4: Lutein

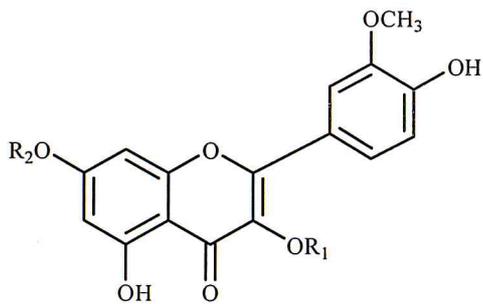
PLANCHE C : Structure des différents caroténoïdes isolés de *Calendula officinalis*

Tableau 4 : Acides phénoliques isolés de l'espèce *Calendula officinalis*

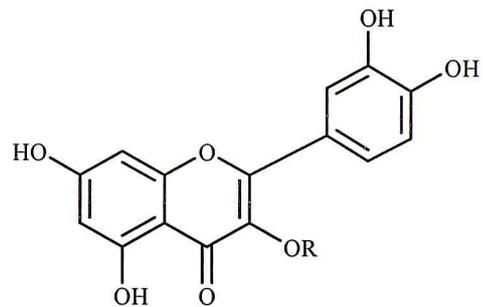
Nom de l'espèce	Composés isolés	Ref
<i>Calendula officinalis</i>	Acide : Caffeique Chlorogenique Coumarique Ferulique Gentisique Trans-O-coumarique O-hydroxyphenylacetique 4-coumarique 4-hydroxybenzoique Protocatechuique Quinique Salicylique (traces) Sinapinique Syringique Vanillique Veratrique	33
	Vanillique Cafféique p-coumarique Chlorogénique p-coumarique	39

Tableau 5 : Composés flavoniques isolés à partir de *Calendula officinalis*

Nom de l'espèce	Composés isolés	Planche D	Réf
<i>Calendula officinalis</i>	isorhamnetin glycosides	D1	21
	Narcissin		33
	Calendo flavoside		
	Isoquercitrin		
	Manghaslin		
	Narcissin		
	Quercetin		
	Quercetin-3 neohesperidoside		
Quercetin-3-rutinoside			
Rutin			
Syringin			
Isorhamnetin 3-O-neohesperidoside	D2 D3	35	
Isorhamnetin			
Isorhamnetin 3-O-rutinoside			
Quercetin 3-O-glucoside			
Quercetin 3-O-rutinoside			
Kaempferol	D4	39	
Quercétine			
Rutine			
Isorhamnetin(3'-metoxi-4',3,5,7-tetrahydroxyflavone)		40	
Isorhamnetin-3-O-glycoside			
Rutine			
Quercetin-glycoside			
Quercetin-neohesperoside			
Iorhamnetin		41	
Quercétine			
Isoquercitrin			
Isorhamnetin-3-O-rutinosyl-Rhamnoside			
Rutin			
Narcissin			

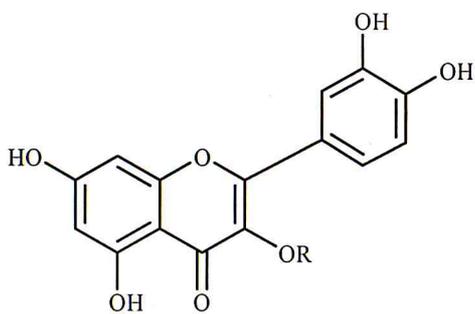


D1: Rutine



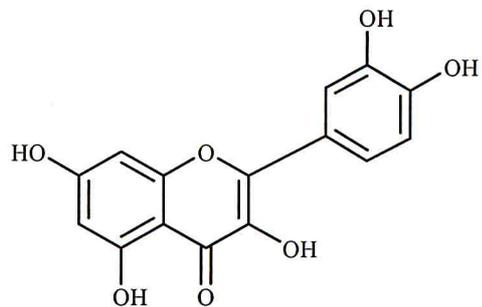
D2: R= Glu

Quercetin 3-O-glucoside



D3: R= Rha(1 → 6) glu

Quercetin 3-O-rutinoside

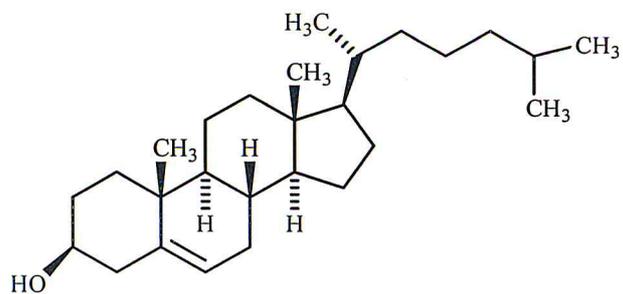


D4: Quercetine

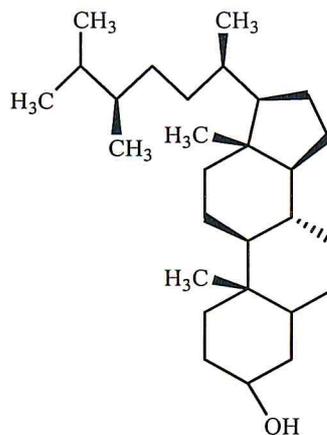
PLANCHE D: Structure des flavonoides isolés à partir de l'extrait de *Calendula officinalis*

Tableau 6 : Stérols isolés de *Calendula officinalis*

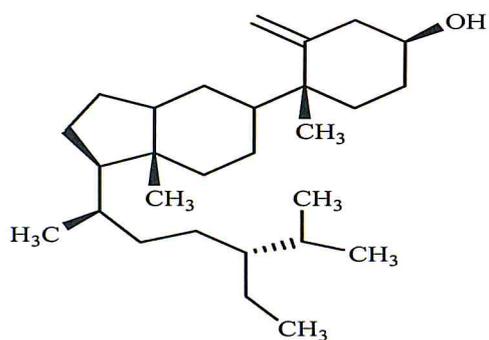
Nom de l'espèce	Composés isolés	Planche E	Ref
<i>Calendula officinalis</i>	Campestanol Campesterol Cholest-7-en-3- β -ol Cholestanol Cholesterol Stigmast-7-en-3- β -ol Stigmastanol (=fucostanol) Stigmasterol α -Sitosterol β - Sitosterol		33
	Stanols Δ^7 stérols Δ^5 stérols Stigmastérol Clerosterol Méthylènecholestérol		34
	Cholestanol Campestanol Stigmastanol Cholest-7-en-3- β -ol 24-methylcholest-7-en-3- β -ol Stigmast-7-en-3- β -ol Cholesterol Campesterol Sitosterol 24-methylchol-esta-5,22-dien-3- β -ol 24-méthylènecholesterol Stigmasterol Clerosterol	E1 E2 E3 E4 E5	43



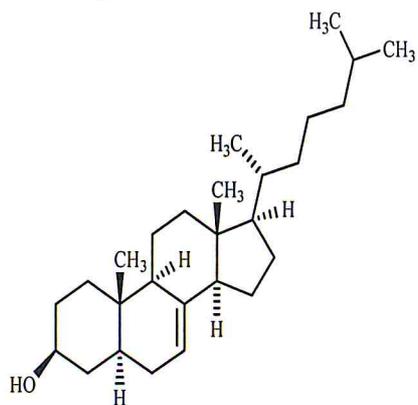
E1: Cholestanol



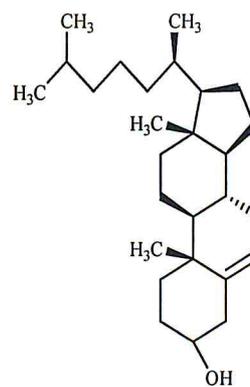
E2: Campestanol



E3: Stigmastanol



E4: Cholest-7-en-β-ol



E5: Cholesterol

PLANCHE E: Structure des stérols isolés de *Calendula officinalis*

Tableau 7: Acides gras isolés de *Calendula officinalis*

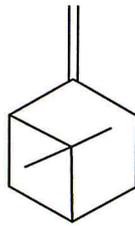
Nom de l'espèce	Composés isolés	Ref
<i>Clendula officinalis</i>	-Acide 9-Hydroxy-trans-10-cis-12-octadécadiénique -Acide Caprique -Acide Caprylique -Acide Dimorphecolique -Acide Laurique -Acide Linoléique -Acide Linoléique -Acide Myristique -Acide Palmitique -Acide Palmitoléique -Acide Pentadécanoïque -Acide Stearique -Acide Calendique	33
	Acide : - Decanoïque -Undecanoïque -Laurique -Tridecanoïque -Myristique -Pentadécanoïque -Palmitique -Palmitoléique - Margarique -Stearique -Oleique -Linoléique -Linoléique -Eicosanoïque -Eicosatriénoïque -arachidique -Behénique	43

Tableau 8: Composés identifiés dans l'huile essentielle des espèces du genre *Calendula*

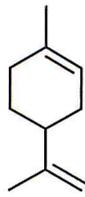
Nom de l'espèce	Composés isolés	Les principaux composés	Planche F	Ref
<i>Calendula arvensis</i>	Neo-allo-ocimene α -pinene γ -terpinene δ -cadinene	δ -cadinene α -cadinol		46
<i>Calendula officinalis</i>	α -cadinene α -cadinol 1,3,5-cadinatrienne α -muurolol δ -cadinene	δ -cadinene 1,3,5-cadinatrienne α -muurolol		42
	α -copaene α -ionone α -humulene β -ionone Ledene α -cadinene α -calacorene caryophyllene oxide copaen-4- α -ol Ledol 1,10-di-epi-cubene 1-epi-cubenol Epi- α -muurolol α -cadinol	δ -cadinene α -cadinol		47
	3-pinene Phellandrene p-cymene Linalool Acetate de linalyl Camphre Carvone Geraneol Acetate de geranyl Terpinene Cadalene	Linalool Acetate de linalyl		44
	α -cadinol γ -cadinène Ledane δ -cadinene 1,8-cineole			48



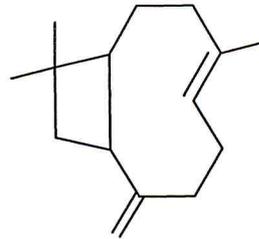
α -pinene



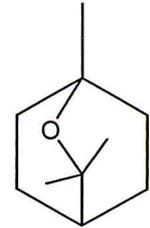
β -pinene



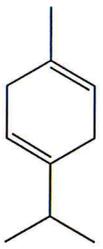
Limonene



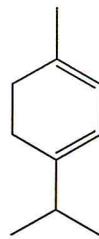
Caryophyllene



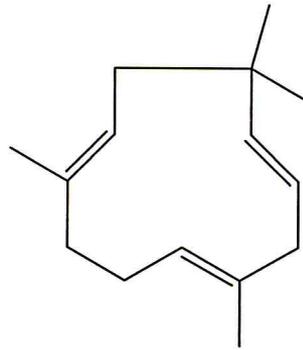
1,8-Cineol



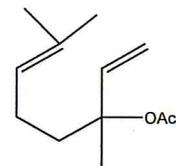
γ -terpinene



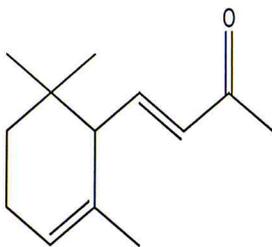
α -terpinene



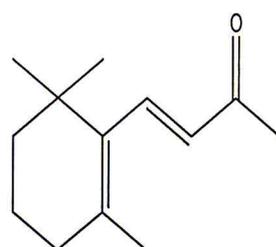
α -Humulene



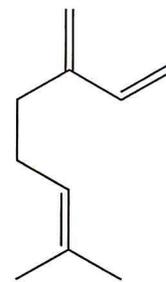
Acétate de linalyle



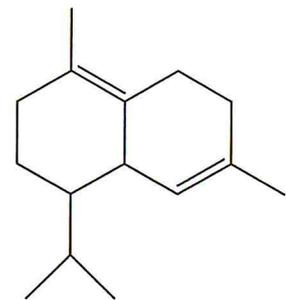
α -ionone



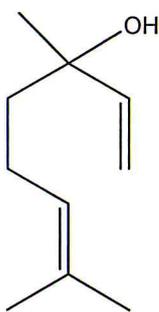
β -ionone



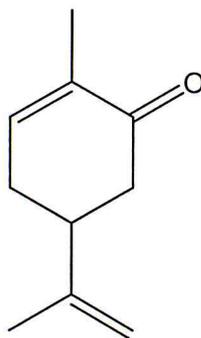
Myrcene



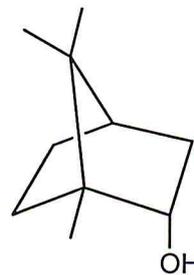
δ -Cadinene



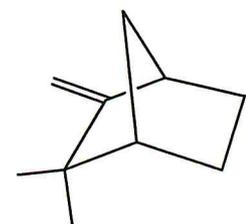
Linalol



Carvone



Borneol



Camphen

PLANCHE F: Structures des monoterpènes et des sesquiterpènes isolés de l'huile essentielle de *Calendula officinalis* et de *Calendula arvensis*

Tableau 9 : Activités biologiques effectuées sur certaines espèces appartenant au genre *Calendula*

Ref	Nom d'article	Tests biologiques
26	Structure and in vitro antiviral activity of sesquiterpene glycosides from <i>Calendula arvensis</i>	Tests antiviraux
27	Activité anti-inflammatoire de l'extrait de fleur du <i>Calendula officinalis</i> et son mécanisme d'action	Activité anti-inflammatoire
30	Efficacy of <i>Hypericum</i> and <i>Calendula</i> oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean	Activité antifongique
33	Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (<i>Calendula officinalis</i>) petals and extracts used in cosmetic and personal care products	Activité : Anti-inflammatoire Antispasmodique Anticancéreuse
35	Anti-Inflammatory, Anti-Tumor Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of <i>Marigold</i> (<i>Calendula officinalis</i>) Flowers	Les activités cytotoxiques
39	Antioxidant properties of marigold extracts	Activité anti-oxydante
40	<i>Calendula officinalis</i> flowers , source of extracts with antioxidant activity	Activité antioxydants
42	Activité antifongique d'huile essentielle du <i>C. officinalis</i> de Brésil.	Activité antimicrobienne Activité antifongique
45	Structural analysis of a Rhamnoarabinogalactan and Arabinogalactans with immuno-stimulating activity from <i>Calendula officinalis</i>	Activité immunostimulante
52	Antimutagenic activity of some saponins isolated from <i>Calendula officinalis</i> L., <i>Calendula arvensis</i> L. and <i>Hedera helix</i> L.	Activité antimutagénique