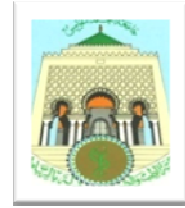




**UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**



Année: 2018

N° de thèse : 19/17

CENTRE D'ÉTUDES DOCTORALES DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THESE DE DOCTORAT

SPECIALITE : SCIENCES DU MEDICAMENT

OPTION : BIOTECHNOLOGIE MÉDICALE

SOUS LE THEME :

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE, SCREENING BIOLOGIQUE ET
PHARMACOLOGIQUE DES FLEURS DE *CALENDULA ARVENSIS*.**

Présentée et soutenue le 3 /7 /2018

Par

Dr. Abdul-Malik ABUDUNIA

Devant le Jury :

| | | |
|------------------------------|--|------------------------------|
| Pr. Katim ALAOUI | Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat | Président |
| Pr. Azeddine IBRAHIMI | Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat | Directeur de thèse |
| Pr. M'Hammed ANSAR | Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat | Co-Directeur de thèse |
| Pr. Amina ZELLOU | Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat | Examineur |
| Pr. M'hammed ANEB | Faculté des Sciences de Rabat | Examineur |
| Pr. Mustapha DRAOUI | Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat | Rapporteur |
| Pr. Said LOUAHLIA | Faculté de Polydisciplinaire de Taza | Rapporteur |
| Pr. Rachid ELJAOUDI | Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat | Rapporteur |

أهداء



إلى البعيدين جداً الذين لم تصلهم كلماتي إلى الذين غادروني دون ترتيب و
دون موعد مسبق إليكم #والدي ووالدتي الغاليين .. انا افتقدكم
اللهم ارحمهما جميعاً رحمة الأبرار واسكنهم فسيح جناتك
إلى زوجتي الصابرة توام الروح ام اولادي ليلى محمد زيد الخاشب
إلى ابنتي قرة عيني جمانة عبدالملك ابودنيا
إلى حبيبي شمعتي المضي مجد عبدالملك ابودنيا
إلى حياتي شهد عبدالملك ابودنيا
إلى جميع اخواني واخواتي الكرام الطيبين
أهديكم هذا العمل المتواضع



Curriculum Vitae (CV)

PERSONAL DATA

Personal details

- **Family Name :** ABUDUNYA
- **First Name :** Abdulmalik
- **Gender :** Male
- **Date of birth :** 1/1/1978
- **City of Birth :** Hajjah-Yemen
- **Country of Birth :** Yemen
- **Nationality :** Yemen
- **No. of Passport :** 03810286



E-mail : abdul-malik2009@live.fr

E-mail : abdelmalek.dunia@um5s.net.ma

Permanent Personal Address

- **Street:** Abu Dhabi Street. Safia. Ans Supermarket- Sana'a
- **Postal Zip Code :** 01244540
- **City :** Sana'a
- **Country :** Yemen
- **Telephone mobile :** 00967777863211, 00967777414188

ACADEMIC EDUCATION

Second Degree.

- Omar Ibn- AL-Ghtab School.
- Hajjah - Yemen.

Bachelor Degree in Pharmacy.

- **University :** Sana'a -Yemen
- Faculty of Medicine and pharmacy

Master Degree of Medical biotechnology

- **University :** Mohammed V - Agdal,
- **University Department :** Faculty of Science
- **City :** Rabat
- **State :** Master degree of biotechnology in the field of health
(Pharmaceutical biotechnology production).
- **Country :** Morocco
- **Degree obtained :** Good
- **In Discipline :** Very good

Master degree of Clinical Pharmacy (Diploma of High Superior Study)

- **City :** Rabat
- **State :** Equivalent Master
- **Country:** Morocco.
- **Subject of the degree:** only courses
- **Duration to obtain degree :** 2 years
- **Starting date :** 2009/2010
- **Graduate date :** 2011/2012
- **Total Grade :** VERY GOOD
- **University:** Mohammed V
- **Faculty of Medicine and pharmacy**

Diploma of formation theory in the clinical research (Biostatistics, Types of study, Clinical essays, Ethic of research)

- **City :** Rabat
- **Country:** Morocco.
- **Subject of the degree:** only courses
- **Duration to obtain degree :** 1 year
- **Graduate date :** 2015/2016
- **Total Grade :** VERY GOOD
- **University:** Mohammed V -Rabat.
- Faculty of Medicine and pharmacy

PhD student of Pharmaceutical Biotechnology (4 Final years)

- **Country:** Morocco.
- **Subject of the degree:** courses and research
- **Duration to obtain degree :** 4 years
- **Starting date :** 2013/2014
- **Graduate date :** 2017/2018
- **University:** Mohammed V – Rabat- Faculty of Medicine and pharmacy

Courses and Awards

- **Attestation success in French language.**
 - **City :** Rabat
 - **State :** Equivalent Diploma
 - **Country:** Morocco.
 - **Subject of the degree:** courses
 - **Duration to obtain degree :** 1 years
 - **Starting date :** 2008/2009
 - **Graduate date :** 2009/2010
 - **Total Grade :** VERY GOOD
 - **University:** Mohammed V– Rabat.Faculty of Education Science
 - **Attestation success in French language from Institut français de Rabat**
From 1/05/2017 to 1/11/2017.
- **Attestation success in English language** Seeds Institute, Sana'a Capital .Yemen.
- **Attestation of best Research Scientific paper:** « Drug combination and application on helicobacter pylori ». Sana'a University, Faculty of Medicine and pharmacy Yemen, Participate in international Conference for Arabic students in Beirut- Lebanon.
- **Attestation of the first paper published in the year 2014** « Mohammed V University –Rabat ».
- **Attestation of of the first paper published 2014–2015** «Fondation Cheikh Zaid ibn soltan » **18 mars 2015**
- **Attestation success in use « Windows - power point. Excel. Word »** Miage School – Rabat. Morocco.
- **Attestation of work in «Pharmacy » Dr. Abdul kader Almawtakil hospital,**Sana'a .Yemen.
- **Attestation of work in « Raghdan pharmacy » -** Sana'a .Yemen.
- **Attestation of work as supervisor on group of « Al-majd Pharmacy »** Sana'a Yemen.
- **Attestation of work as medical representative on group of « Sanofi-Aventis » part-time -6 years ago in Yemen .**Sana'a .Yemen.
- **Attestation of lecture** in pharmaceutical biotechnology 1-11-Alrazi University- Sana'a – Yemen.
- **Attestation of lecture** in Clinical pharmacy - Alnaser University - Sana'a – Yemen.

ACADEMIC BACKGROUND AND SKILLS

Attestation of Participation

- **Attestation of Participation** in Workshop « Computational genomic » in CNRST -2 week in Rabat-Morocco.
- **Attestation of Participation** in Workshop « Analysis of cytometry in flux »- Hassan 2 University- Mohammedia- Morocco.
- **Attestation of Participation** in Workshop « Genetic medical »- Institute National of Gene -16- 18 Rabat-Morocco.
- **Attestation of Participation** in Workshop « Synthesis of biomedical and protein engineering » - Shoeb ALdockali University – Al-Jadidah.
- **Attestation of Participation** in Workshop « 7th Scientific congress of Trans Mediterranean heterocyclic chemistry (TRAMECH-7)»-November 27-30,2013-Rabat-Morocco.
- **Attestation of Participation** in Workshop « 3^{eme} Edition des Jounées Jeunes chercheurs de la SMCT» Les 20, 21, and 22 November 2014.Intitule by INNOVATION THERAPEUTIQUE; DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUE.
- **Attestation of Participation** in Workshop « GLOBAL AUTISM SU MMIT » Les 12 -13 December 2014». Mohammed V -Faculty of medicine and pharmacy- Rabat - Morocco
- **Attestation of Participation** in Workshop « 5th Scientific Days CEDOC-SVS»-Mohammed V -Faculty of medicine and pharmacy- Rabat - Morocco.
- **Attestation of Participation** in International Conference on Medical, Biological and Pharmaceutical Sciences (ICMBPS) Ottawa, Canada 27th-28th December, 2017. "Anticandidal, Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Activities of *Calendula Arvensis* CA Flowers"

- **Attestation of** Participation in Workshop « Scopus-Science direct mendeley »-Central national for the research scientific and technique- Rabat - Morocco.
- **Attestation of** Participation in Workshop « Chimie et Science Pharmaceutiques»- Mohammed V -Faculty of medicine and pharmacy- Rabat - Morocco.
- **Attestation of** Participation in Workshop « les applications Biotechnologies au service du biomedical »-Mohammed V -Faculty of medicine and pharmacy- Rabat - Morocco.
- **Attestation of** Participation in 6^{EMES} Journées Scientifiques du CEDOD SVS and les 3^{EMES} Journées Scientifiques D'Amadoc by affiche communication intitule « Characterization of antifungal activity of some medicinal plants against *Candida* spp »-Mohammed V -Faculty of medicine and pharmacy- Rabat - Morocco.
- **Attestation of** Participation in 6^{EMES} Journées Scientifiques du CEDOD SVS and les 3^{EMES} Journées Scientifiques D'Amadoc intitule by « Processes du publication »-Mohammed V -Faculty of medicine and pharmacy- Rabat - Morocco
- **Attestation of** experience practice in « Culture cells »- Biopharma-Society for 3 Months,
- **Attestation of** experience practice in « bacteriology Medical»-Institute National of Gene for 2 Months, Rabat Morocco.
- Experience practice in culture cells unit in biotechnology laboratory -Mohammed V -Faculty of medicine and pharmacy- Rabat - Morocco.
- Editorial Board member for the **Bioequivalence & Bioavailability International Journal**. <https://medwinpublishers.com/BEBA/editorial-board.php>.
- Editorial Board member for **Universal Journal of Pharmaceutical Research** www.ujpr.org.

Employment background

- President of Syndicat Yemenites community pharmacist's -Yemen (now).
- General Manager of Medical supply and equipments, Ministry of health, Yemen (previous).
- Lecture in Faculty of Pharmacy. Sana'a University (now). (Pharmaceutical Biotechnology. Clinical pharmacy)
- Lecture in Faculty of Alnassir. Alnassir University (Pharmaceutical Biotechnology. Clinical pharmacy)
- Lecture in Faculty of AlRazi. AlRazi University (Pharmaceutical Biotechnology. Clinical pharmacy)

Language Skills

- **English language**
 - Good, Oral, Written, reading, second language in my country
- **French language**
 - Good, Oral, written, reading, my study through 6 years ago in Morocco.
- **Arabic language »**
 - Excellent, Oral, written, reading, Mother language.

Post-doctoral project

- **Another projects - Application choice**
 - **Subject 1:** Novel gel-associated drug-loaded Nano carriers for intratumoral delivery
 - **Subject 2 :** Design of new multifunctional Nano carriers for proteins delivery
 - **Subject 3:** Dental stem cell delivery through new injectable matrices for spinal cord

REFERENCES

- **First Reference :**
 - **Name :** Pr.Azeddine IBRAHIMI
 - **Title :** professor of Biotechnology Medical
 - Faculty of Medicine and Pharmacy Mohammed V- University-Rabat ,
 - **Telephone :** 00212660240131
 - **E-mail address :** a.ibrahimi@um5s.net.ma
- **Second Reference :**
 - **Name :** Pr M'Hammed ANSAR
 - **Title:** professor of Medicinal chemistry- FMPR.
 - **E-mail address :** ansarmammed@gmail.com

Production scientific

https://www.researchgate.net/profile/Abdul_Malik_Abudunia Abdul-Malik Abudunia : 9.86 Research items 16

Reads

2,590

Citations : 10

AVANT PROPOS

- Ces travaux ont été réalisés à la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en sciences du médicament, option biotechnologie médicale.
- Le **Professeur Azeddine IBRAHIMI** de la dite Faculté a supervisé le déroulement de mes travaux expérimentaux.
- La préparation des extraits végétaux a été réalisée au Laboratoire de Chimie Thérapeutique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, sous la direction du **Professeur M'Hammed ANSAR**.
- L'étude de l'activité antimicrobienne s'est déroulée au Département de Bactériologie Médicale de l'institut National d'Hygiène (INH) à Rabat, sous la direction du **Docteur Khadija KHEDID**.
- L'étude de l'activité cytotoxique a été réalisée au Laboratoire de Biotechnologie (**MedBiotech**) à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, sous la direction du **Professeur Azeddine IBRAHIMI**.
- L'étude phytochimique et le criblage pharmacologique ont été réalisées au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohammed V, sous la direction des membres des équipes de Pharmacocinétique et Pharmacodynamie.

REMERCIEMENTS

- Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.
- Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragée et soutenue durant ces quelques années, qui sont passées si rapidement. Je voudrais leur adresser ces quelques mots afin de les remercier. C'est avec une grande joie que j'ai débuté cette thèse, et un léger pincement au cœur que j'en arrive aujourd'hui à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail. Ainsi, une page importante de ma vie se tourne.
- Un profond remerciement à **Monsieur le professeur Saaïd AMZAZI**, Ministre de l'Éducation Nationale, de la formation professionnelle, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.
- Mes sincères remerciements sont adressés à **Monsieur le Professeur Mohammed ADNAOUI**, Doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour l'intérêt constant qu'il porte à la recherche scientifique.
- Egalement à **Monsieur le Professeur Jamal TAOUFIK**, Directeur du Centre d'études Doctorales des Sciences de la Vie et de la Santé (CEDOC-SVS) de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat pour sa bienveillante attention, on le remercie très vivement.
- La première personne à qui je souhaite adresser mes chaleureux remerciements, mon directeur de thèse : **Monsieur le professeur Azeddine IBRAHIMI**, qui a accepté de diriger ce travail, il m'a guidé tout au long de son élaboration, qui a effectué de multiples relectures patientes de mes écrits et a mis à ma disposition un certain nombre d'ouvrages de Biotechnologie. Merci à vous de m'avoir soutenue et encouragée tout au long du chemin de la thèse, pour votre encadrement et pour temps pour me former. Merci de m'avoir accordé votre confiance durant toutes ses années.
- De même à mon co-directeur, **Monsieur le professeur M'hammed ANSAR**, j'adresse mes plus vifs remerciements pour son aide, sa gentillesse au quotidien, tous ses encouragements et son soutien dans les moments difficiles.
- Ma reconnaissance à **Madame le professeur. Katim ALAOUI**, responsable de l'UFR: Toxicopharmacodynamie, pour l'honneur d'avoir acceptée la présidence du jury de cette thèse. Qu'elle soit assurée de ma respectueuse considération.

- Je remercie profondément **Monsieur le Professeur, Mustapha DRAOUI**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, de bien vouloir accepté de siéger parmi le jury.
- Ma reconnaissance est adressée également **Monsieur le Professeur, Said LOUAHLIA**, Professeur à la Faculté Polydisciplinaire de Taza, d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis honoré de sa présence parmi les membres de jury de cette thèse.
- Je remercie vivement **Monsieur le professeur, Rachid ELJAOUDI**, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, d'avoir accepté de juger ce travail. Je le prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma plus grande estime.
- Mes remerciements aux membres de jury d'avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et d'examiner ces travaux de recherche : à **Madame le Professeur, Amina ZELLOU** et à **Monsieur le Professeur M'hammed ANEB**, Je leurs suis particulièrement reconnaissant de m'avoir accompagné dans cette dernière étape de travail.
- J'adresse mes remerciements à **Dr. Khadija KHEDID**, du Département de Bactériologie Médicale de l'institut National d'Hygiène (INH) à Rabat, pour sa disponibilité et son aide dans la réalisation des tests d'activité antimicrobienne.
- Je tiens également à remercier **Monsieur le Professeur. Youssef RAMLI**, pour ses conseils et ses orientations sur terrain, **Monsieur Dr.Abdelkarem SALAMA**, pour son aide, ses conseils et sa sympathie qui m'a accompagné durant mes études, **Dr. Ilias MARMOUZI**, pour l'ensemble des analyses qui ont été effectuées au sein du laboratoire, pour sa disponibilité et son aide dans la réalisation des tests d'activité antioxydante et antidiabétique.
- Je tiens aussi à remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie (LPTR), pour leur constante bonne humeur. **Saad Fettach, Meryem EL JEMLI, Karima SAYAH, Rabie KAMAL**.
- Mes remerciement également à **Monsieur Dr. Mourad KHARBACH** (LPTR et Département de Chimie analytique et technologie pharmaceutique à Vrije Université Brussel) pour sa contribution à mes travaux de recherche.
- Je tiens également à remercier **Monsieur le Professeur. Mohammed Sghir TALEB**, Enseignant-Chercheur à l'Institut Scientifique de Rabat, pour m'avoir aidé dans la collection et l'identification des plantes.
- Je remercie également **Monsieur le Professeur. Brahim MOJEMMI** pour l'aide

précieuse et pour l'extrême gentil.

- Je tiens aussi à remercier tous les enseignants, doctorants du département de Laboratoire de Biotechnologie (**Med-Biotech**), qui m'ont aidé, guidé et encouragé ; que je ne saurai assez remercier pour tout ce qu'ils ont fait. Merci pour tous les bons moments au sein du laboratoire.

- Que vous direz mes chers parents ? A qui j'ai promis de faire un doctorat. Comme j'aurai voulu que vous soyez aux premiers rangs. Vous m'appelais déjà Docteur parce que vous croyais en moi. Je vais obtenir mon diplôme et vous me manquez encore plus. Que vous âmes reposent en paix !

Merci à mes proches notamment mes très chers frères, sœurs: **Mohammed, Abdulghani, Mahmoud, Amat alsalam, Asmhane, Imane.**

PRINCIPALES PUBLICATIONS

1. **Abdul-Malik Abudunia**, M'Hammed Ansar, Jamal Taoufik, Youssef Ramli, El Mokhtar Essassi, Azeddine Ibrahimi and Khadija Khedid.; Evaluation of antibacterial activity of extracts from *Calendula arvensis* flowers; JCPR, 2014, 6(8):156-161. **(Premier Prix 2014 -2015)**.
2. **A. M. Abudunia**, I. Marmouzi, M.E.A.Faouzi, Y. Ramli , J. Taoufik, N. El Madani, E.M. Essassi, A. Salama, K. Khedid, M. Ansar, A. Ibrahimi, Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers, MYCMED, Dec 2016 - 655; No. of Pages 8.
3. **Abdul-Malik Abudunia**, Rabie Kamal, Nabeel muhsen ziad, Methaq Algabr, Khadija Khedid, Katim Alaoui, M'Hammed Ansar and Azeddine Ibrahimi. In Vivo Potential Anti-inflammatory Activity of Extracts from *Calendula Arvensis (CA)* Flowers, Book INTECH opens science, Sep 2017, ID 27760908.
4. **A.M. Abudunia**, My.Hafidi, M. Algabr, J. akachar, H. Almahbashi, Y.Ramli, M. Ansar, A. Ibrahimi, K. Khedid, Antimicrobial activity of hydro distilling essential oils from some Moroccan aromatic plants medicinal, JMESCEN, Sep 2017, 2028-2508.
5. Ali Gamal Al-kaf, Anas Ahmad Almahbashi, M'Hammed Ansar, Azeddine Ibrahimi, **Abdul-Malik Abudunia**. Synthesis and antimalarial activity of new quinazolinone-4 derivatives; Research in Pharmacy and Health Sciences, E-ISSN: Oct 2016, 2455-5258.
6. Al-kaf Ali , Akachar Jihane, Bennani Fatima Zahra, El Jaoudi Rachid, Ansar, M'Hammed, Ibrahimi Azeddine, **Abudunia Abdul-Malik**. Synthesis, analgesic, anti-inflammatory and molecular docking studies of new quinazolin-4-one derivatives. J. Mar. Chim. Heterocycl. Volume 16, N° 1 Décembre 2017-142-156.
7. Methaq Algabr, Nabil Al-Hajj, **Abdul-malik Abudunia**. Abderrahmane Romane and Hussein AlWadhaf, Screening of Yemeni medicinal plant for antibacterial and Antifungal activities, (Advances in Natural and Applied Sciences); 8(10) , Jun 2016. Pages: 28-32.
8. Methaq Algabr, Nabil Al-Hajj, **Abdul-malik Abudunia**, Intisar Abdelrahim Bashir ; Antioxidant activity from the aerial parts of *Anisotestrisulcus* from Yemen, Advances in Natural and Applied Sciences. 10 (16); Nov 2016, Pages: 12-16.
9. Methaq Algabr, **Abdul-malik Abu Dunia**, Hanane Aissaoui, Leila Hammoud, Ratiba Mekkiou, Samir Benayache and Fadila Benayache, Flavonoids glycosides from

leaves of *Catha edulis* (Celastraceae), *Der Pharma Chemica*, Nov 2015, 7(11):193-196.

10. Jihane Akachar, **Abdul-Malik Abudunia** , Rachid El Jaoudi , Fatima Ezzahra Bennani ,Mohammed Ansar , Azeddine Ibrahimi , Al-kaf A.G . Synthesis, anti-hypoxic activity and molecular docking studies of new quinazolinone-4 derivatives. *ISESCO JOURNAL of Science and Technology* No 23, PP, 5-14.

11. H.Almahbashi, A.El Shibany, Sh.Al-Massarani, K. Khedid, M.Ansar, A.M.Abudunia and A. Ibrahimi: Preliminary Phytochemical composition and biological activities of methanolic extract from *Commiphora Gileadensis L.* *ISESCO JOURNAL of Science and Technology* No 23, PP, 23-28.

12. Abdelkrim Salama, **Abdul-Malik Abudunia**, Azeddine Ibrahimi and Layachi Chabraoui. A promising new strategy from skin to primordial germ cells for testicular reparation and spermatogenesis restoration. *ISESCO JOURNAL of Science and Technology* No 23, PP, 37-44.

❖ **ARTICLES EN COURS DE REDACTION**

13. **Abdul-Malik Abudunia**, Ilias Marmouzi, Mourad Kharbach, Meryem El jemli, Karima Sayah, Abdelaziz Bouklouze, M'Hammed Ansar , My El Abbes Faouzi, **Azeddine Ibrahimi**, Phenolic compounds and in vitro antidiabetic activities of *Calendula arvensis* flowers.

14. **A.M. Abudunia**, Ali Gamal Al-kaf, Ali Al-Mahdar, M. Ansar, A. Ibrahimi, Y. Ramli. Screening of Yemenite Aphrodisiac ayurvedic/Herbal Healthcare Products for Adulteration with Sildenafil, Tadalafil and/or Vardenafil Using HPLC.

15. **Abdul-Malik Abudunia**, Youness Boukharsa, Al-kaf A.G, Ali-Al-Mehdar, Jamal Taoufik, Fatima Ezzahra Bennani, Azeddine Ibrahimi and M'Hammed Ansar. Synthesis ,In-vitro cytotoxicity activity and molecular docking of some pyridazin-3(2H) ones-derivatives against human Rhabdomyosarcoma (RD) and Vero cell lines (L20B).

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHÉS

Communications à des congrès Internationales :

Communications orales:

1. La participation à International Conference on Medical, Biological and Pharmaceutical Sciences (ICMBPS) Ottawa, Canada 27th-28th December, 2017. "Anticandidal, Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant activities of *Calendula Arvensis* CA Flowers".
2. La participation à l'occasion des 6^{ème} journées Scientifiques du Cedoc et 3^{ème} journées de l'Ama Doc, du 04 au 05 Mars 2015 "toxicité, cytotoxicité et activité anticancéreuse de *l'asphodèle l'asphodèles microcarpus*".

Communications Affichées :

3. La participation à l'occasion des 6^{ème} journées Scientifiques du Cedoc et 3^{ème} journées de l'AmaDoc, du 04 au 05 Mars 2015" Characterization of antifungal activity of some moroccan medicinal plants extracts. Congrès international sur les plantes aromatiques et médicinales le 26-28 Mars 2009.
4. La participation à International Organization conference for Chemical Sciences in, Development Plant Chemistry International Symposium Marrakech, Morocco April, 7 – 10, 2015. "The Plant Kingdom: source of drugs, nutraceuticals and cosmetics « Antioxidant and cytotoxic activities of extracts from *Calendula arvensis* flowers on acute myeloid leukemia cells.

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1 .De la plante au médicament..... | 8 |
| Figure 2. Relations entre les principales classes de métabolites secondaires, sources de principes actifs..... | 9 |
| Figure 3 .L'acide 3-farnésyl-2-hydroxy benzoïque..... | 13 |
| Figure 4 .Structures chimiques de la berbérine (a) et de l'inhibiteur des pompes MFS, la 5'-méthoxyhydnocarpine (b), isolés de <i>Berberis fremontii</i> | 14 |
| Figure 5 .Produis naturels dans le traitement des leucémies. | 15 |
| Figure 6 .Aspect morphologique de <i>C.arvensis</i> | 24 |
| Figure 7 . Différentes parties de <i>C.arvensis</i> | 25 |
| Figure 8 . Morphologie de <i>C. arvensis</i> , akènes. A, Rostrate; B, Cymbiforme; C, Annula. | 25 |
| Figure 9 A. Répartition géographique de <i>C.arvensis</i> dans le monde et 9B.dans le Maroc. | 27 |
| Figure 10 .Récolte de <i>C.arvensis</i> | 30 |
| Figure 11 . A) Appariel Soxhlet, B) Rotavapor | 31 |
| Figure 12 .Extraction continue par macération dans l'eau. | 33 |
| Figure 13 .Appareil HPLC-DAD-MS..... | 36 |
| Figure 14 .Microplaque 96 puits contenant les différentes dilutions..... | 47 |
| Figure 15 .A. TC20™ Automated Cell Counter et B. Illustration d'une plaque de 96 puits dont on réalise un test colorimétrique MTT | 50 |
| Figure 16 .Digital plethysmometer LE7500. | 52 |
| Figure 17 . Méthode chimique d'anti inflammatoire aigue..... | 53 |
| Figure 18 .Spectrophotometer UV..... | 58 |
| Figure 19 .Confirmation Scientifique de l'espèce <i>C.arvensis</i> | 60 |
| Figure 20 .Chromatogramme du contenu phénolique composé del' extrait méthanolique... .. | 64 |
| Figure 21 .Chromatogramme du contenu phénolique composé del'extrait aqueux..... | 65 |
| Figure 22 .Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)..... | 69 |
| Figure 23 .Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)..... | 70 |
| Figure 24 .Pouvoir antioxydant équivalente de Trolox d'extraits en utilisant le test ABTS... .. | 70 |
| Figure 25 .Pouvoir de l'activité inhibitrice (test de blanchiment de β -carotène)..... | 71 |
| Figure 26.Quelques photos des zones d'inhibition des extraits relatives aux souches sensibles..... | 82 |
| Figure 27 .Resultats de la cytotoxicité sur la cellule tumorale (myéloïde cellule)..... | 95 |
| Figure 28 .Influence des extraits sur l'œdème à la carragénine | 98 |
| Figure 29 .Influence des extraits sur l'œdème induit par traumatisme expérimentale. | 99 |
| Figure 30 : CI ₅₀ de l'enzyme α - amylase ($\mu\text{g} / \text{mL}$) des extraits et contrôle positif..... | 112 |
| Figure 31 : CI ₅₀ de l'enzyme α - glucosidase ($\mu\text{g} / \text{mL}$) des extraits et contrôle positif..... | 113 |
| Figure 32 : CI ₅₀ de l'enzyme β - galactosidase ($\mu\text{g} / \text{mL}$) des extraits et contrôle positif..... | 113 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1. Quelques exemples de sources végétales riches en composés phénoliques..... | 11 |
| Tableau 2. Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires | 12 |
| Tableau 3: Médicament anticancéreux dérivés des plantes médicinales..... | 16 |
| Tableau 4. Exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-inflammatoire | 18 |
| Tableau 5. Composés végétaux à vertus antidiabétiques | 19 |
| Tableau 6 : Les espèces connues de <i>Calendula</i> | 22 |
| Tableau 7: Taxonomie de <i>C.arvensis</i> | 26 |
| Tableau 8. Procédure expérimentale d'une extraction par percolation SOXHLET..... | 31 |
| Tableau 9. Procédure expérimentale d'une extraction par macération dans l'eau..... | 32 |
| Tableau 10. Réactifs spécifiques et réactions de caractérisation du criblage phytochimique | 33 |
| Tableau 11. Programme (temps, débit et gradient de solvant) utilisé en CLHP analytique pour l'injection de nos extraits ainsi pour les témoins..... | 36 |
| Tableau 12. Rendements des extraits végétaux..... | 60 |
| Tableau 13. Résultats du screening phytochimique | 61 |
| Tableau 14. Teneurs en polyphénols totaux (mg AG ^E /g) et flavonoïdes (mg ER/g)..... | 63 |
| Tableau 15. Caractérisation chromatographique des composés phénoliques | 64 |
| Tableau 16. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) | 68 |
| Tableau 17. Diamètres des zones d'inhibition des différentes des extraits de <i>C.arvensis</i> | 82 |
| Tableau 18. Détermination de la CMI et de la CMB de l'extrait méthanolique | 84 |
| Tableau 19. Détermination de CMI et de CMB de l'extrait N-héxanique | 84 |
| Tableau 20. Evaluation de l'activité antifongique des extraits | 85 |
| Tableau 21. Influence des extraits sur l'œdème à la carragénine..... | 98 |
| Tableau 22. Influence des extraits sur l'œdème induit par traumatisme expérimentale | 99 |
| Tableau 23. Inhibition des enzymes digestives | 111 |
| Tableau 24. Valeurs CI ₅₀ (µg / mL) des extraits et contrôle positif | 112 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---|--|
| AAE : Ascorbic acid equivalent. | IP : Intra-péritonéal. |
| ARN : Acide ribonucléique. | INH : Institute National d'hygiène. |
| ATP : Adenosine triphosphate | KCl : Chlorure de potassium. |
| AINS : Antiinflammatoire non stéroïdien. | MH : Mueller Hinton. |
| ATCC : American Type Culture Collection | mg : Milligramme |
| BHT : Butyl-Hydroxy-Toluène. | mL : Millilitre |
| BHA : Butyl-Hydroxy-Anisole. | MgCl₂ : Chlorure de magnésium. |
| BHQT : Butyl-Hydro-Quinone –Tertiaire. | MDR : Multidrugrésistance. |
| BHI : Brain Heart Infusion. | MEC : Minimum Essential Communications. |
| CA : <i>C. arvensis</i> . | MTT : Tetrazolium bromide salt solution. |
| CMB : Concentration minimale bactéricide. | NaCl : Chlorure de sodium. |
| CMI : Concentration minimale inhibitrice. | NaHCO₃ : Hydrogénocarbonate de sodium. |
| CLED : Cystine Lactose Electrolyte Déficient. | NaH₂PO₄ : Phosphate mono sodique. |
| CO : <i>Calendula Officinalis</i> . | N.d : not determined. |
| Ca Cl₂ : Chlorure de calcium. | LMC : Leucémie Myéloïde Chronique |
| CCK : Cholécystokinine. | OE : Organic extraits. |
| CH₂Cl₂ : Dichlorométhane. | OMS : Organisation Mondiale de la Santé. |
| CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performanc | PC : Poids corporel. |
| COX : Cyclo-oxygénase. | PO : Voie orale. |
| CMH : Children's Memorial Hospital | Pgp : P-glycoprotéine. |
| DMSO : Diméthylsulfoxyde. | PAM : Plantes Aromatiques Medicinal. |
| DPPH : 1.1-diphenyl-2-picryl-hydrazil. | PC : Phenolic Content. |
| DHHDP : déhydrohexahydroxydiphénique. | PBS : Phosphate-buffered saline |
| EA : Extrait Aqueux. | PAF : Platelet activating factor. |
| EM : Extrait Méthanolique. | Ph : Potentiel hydrogène. |
| EH : Extrait N-héxanique. | RSA : Radical-scavenging activity. |
| E.coli : <i>Escherichia coli</i> . | ROS : Reactive oxygen species |
| ER : Equivalent Rutine | SARM : <i>Staphylococcus Aureus Résistant à la Méthicilline</i> . |
| EAG : Equivalent Acide Gallique | SDA : Sabouraud Dextrose Agar. |
| EDM : Episode dépressif majeur. | SC : Sous cutané.* |
| FST : Forced swimming test. | SVF : Sérum de veau foetal |
| FC : Flavonoid Content. | VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine |
| FBS : Fetal Bovine Serum. | TEAC : Trolox equivalent of antioxidant capacity |
| FRAP : Ferric reducing antioxidant power. | TPC : Total Phenolic Content. |
| HLA : Human Leukocyte Antigen | Trolox : 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. |
| H.Es : Huile Essentielle. | |
| HHDP : hexahydroxydiphénique. | |

SOMMAIRE

| | |
|---|------|
| AVANT PROPOS..... | V |
| REMERCIEMENTS..... | VI |
| LISTE DES FIGURES | XII |
| LISTES DES TABLEAUX | XIII |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | XV |
| INTRODUCTION GÉNÉRAL..... | 2 |
| 1 ^{ÈRE} PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 4 |
| CHAPITRE 1. PLANTES MÉDICINALES ET COMPOSÉS PHÉNOLIQUES..... | 5 |
| 1. Introduction..... | 5 |
| 2. Aperçu historique sur les plantes médicinales et aromatiques | 6 |
| 3. De la plante au médicament..... | 7 |
| 4. Composés phénoliques et activité biologique | 10 |
| 4.1. Activité antioxydante | 11 |
| 4.2. Activité antimicrobienne | 13 |
| 4.3. Activité anticancéreuse | 14 |
| 4.4. Activité anti-inflammatoire | 16 |
| 4.5. Activité antidiabétique | 18 |
| CHAPITRE 2. <i>CALENDULA ARVENSIS</i> | 21 |
| 1. Données botaniques | 21 |
| a. Famille d'astéracée | 21 |
| b. Le genre <i>Calendula</i> | 21 |
| c. Historique | 22 |
| d. Quelques espèces de <i>Calendula</i> | 22 |
| e. Aspects pharmacologiques | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Monographie de <i>C.arvensis</i> | 23 |
| a. Caractéristiques de l'espèce de <i>C. arvensis</i> | 24 |
| b. Taxonomie | 26 |
| c. Répartition géographique | 26 |
| d. Aspects phytochimiques | 27 |
| e. Utilisations en médecine traditionnelle | 28 |
| 2^{ÈME} PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES | 29 |
| 1. Récolte et préparation de la drogue végétale | 30 |
| 2. Extraction | 31 |
| 2.1. Préparation des extraits bruts (extraction continue) | 31 |
| 2.2. Macération dans l'eau | 32 |
| 3. Analyse phytochimique | 33 |
| 3.1. Screening phytochimique | 33 |
| 3.2. Analyses quantitatives..... | 33 |
| a. Dosage des flavonoïdes (FL) | 34 |
| b. Dosage des polyphénoliques totaux (PPT) | 34 |
| 4. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-DAD-MS) | 35 |
| 4.1. Appareillage | 35 |
| 4.2. Conditions opératoires | 35 |
| 5. Le potentiel antioxydant | 36 |
| 5.1. Activité anti-radicalire par DPPH..... | 37 |
| a. Principe | 37 |
| b. Méthode | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2. Test du pouvoir réducteur du fer (FRAP) | 38 |
| a. Principe | 38 |
| b. Méthode | 38 |
| 5.3. Capacité antioxydante équivalente du trolox (TEAC) | 39 |
| a. Principe | 39 |
| b. Méthode | 39 |
| 5.4. Inhibition du blanchiment du β -carotène | 40 |
| a. Principe | 40 |
| b. Méthode | 40 |
| 6. Potentiel antimicrobien des plantes | 41 |
| 6.1. Microorganismes utilisés pour l'étude de l'activité antimicrobienne | 41 |
| a. Bactéries à Gram positif..... | 41 |
| b. Bactéries à Gram négatif..... | 42 |
| 6.2. Méthodes de l'évaluation de l'activité antibactérienne | 45 |
| 6.3. Technique de la détermination des CMI et CMB..... | 46 |
| a. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)..... | 46 |
| b. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) | |
| Définition de la CMB | 47 |
| 6.4. Méthode de l'évaluation de l'activité antifongique | 47 |
| 7. Cytotoxicité | 48 |
| 8. Activité anti-inflammatoire | 51 |
| a. Principe | 51 |
| b. Appareille | 52 |
| c. Méthode..... | 52 |
| i. Méthode chimique | 52 |

| | |
|---|-----------|
| ii. Méthode physique..... | 54 |
| 9. Activité antidiabétique | 54 |
| 9.1. Tests d'inhibition de l'activité d' α -amylase | 54 |
| 9.2. Tests d'inhibition de l'activité d' α -glucosidase | 56 |
| 9.3. Tests d'inhibition de l'activité de la β -galactosidase..... | 57 |
| 3^{ÈME} PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION | 59 |
| 1. Identification botanique | 60 |
| 2. Rendements des extraits végétaux | 60 |
| 3. Résultats du screening phytochimique..... | 61 |
| 4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes..... | 62 |
| 5. Caractérisation des composés phénoliques par chromatographie liquide a haute performance couplée a la spectrometrie de masse (CLHP-DAD-MS)..... | 63 |
| 6. Résultats de l'activité biologiques | 66 |
| 6.1. Evaluation du potentiel antioxydant des differents extraits | 68 |
| 6.1.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•) | 68 |
| 6.1.2 .Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) | 69 |
| 6.1.3. Test TEAC | 70 |
| 6.1.4. Inhibition du blanchiment du β-carotène | 71 |
| 6.2. Potentiel antimicrobien..... | 81 |
| 6.2.1. Résultats de l'évaluation de l'activité anti bactériennes..... | 81 |
| 6.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) | 83 |
| 6.2.3. Résultats de l'évaluation de l'activité antifongique | 85 |
| 6.3. Résultats de la cytotoxicité sur des cellules tumorale (cellules | |

| | |
|--|------------|
| myéloïde) | 94 |
| 7. Resultats des activités pharmacologiques | 98 |
| 7.1. Results de l'activité anti-inflammatoire (<i>in vivo</i>) | 98 |
| a. Œdème à la carragénine | 98 |
| b. Œdème induit par traumatisme expérimentale | 99 |
| 7.2. Resultats del'activité anti-diabétique (<i>in vitro</i>) | 111 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 114 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 118 |
| ANNEXES | 131 |
| RESUME | 177 |
| ABSTRACT | 178 |
| ملخص | 179 |

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes, qui forment des sources riches en produits naturels pour soigner diverses maladies **(Boubaker, 2012)**. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non, pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique et /ou mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, et transmises de génération en génération (oralement ou par écrit) **(Adjanohoun,1979)**. Actuellement, l'OMS estime qu'environ 80% des habitants du monde ont recours à la médecine traditionnelle à base de plante en tant que soins de santé primaire **(OMS, 2012)**. Selon des statistiques récentes, on estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle **(Morel S, 2011)**, obtenus par héli-synthèse, à partir d'un pharmacophore ou par modification des produits naturels, composés issus des biotechnologies, (Vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale). Seul un tiers des médicaments commercialisés possède donc une origine purement synthétique **(Verpoorte, 2002)**, 60% environ des médicaments anticancéreux. D'autre part, 75% des composés utilisés pour les maladies infectieuses sont des produits naturels ou leurs dérivés synthétiques **(Kilani-Jaziri S, 2011; Yangthong M, 2009)**.

Les produits naturels étaient et restent toujours une source inépuisable de structures chimiques complexes et diverses vu le rôle que peuvent jouer certains composés purs dans plusieurs domaines, à savoir l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, l'industrie cosmétique et la parfumerie. Malheureusement, certains domaines connaissent de vrais problèmes à cause de l'utilisation des produits industrialisés qui protègent contre l'oxydation. Il était alors recommandé de trouver des antioxydants naturels qui diminuent leur pouvoir oxydant. Ainsi, la recherche des composés bioactives à partir des plantes devient une priorité obligatoire. Pour cette raison, plusieurs stratégies s'imposent : une approche ethnopharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles, une approche chimio-taxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour renfermer des

métabolites secondaires particuliers (composés phénoliques), ou encore un criblage systématique des espèces et/ou toute combinaison des techniques précédentes. Les plantes médicinales en particulier représentent une immense source de composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, flavonols, tannins condensés). les extraits bruts, naturels de ces composés et l'isolament d'espèces chimique à partir des plantes utilisées en médecine traditionnelle peuvent être des ressources prolifiques de nouveaux médicaments **(Karmakar I, 2011)**.

Notre travail de thèse s'inscrit dans ce contexte général, et a pour objectif d'étudier la composition phytochimique et la quantification des composés polyphénoliques par CLHP-DAD-MS des extraits des fleurs de *C. arvensis* (Ca).

Le second objectif est d'évaluer les activités, antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, cytotoxique et antidiabétique des extraits de *C. arvensis*.

Ce manuscrit comporte trois parties. La première, est subdivisée en 2 chapitres présentant un rappel des principales données bibliographiques, une présentation botanique de la plante, sa classification phylogénique, ses métabolites secondaires, ses activités biologiques et pharmacologiques.

La seconde partie couvre l'ensemble des travaux expérimentaux, en matière de méthodologie et procédure. La troisième partie décrit en premier lieu les résultats obtenus lors de ce travail de thèse, y compris les résultats de la préparation des extraits des fleurs et l'analyse phytochimique ; et en deuxième lieu la quantification des composés phénoliques par CLHP-DAD-MS et les résultats des études de l'activité antioxydante, antimicrobienne, cytotoxique, anti-inflammatoire et antidiabétique.

1^{ÈRE} PARTIE :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. PLANTES MÉDICINALES ET COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

1. Introduction

La nature a été un champ de découverte et de manipulations pour l'être humain. L'histoire des peuples a montré que les plantes occupent une place importante dans les milieux de vie. Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments issues de la synthèse. Une telle définition devrait inclure, d'après Sofowora ([Sofowora, A. 2010](#)), les cas suivants :

- Plantes ou parties de plantes à usage médicinal dans des préparations galéniques (décoctions, infusions, etc.);
- Plantes utilisées pour l'extraction des substances pures soit pour usage médicinal direct ou pour l'hémi-synthèse de composés médicinaux (par exemple hémi-synthèse des hormones sexuelles à partir de la diosgénine obtenue de tubercules de *Dioscorea*) ;
- Aliments, épices et plantes de parfumerie à usage médicinal, comme le gingembre ;
- Plantes microscopiques (champignons, actinomycètes) employées pour l'isolement de produits pharmaceutiques, en particulier d'antibiotiques. On peut citer l'ergot du seigle (*Claviceps purpurea*) ou *Streptomyces griseus* ;
- Plantes à fibres (comme le coton, le lin, le jute) utilisées pour la préparation de pansements chirurgicaux.

La phytothérapie est profonde, douce et respectueuse du corps ; tout cela est vrai, mais pourquoi ?

L'action de la plante selon Scimeca (**Scimeca, D. 2006**), est :

- Pharmacologique et rationnelle, car c'est par la présence de molécules très complexes (les principes actifs) que la plante agit ;
- Systémique et holistique, car une plante n'agit pas sur un seul organe ou une seule cellule mais sur un organisme entier ;
- Globale par cette notion de totum qui est le terme propre à la phytothérapie pour indiquer que dans une plante, tout agit.

La plante entière a toujours une action plus douce, plus large et plus profonde que la substance dite active isolée (**Tétou ., 2005**).

2. Aperçu historique sur les plantes médicinales et aromatiques

L'utilisation des arômes était également connue des civilisations de l'antiquité pour des usages religieux, cosmétiques mais aussi thérapeutiques (**Lardry J-M., 2007**). Ce sont les égyptiens, 3150-1085 avant Jésus-Christ (J-C), de l'époque pharaonique, qui furent les premiers à avoir recours aux plantes aromatiques pour embaumer les morts, avec notamment un mélange d'huiles essentielles comme l'huile de cèdre, de basilic (**Franhomme P.,1990, Abrassart JL, 1997**), et en utilisant des plantes aux propriétés antiseptiques connues comme le nard de l'Himalaya, la cannelle, le ciste, des produits de sécrétion aromatique comme l'encens ou la myrrhe (**Couic-Marinier F.,2013**). En Grèce antique, Hyppocrate indiquait les bains aromatiques dans le traitement des maladies de la femme.

Dans les grandes épidémies, on faisait brûler de la lavande, sarriette, romarin et de l'hysope. En Inde, à l'âge d'or de la médecine ayurvédique coïncidant avec l'apogée du bouddhisme (de 327 av. J-C. à 750 apr. J-C.), on conseillait couramment les plantes médicinales et aromatiques pour différentes indications : massages, bains, hygiène, (**Lardry J-M, 2007, Roulier G., 1990**). Au 1^{er} siècle apr. J-C., apparut le traité intitulé « De materia medica » écrit par Dioscoride, médecin et grand voyageur, dressant l'inventaire de 519 espèces de plantes et qui servira de référence dans la société Romaine et Arabe. Les arabes ont ainsi poursuivi les recherches sur les plantes médicinales en devenant les premiers à mettre au point la distillation des plantes, permettant d'en extraire les huiles essentielles, il existe de cela plus de mille ans (**Nogaret-Ehrhart A-S. 2008**). Cependant, avec les progrès de la science, l'avènement de la pharmacologie, de chimie de synthèse

(l'aspirine, la pénicilline) et l'émergence de la médecine basée sur la preuve, l'usage des médicaments chimiques a pris son essor, et ce depuis la seconde guerre mondiale, tandis que la phytothérapie ainsi que l'aromathérapie ont perdu de leur intérêt. Récemment, depuis le début des années 2000, il existe un retour en force vers cette discipline alternative. En effet, la prise de conscience par les patients et le personnel médical d'une image de plus en plus défavorable des médicaments de synthèse suite à l'apparition des effets indésirables, d'une efficacité parfois insuffisante ou nulle, l'émergence de résistances bactériennes a renvoyé à nouveau vers l'usage de produits naturels à base de plantes médicinales qui semblent avoir de grands avantages. Ainsi, la phytothérapie médicale, aujourd'hui, creuse son chemin, se développe et se codifie. Des études scientifiques se multiplient prouvant de plus en plus l'efficacité thérapeutique des plantes, dont l'utilisation est plus réglementée selon des critères scientifiques et une démarche clinique rigoureuse pratiquée par des professionnels de la santé spécifiquement formés.

3. De la plante au médicament

De la plante entière ou partie de plante utilisée au départ, des extraits totaux ont été ensuite utilisés (obtenus par décoction, macération, infusion ou percolation avec différents solvants) liquides ou secs pour faciliter la prise et standardiser les traitements. Les recherches pharmacologiques et chimiques menées pour identifier les effets de ces extraits par isolement des molécules actives ont permis la préparation, souvent par les apothicaires de l'époque, des mélanges de constituants actifs, puis à la purification et à la détermination de structures des composés les plus actifs qui ont été commercialisés sous forme purifiée (**Figure 1**). Ces molécules naturelles ont ensuite servi de modèles pour la synthèse ou l'hémi-synthèse de nouveaux médicaments plus spécifiques, plus actifs, présentant moins d'effets secondaires ou plus facilement brevetables. Parmi les médicaments les plus utiles en médecine et qui ont été isolés récemment de plantes, le paclitaxel (Taxol), médicament antitumoral isolé de l'écorce de l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*), ainsi que l'artémisinine, antipaludique isolé d'une plante chinoise (*Artemisia annua*).

De la molécule au médicament, les étapes sont nombreuses, les risques d'échec augmentent au fur et à mesure que l'on s'approche des derniers tests cliniques :

à partir du principe actif qui constitue la découverte et qui pourra être breveté (durée de validité du brevet : 20 ans), les premiers tests d'affinité, de sélectivité et de toxicité, de la mise au point d'une synthèse industrielle efficace et reproductible aux tests précliniques puis cliniques, durent 10 à 15 ans. L'investissement nécessaire varie de 500 millions à 1 milliard d'euros, avec une probabilité d'échec proche de 95 à 99%.

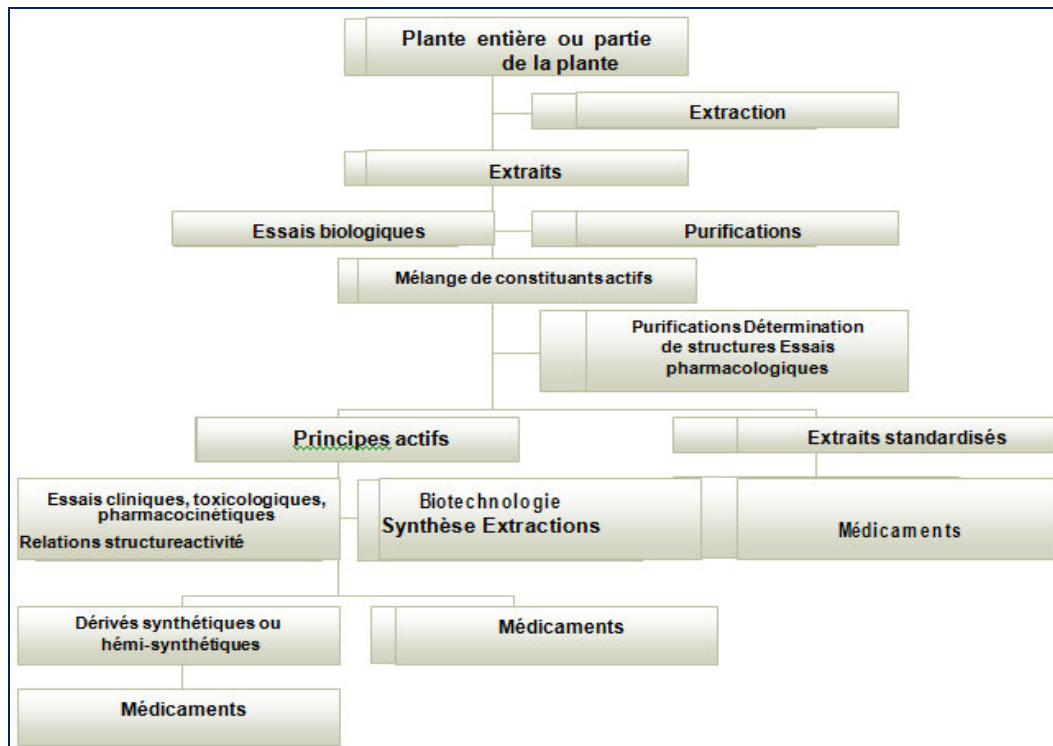


Figure 1 .De la plante au médicament.

Ces difficultés techniques peuvent être surmontées par la mise en place de méthodes adaptées et de nouvelles stratégies de recherche. Parmi ces stratégies, se trouvent en particulier les « criblages intelligents » par exemple en utilisant des cibles résistantes aux antibiotiques connus pour éviter un « bruit de fond », l'intervention de la robotique par couplage des techniques de séparation par CLHP, d'analyse par spectrométrie de masse ou RMN et de criblage haut-débit, la métabolomique, ou le développement d'outils biologiques comme la métagénomique, qui étudie les gènes et leur fonction dans des échantillons provenant directement de l'environnement, en particulier dans le cas de l'étude des micro-organismes du sol. Cette approche couplée à des techniques de criblage automatisé, permettrait de tester l'activité biologique de nombreux micro-organismes encore non étudiés.

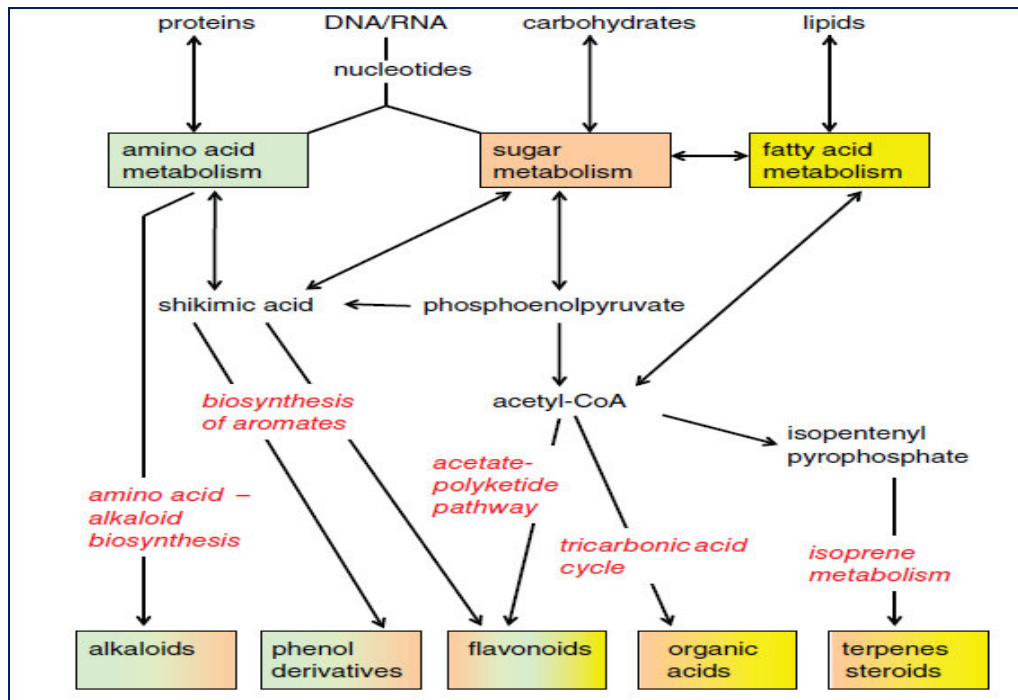


Figure 2. Relations entre les principales classes de métabolites secondaires, sources de principes actifs

Ce type d'outils et de stratégies permettent ainsi à la chimie des substances naturelles de s'inscrire clairement dans le cadre des sciences de pointe, ouvertes vers l'avenir. Les substances naturelles viennent du métabolisme secondaire.

Les produits naturels constituent une banque de molécules caractérisées par des structures riches, complexes et fortement variées que les chimistes auraient bien du mal à les synthétiser dans les laboratoires. Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des acides nucléiques et des hydrates de carbone qui sont généralement inoffensifs, sauf quelques rares protéines toxiques ou des hydrates de carbone immuno-modulateurs, et qui sont par conséquent peu intéressants pour les études de l'activité médicinale des plantes. De plus, les plantes contiennent une grande variété de composés secondaires dont la fonction est loin de faire l'unanimité. Leurs rôles sont encore mal connus, mais il est clair qu'ils interviennent de manière interactive dans les relations entre la plante et son environnement : molécules servant à la défense contre des prédateurs ou des agents pathogènes, à la prédation, à l'adaptation de la plante à son environnement (ex : les

molécules piégeant les métaux lourds pour que la plante puisse pousser sur un terrain minier), à la communication, etc. Ils sont les éléments essentiels de la évolution des êtres vivants ce qui explique leur très grande diversité et leur intérêt particulier pour la recherche de nouveaux médicaments. Ils peuvent être classés en plusieurs grandes familles (Figure 2), dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues sont les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes), les composés azotés, avec en particulier les alcaloïdes, et les composés terpéniques.

4. Composés phénoliques et activité biologique

Les composés phénoliques constituent un des groupes les plus importants chez les végétaux, compte tenu des bénéfices considérables qu'elles permettent d'escompter, mais aussi des dangers que ces substances comportent pour la santé des hommes. Rappelant que, les très nombreuses variations chimiques simples (hydroxylations, méthylations, glycosylations, acétylations, etc.) autour des structures de base (exemples de l'acide caféique, du kaempférol ou de la quercétine) conduisent à une énorme diversité des composés phénoliques et en particulier des flavonoïdes biologiques ;

Les groupes principaux sont les flavanols, les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavones et les anthocyanidines, de ces molécules et des plantes médicinales qui les accumulent peut varier fortement avec de petits changements structuraux qui entraînent souvent des modifications des interactions moléculaires avec l'eau, les protéines ou les lipides. Dans la plupart des cas, qu'il s'agisse de préparations brutes ou de fractions purifiées, l'action pharmacologique des composés phénoliques est associée à deux propriétés d'une part, leur capacité à se lier aux protéines (propriété particulièrement marquée pour le groupe des tanins), ce qui peut conduire à l'inhibition d'activités enzymatiques (lipoxygénase, peroxydase, xanthine oxydase, glucosidase, galactosidase,) et d'autre part, leur caractère antioxydant qui permet de neutraliser les formes activées de l'oxygène ou les radicaux libres à caractère toxique issus de la peroxydation lipidique (Macheix et al., 2005).

Les formes activées de l'oxygène sont pour la plupart des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène, capables d'attaquer l'ADN, les enzymes, les protéines, les membranes cellulaires, etc. Ces attaques peuvent être responsables de

problèmes lors de la réplication de l'ADN entraînant mutations et cancers, de perturbations au sein des cellules qui peuvent conduire à leur mort, de la destruction des membranes cellulaires ; ceci peut mener au durcissement et à l'épaississement des artères mais aussi à des crises cardiaques, de la détérioration du collagène et donc à la rigidité des tissus (Leitao., 2011).

Il ne peut être question ici de rentrer dans le détail des multiples interventions des composés phénoliques dans la santé humaine. Il est indiqué dans le **tableau 1**. Quelques points particulièrement importants ou qui sont actuellement en évolution rapide et qui présentent un grand intérêt pour la valorisation économique des composés phénoliques.

Tableau 1. Quelques exemples de sources végétales riches en composés phénoliques (Macheix et al., 2005)

| Plantes | Principales composées | Activités biologiques principales |
|---|---|---|
| Ginkgo (feuilles) Gingko biloba L. | Flavonols: mono, di et triglycosides du kaempférol, de la quercétine et de l'isorhamnétine. Aglycones de flavonols et flavones | Effet antioxydant Action neuroprotectrice Action positive sur la circulation cérébrale |
| Soja (jeunes pousses) Glycine max L. | Phytoestrogènes du groupe des isoflavonoïdes (génistéine, daidzéine et glycitéine et leurs dérivés glycosylés et acylés) | Action anticancéreuse Troubles de la ménopause Diminution du cholestérol sanguin Protection contre les accidents cardiovasculaires |
| Lin (graines) Linum sp. | Phytoestrogènes du groupe des lignanes | Action anticancéreuse Prévention des accidents coronariens |
| Houblon (cônes floraux) Humulus lupulus L. | Phytoestrogène : 8-prénylnaringénine Proanthocyanidines (dérivés de la catéchine, de l'épicatéchine, de l'épigallocatechine) | Action oestrogénique Effet antioxydant |
| Pin maritime (écorce) Pinus maritima L. | Proanthocyanidines à base de catéchine et d'épicatéchine Acides benzoïques et hydroxycinnamiques libres et glycosylés | Effet antioxydant Anti-inflammatoire Inhibition de l'agrégation des plaquettes sanguines |
| Raisin (pépins et vin) Vitis vinifera L. | Catéchine, épicatéchine Proanthocyanidines oligomères Tannins condensés | Effet antioxydant Protection contre les affections cardiovasculaires |
| Raisin, vin rouge peltatum L | Resvératrol Podophyllotoxine (lignane) | Diminution de l'agrégation des plaquettes sanguines Action anticancéreuse Action anticancéreuse et antivirale |

4.1. Activité antioxydante

Le terme « antioxydant » a été formulé comme « une substance qui en faibles concentrations, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels. Vansant (Vansant.G,

2004) définit les antioxydants comme substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS.

Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques, endogènes ou exogènes.

Tableau 2. Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Mohammedi Zohra., 2012)

| Antioxydants | Sources alimentaires |
|--------------------|---|
| Vitamine C | Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron |
| Vitamine E | huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, oeufs, noix |
| β -carotène | Légumes et fruits |
| Sélénium | Poissons, oeufs, viandes, céréales, Volailles |
| Zinc | Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers |
| Flavonoïdes | Fruits, légumes, thé vert |
| Acides phénoliques | Céréales complètes, baie, cerises |
| Tannins | Lentilles, thé, raisins |

La neutralisation des radicaux libres suit souvent le même principe : une molécule "vulnérable", par exemple un thiol, réduit le radical libre en une molécule neutre ou un ion stable (eau, anion hydroxyde). La molécule antioxydante devient alors un radical souvent plus stable, moins dangereux, qui peut être réduit par les enzymes ou protéines adaptées. Par exemple, les tocophérols (vitamine E) neutralisent des radicaux libres avant de se faire régénérer par des molécules d'ascorbate (vitamine C). Ces dernières sont ensuite réactivées grâce aux enzymes ascorbate réductases. Les polyphénols, alcaloïdes, flavonoides, tanin, phytates, Sélénium présents dans l'alimentation (**tableau 2**),

Les glutarédoxines, thiorédoxines, polyamines, et surtout le tripeptide glutathion (endogènes) font tous partie de la famille des "éboueurs" antioxydants.

Le glutathion (GSH) en particulier a un rôle très important dans la mesure où il peut réduire tous les radicaux oxygénés, mais également le peroxyde d'hydrogène. Le cytosol de la plupart des cellules en contient une concentration élevée (**Halliwell., 1999**).

4.2. Activité antimicrobienne

Les plantes synthétisent plus de 100000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne **(Tegos et al., 2002 ; Lewis et Ausubel., 2006)**. Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées pour les molécules isolées des plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 µg/ml et 1000 µg/ml. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI, variant de 0.01 µg/ml à 10µg/ml, suffisent à générer une activité inhibitrice **(Tegos et al., 2002)**.

Le spectre d'action des antimicrobiens produits par les plantes est plus restreint que celui généré par les antibiotiques conventionnels. En effet, ces derniers possèdent une haute activité contre les bactéries à Gram positif, mais demeurent peu actifs contre les bactéries à Gram négatif et les levures **(Lewis., 2006)**. L'une des rares exceptions concerne l'acide 3- farnésyl-2- hydroxy benzoïque **(Figure 3)**, isolé de la plante *Piper multiplinervium*.

Ce composé démontre une activité antibactérienne avec des CMI comprises entre 6.25 µg/ml et 37.5 µg/ml contre *Helicobacter pylori*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, qui demeurent, à l'heure actuelle, les bactéries à Gram négatif les plus difficiles à traiter cliniquement **(Rüegg et al., 2006)**.

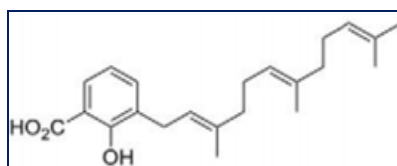


Figure 3 .L'acide 3-farnésyl-2-hydroxy benzoïque **(Gibbons., 2008)**

De nombreux autres antibactériens, démontrant une activité contre *S. aureus* et des variants résistants aux antibiotiques, ont été répertoriés dans la littérature **(Gibbons., 2008)**. La xanthone, molécule géranylée, isolée de *Garcinia cambodgiae*, présente une haute activité anti-staphylococcique avec des CMI comprises entre 0.3 µg/ml et 1.25 µg/ml **(Linuma et al., 1998)**.

L'hyperforine, produite à partir de l'*hypericum perforatum*, démontre une activité encore plus élevée avec des CMI comprises entre 0.1 µg/ml et 1 µg/ml

contre des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline et à la pénicilline (Schempp et al., 1999). Les plantes ont développé plusieurs stratégies pour contrôler les infections bactériennes. La synthèse d'un grand nombre de molécules faiblement actives, plutôt que de puissants antibiotiques, en fait partie. Elle semble d'ailleurs utilisée pour diminuer la pression sélective, qui favorise le développement des résistances. Toutefois, l'activité de ces antibactériens peut être potentialisée lorsqu'ils agissent en synergie avec d'autres molécules.

La preuve on a été fournie par les interactions établies entre deux composés produits par les plantes *Berberis* sp. La berbérine et la 5'-méthoxyhydnocarpine (5'-MHC) (Guinoiseau, 2010). Les structures de ceux-ci sont représentées dans la figure 4.

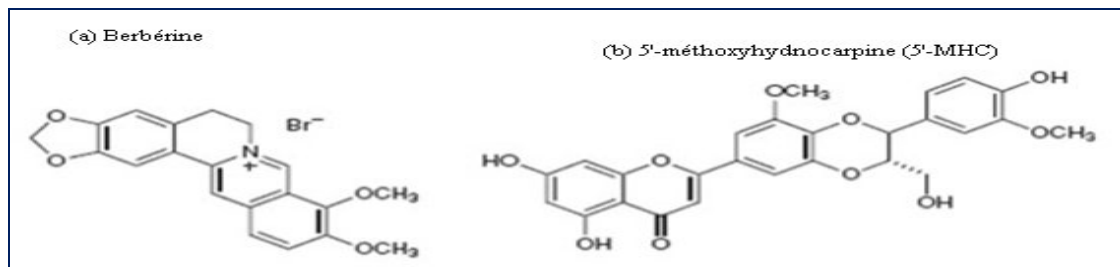


Figure 4 .Structures chimiques de la berbérine (a) et de l'inhibiteur des pompes MFS, la 5'-méthoxyhydnocarpine (b), isolés de *Berberis fremontii* (Stermitz et al, 2000)

La berbérine est un alcaloïde ayant pour cible cellulaire l'ADN (Amin et al, 1969). Ce cation hydrophobe (Figure 4a) est aussi un substrat des pompes d'efflux exprimées à la surface membranaire. Le rejet de la berbérine, hors de la cellule, limite son accumulation intracellulaire et, en l'empêchant d'accéder à sa cible, diminue son activité antibactérienne. Pour compenser cette faible activité, les plantes *Berberis* sp. Synthétisent une flavonolignane, la 5'-MHC (Figure 4b), qui, en bloquant les pompes bactériennes d'efflux, potentialise les effets de la berbérine. La combinaison « 5'-MHC/berbérine » agit donc comme un puissant antibactérien (Guinoiseau, 2010).

4.3. Activité anticancéreuse

Les plantes ont une longue histoire d'utilisation dans le traitement du cancer (Hartwell, 1992). Dans son examen, Hartwell répertorie plus de 3000 espèces de plantes qui sont utilisées dans le traitement du cancer (Tableau 3).

La recherche des agents anticancéreux d'origine végétale a véritablement

commencé dans les années 1950 avec la découverte et le développement de la vinca-alcaloïde, la vinblastine et la vincristine, et l'isolement des podophyllotoxines cytotoxiques. En conséquence, le National Cancer Institute des États-Unis (NCI) a lancé un programme vaste de collecte des plantes en 1960, porté principalement dans les régions tempérées. Cela a conduit à la découverte de nombreux nouveaux chimiotypes montrant une gamme d'activités cytotoxiques (**Cassady et Douros., 1980**), y compris les taxanes et les camptothécines, mais leur développement sur les agents cliniquement actifs s'étend sur une période de 30 ans, depuis le début des années 1960 à 1990.

Ce programme de collecte est arrêté en 1982, mais le développement de nouvelles technologies de contrôle a conduit à la reconnaissance des collections de plantes et d'autres organismes en 1986, avec une focalisation sur les régions tropicales et sub-tropicales du monde.

1. *L'herbimycine A et la génistéine* : Ce sont les premières molécules qui ont montré in vitro une inhibition sélective de tyrosine kinase dans des lignées cellulaires BCR-ABL+ (**Honma et al, 1990**).

2. *La vincristine (Oncovin®)* : C'est un alcaloïde extrait de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) (**figure 5**). Ce produit se fixe sur les dimères de tubuline libre et empêche leur polymérisation en microtubules. Il est utilisé en association dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques (**Bohannon et al., 1963**).

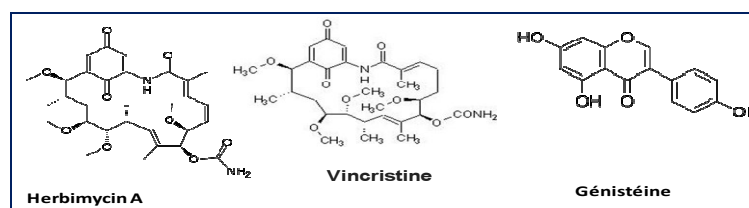


Figure 5 .Produis naturels dans le traitement des leucémies (**Bohannon et al., 1963**).

3. *Le flavopiridol* : Le traitement combinant l'imatinib au flavopiridol augmente le dommage mitochondrial, active les caspases et l'apoptose dans les lignées cellulaires de LMC mais pas dans les lignées leucémiques BCR-ABL négatives. Une étude clinique de phase I sur des leucémies BCR-ABL+, a montré que la combinaison imatinib/flavopiridol était tolérable et responsable de quatre réponses objectives, y compris deux réponses hématologiques complètes (**Melo et al., 2009**).

Tableau 3: Médicament anticancéreux dérivés des plantes médicinales

| Médicament | Principe Actif | Source | Mécanisme d'action | Indications |
|---------------------------|------------------------------|--|---|---|
| Taxotere | Docetaxel | Taxus baccata | Inhibiteur de la tubuline | Le cancer du sein, nonpetit cancer du poumon, le cancer de la prostate métastatique, l'adénocarcinome gastrique avancé, tête épidermoïde localement avancé et le cancer du col (Vaishampayan, U., 1999) |
| Taxol | Paclitaxel | Taxus brevifolia | Inhibiteur de la β sous-unité de tubuline | Cancer du poumon, de l'ovaire, sein, cancer de la tête et du cou, sarcome de Kaposi, resténose (Vaishampayan, U., 1999) |
| Velban | Vinblastine | Catharanthusroseus | Inhibiteur de la Tubuline | Lymphome Hodgkinien et non hodgkinien, cancer des testicules, cancer du sein, mycosis fongoïde, sarcome de Kaposi, l'histiocytose, Choriocarcinome (Leveque, D. and Jehl, F.,2004) |
| Vincasar PFS | Vincristine | Catharanthusroseus | Inhibiteur de la Tubuline | Leucémie, Hodgkin et le lymphome non hodgkinien de, la tumeur de Wilm, le neuroblastome, le rhabdomyosarcome (Zhou, M. L., Shao, J. R., 2009) |
| Hycamtin | Topotecan | Camptotheca acuminata Nothapodytesfoetida | Un inhibiteur de La topoisomérase | Cancer ovarien, bronchique à petites cellules, cancer du col utérin (Lorence, A. and Nessler, C. L., 2007) |
| Etopophos, VePesid | Irinotecan (Camptothecin-11) | Camptotheca acuminata Nothapodytesfoetida | Un inhibiteur de La topoisomérase | Carcinome métastatique du côlon ou du rectum (Canel, C., Moraes, R. M., Dayan, F. E., 2007) |

4.4. Activité anti-inflammatoire

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement utilisés pour le traitement de la douleur, de l'inflammation, la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose. Leur commune toxicité et le risque accru d'ulcération gastro-intestinale, de perforation et hémorragie limitent leur utilisation. L'enzyme cyclo-oxygénase (COX) catalyse la biotransformation de l'acide arachidonique en prostaglandine G₂. L'acide arachidonique sert de précurseur pour la synthèse des prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes qui sont collectivement appelés prostanoides. L'activité de l'enzyme cyclo-oxygénase est le site d'action des AINS. Cependant, l'inhibition de biosynthèse des prostanoides est associée à des effets secondaires tels que l'ulcération et l'altération des fonctions rénales. Les dégâts

gastro-intestinaux des AINS sont généralement attribués à deux facteurs, à savoir une irritation locale par le groupement acide carboxylique commun à la plupart des AINS (effet topique), et diminution de la protection des tissus par

les prostaglandines.

Actuellement le principal objectif de la recherche est de découvrir des agents, qui inhibent collectivement la COX-2 inductible avec peu ou pas d'effet sur la COX-1.

Les plantes sont une source importante de produits naturels biologiquement actifs et sont considérées comme une avenue prometteuse pour la découverte de nouveaux médicaments grâce à leur disponibilité et coût relativement faible **(Simões et al. 2004 ; Rimbach et al., 2009)**. Le développement des médicaments, à base de plantes standardisés dont l'efficacité et la sécurité d'utilisation éprouvée, est une alternative importante pour généraliser la médication et offrir de nouvelles options thérapeutiques **(Balunas et al. 2005 ; Sousa et al., 2010)**. Plusieurs plantes prouvent leur activité anti-inflammatoire, tels que: *Zingiber officinale*, *Urtica dioica*, *Nerium oleander*, *Harpagophytum procumbens* et *Oenothera biennis* utilisées en médecine traditionnelle **(Sousa et al. 2010 ; Marzouk et al. 2009) (Tableau 4)**. Par conséquent, des extraits ou des PA isolés à partir des produits naturels semblent être une stratégie prometteuse pour le développement des médicaments anti-inflammatoires et à la recherche d'une meilleure qualité thérapeutique pour le patient **(Potterat et al. 2008)**.

Des études in vitro et in vivo ont permis de montrer que les polyphénols de certaines plantes pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique.

Tableau 4. Exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-inflammatoire (Barnes, 1998)

| Nom scientifique | Famille | Partie utilisée | Nom commun | Utilisation |
|------------------------------------|---------------|-------------------|-----------------------|---|
| <i>Zingiber officinale</i> | Zingiberaceae | Rhizome | Gingembre | arthrose, |
| <i>Helleborus orientalis</i> | Ranunculaceae | Racines | Lenten-rose | Oedemes, douleurs rhumatismales |
| <i>Urtica dioica</i> | Urticaceae | Feuilles, Racines | Ortie | Rhinite allergique, eczéma, goutte, douleurs |
| <i>Laurocerasus officinalis R.</i> | Rosaceae | Feuilles | Laurier | Fièvre, |
| <i>Curcuma longa</i> | Zingiberaceae | Rhizome | Curcuma | Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales |
| <i>Nerium oleander</i> | Apocynaceae | Fleurs | Laurier rose | Douleurs, maux de tête |
| <i>Harpagophytum procumbens</i> | Pédaliacées | Tubercule | Griffe du diable | Arthrose, lombalgie, névralgie, maux de tête, |
| <i>Rhododendron ponticum L.</i> | Ericaceae | Feuilles | Rhododendron pontique | Oedèmes, états grippaux, mal de dents |
| <i>Juglans regia L.</i> | Juglandaceae | Feuilles, fruits | Noyer commun | Douleurs rhumatismales, fièvre, eczéma. Malaria |
| <i>Oenothera biennis</i> | Onagraceae | Graines | Onagre bisannuelle | Douleurs rhumatismales, |

4.5. Activité antidiabétique

Pour pallier aux effets secondaires des traitements antidiabétiques, les recherches scientifiques portent sur 1123 plantes utilisées traditionnellement contre le diabète (Racciah, 2004). La minorité étudiée concerne les plantes suivantes : *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus*, *Trigonella foenum-greacum*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, et autres (Al-Achi, 2005). Les guanidines furent extraits la première fois à partir de *Galega officinalis*, qui constituent une source naturelle pour la semi-synthèse des Biguanides les moins toxiques que les guanidines (Dey lucey et al., 2002). D'autres composés végétaux montrent une activité biologique (tableau 5)

Tableau 5. Composés végétaux à vertus antidiabétiques

| Composé | Nature chimique | Source | Mécanisme d'action possible |
|---------------------|------------------------|--|--|
| Polypeptide | Polypeptide | <i>Momordica charantia</i> | Insulinomimétique administré par voie sous cutanée chez des diabétiques de type1 (Marles and Farnsworth., 1995). |
| Charantine | Hétéroside stéroïdique | <i>Momordica charantia</i> (Dey lucey et al., 2002) <i>Momordica foetida</i> (Marles and Farnsworth., 1995) | *Mécanisme d'action exacte reste inconnu. Des études ont rapporté que: *Le jus de <i>M. charantia</i> peut améliorer la tolérance au glucose chez les diabétiques de type 2 (Welihinda et al., 1986). *L'extrait aqueux de <i>M. charantia</i> diminue la glycémie post prandial avec une réduction du taux de l'hémoglobine glycosylée (Srivastava et al., 1993). * Il augmente l'utilisation hépatique du glucose et inhibe la néoglucogenèse, il réprime l'insulinorésistance en augmentant le taux des transporteurs membranaires de glucose (Al-Achi., 2005) |
| Ginsenosides | Hétéroside stéroïdique | <i>Panax ginseng</i> | * La plante provoque une augmentation du nombre des transporteurs de glucose * Stimulation de la synthèse de l'insuline (Al-Achi., 2005). |
| Trigonelline | Alcaloïde | <i>Trigonella foenumgreacum</i> (Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al., 2002) | Les extraits bruts ont montré les effets suivants : * Diminution de la glycémie post prandial. * Diminution du taux de glucagon, somatostatine, insuline, cholestérol total et des triglycérides *Augmentation du taux d'HDLCholestérol (Ribes et al., 1984). * Resensibilisation des cellules à l'action de l'insuline (Al-Achi., 2005) |

Les complications du diabète sont fortement liées à certain nombre de facteurs. A coté de l'hyperglycémie chronique et la glycosylation non enzymatique des protéines, un facteur très important impliqué dans la genèse de ces complications est le stress oxydatif ([Guerci et al, 2001](#) ; [Punitha et al., 2005](#)). En effet, le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités d'espèces oxygénées activées dont font partie les radicaux libres (O_2 , H_2O_2 , le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet). Le patient diabétique présente une surproduction des ROS d'une part et d'autre part, une diminution des antioxydants, ce qui génère un état de stress oxydatif à l'origine des micro et des macros angiopathies ([Pincemail et al., 1999](#) ; [Huang et al., 2002](#)).

Généralement, tous ces agents antidiabétiques causent différents effets secondaires qui varient selon la classe et la génération du médicament.

Précisément, les sulfamides, insulinosécrétagogues, provoquent un état d'hypoglycémie. Cet effet est considéré comme principal à coté de l'hyponatrémie, l'hépatite, les atteintes hématologiques, l'éventuelle réaction dermatologique ainsi qu'un gain de poids dû à l'hyperinsulinémie **(Marles and Farnsworth, 1994 ; Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al., 2002)**. Suite à leurs effets secondaires néfastes, certains Biguanides, inhibiteurs de la néoglucogénèse et l'absorption intestinale du glucose, sont éliminés du marché. La metformine, le biguanide le plus commercialisé dans le monde, n'est plus disponible qu'aux USA car il provoque une acidose lactique, une fatigue, des nausées et une toxicité rénale **(Dey lucey et al., 2002)**. L'acarbose (C₂₅H₄₃ No₁₈), un médicament de la classe des inhibiteurs des alpha-glucosidases présente divers effets secondaires, comme les gaz, le ballonnement et la diarrhée **(Marles and Farnsworth, 1995 ; Dey lucey et al.,2002)**.

CHAPITRE 2. *CALENDULA ARVENSIS*

1. Données botaniques

a. Famille d'astéracée

Les astéracée (anciennement appelées Compositae) sont une famille cosmopolite comprenant plus de 1500 genres et plus de 25 000 espèces décrites dont 750 endémiques (suivant les sources), distribuées principalement dans les zones tempérées du globe. C'est l'une des familles les plus importantes des angiospermes, la seconde en importance derrière celle des orchidaceae.

Cette famille présente des caractères morphologiques divers: végétaux à port extrêmement varié constitués d'arbustes et parfois d'arbrisseaux. Généralement, ce sont des herbes annuelles ou bisannuelles, plus ou moins pérennes. Ils possèdent des lianes herbacées grimpantes ou rampantes. Les feuilles très polymorphes petites sont sans stipules, alternes ou opposées et en rosettes.

Elles sont simples, entières ou dentelées et parfois divisées en plusieurs segments plus ou moins grands. En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences et très caractéristique : le capitule. Les fleurs serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité élargie d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales appelée involucre. Le fruit est un akène généralement surmonté d'un pappus provenant du calice après la fécondation. Son rôle est de favoriser la dispersion des graines par le vent (anémochorie) **(Barkely et al., 2006)**.

b. Le genre *Calendula*

Calendula est un genre d'environ 20 espèces de plantes herbacées annuelles ou vivaces de la famille des Astéracées, originaires de la région méditerranéenne et de Macaronesie. Feuilles alternes, Capitules hétérogames, radies. Fleurs hermaphrodites généralement stériles. Bractées de l'involucre sur 1-2 rangs. Receptacle nu. Anthères aigues ou acuminées à la base mais non caudées. Fleurs hermaphrodites stériles à style entier ou un peu bilobé; celui des fertiles a 2 branches tronquées et poilues au sommet. Akènes de forme variable mais sans aigrette. Un seul genre local: *Calendula L* **(Quezel P, Santa S., 1963)**.

c. Historique

Les propriétés thérapeutiques du *Calendula* sont connues depuis longtemps. Au XII^e Siècle, Hildegarde de Bingen l'utilisait contre la teigne du cuir chevelu, Albert le grand recommande son usage comme cicatrisant, contre les troubles de l'intestin, les piqûres d'insectes et de serpents. Au XVI^e siècle en Italie, le médecin recommande son emploi pour faire un collyre soignant les maux des yeux.

d. Quelques espèces de *Calendula*

Quelques espèces de *Calendula* étant bien définie dans le tableau 6 suivant :

Tableau 6 : Les espèces connues de *Calendula*

| Espèces | Synonyme(s) |
|------------------------|---|
| <i>C. aegyptiaca</i> | <i>C. subinermis</i> <i>C. gracilis</i> <i>C. Cristal-galli</i> <i>C. malvaecarpa</i> <i>C. echinata</i> <i>C. platycarpa</i> <i>C. malvaecarpa</i> |
| <i>C. arvensis</i> | <i>C. parvijlora</i> <i>C. stellata</i> <i>C. sicula</i> |
| <i>C. monardi</i> | <i>C. undulata</i> <i>C. officinalis</i> |
| <i>C. tomentosa</i> | <i>C. incana</i> |
| <i>C. Suffruticosa</i> | <i>C. stellata</i> |

e. Aspect pharmacologique

Calendula est une plante très utilisée dans le domaine pharmacologique, vu les bienfaits que la plante procure à l'organisme en cas de maladie. En effet, les propriétés de la plante sont très diverses, et sont citées ci-dessous :

a. Anti-inflammatoire

En effet, c'est le faradiol qui en est en grande partie responsable. Ce dernier, en étant seul est le plus actif, il possède en équimolaire le même effet que l'indométacine ou l'ibuprofène (**Hamburger M., 2003**). Bien que le faradiol-3-myristique, le faradiol-3-palmitique et le psi-taraxasterol ne soient pas néanmoins dépourvus d'activité anti-inflammatoire, leur activité ont été testées sur les deux principales enzymes du système pro-inflammatoire la cyclo-oxygénase et la lipo oxygénase (**HeroldA., 2003**).

b. Anti-tumoral

Les extraits de *Calendula* sont cytotoxiques et antigénotoxiques. Une nouvelle technique d'extraction LACE (laser activated *calendula* extrait) montre que *in vitro* une inhibition de la croissance cellulaire par arrêt du cycle et par activation de l'apoptose (**Jimenez-Medina E., 2006**).

c. Immun-modulateur

Calendula à la capacité de stimuler le système immunitaire, il est clair qu'il existe à la fois suppression de l'inflammation et de l'infiltration des lymphocytes. En 2000, la capacité significative de stimuler la prolifération en présence de CMH complexe a été mise en évidence (**Amirghofran Z, 2000**).

d. VIH

L'extrait organique à un effet potentiel sur le VIH. De plus, cet extrait provoque une réduction de l'activité de la transcription inverse (TI) (**KalvatchevZ, 1997**).

e. Anti-œdémateux

Le faradiol du *calendula* à un effet anti-œdémateuses (**Zitterl-Eglseer K., 1997**)

f. Anti-oxydant

Les flavonoïdes et triterpénoïdes dans la partie butanolique possède une action significative comme épurateur de radicaux libres et antioxydant (**Cordova C.A.,2002**). Les extraits aqueux et hydroalcooliques du calendula sont capables d'éliminer complètement les radicaux libres du système de Fenton ainsi que d'autres systèmes oxydatifs avec la même efficacité que le BHA synthétique (antioxygène) (**Gordana S. Ćetkovi., 2004**).

2. Monographie de *C.arvensis*

On a axé notre travail sur l'étude phytochimique, biologique et pharmacologique de *C.arvensis* (Astéracée). Le choix de cette espèce a été guidé par son usage dans la pharmacopée traditionnelle et par les études chimiques répertoriées dans la littérature. On propose avant de présenter nos résultats de donner une revue de la littérature des travaux antérieurs effectués sur cette plante.

a. Caractéristiques de l'espèce de *C. arvensis*

Calendula, du latin « Kalenda », signifie « le premier jour du mois » dans le *Calendrier* romain, *C.arvensis* (souci des champs) est une plante annuelle compatible avec les astéracées (Heyn et Joel, 1983), car elle peut être en floraison au début de la plupart des mois de l'année. (Rignanese et al., 1763), Elle est souvent finement arachnoïde-floculeuse, dressée ou diffuse, habituellement très ramifiée. Généralement d'une hauteur de (15-25cm), quant aux feuilles, elles font une taille de (3-8 x 0,4-1,4 cm) avec pubescentes finement floculeuses, longues ou étroitement ovales à marges sorbetières ou obscurément denticulées. 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 "coeur" démarqué comme pour la marguerite. La couleur de la fleur peut être de diverses teintes allant du jaune pâle à l'orange foncé (Figure 6). Les fleurs s'ouvrent et se ferment avec le soleil. La floraison de sa part dure de nombreuses semaines et persiste jusqu'aux gelées. Le fruit est un akène en forme de bateau et à surface rugueuse. Les tiges sont couchées ascendantes à poils raides ou glanduleux.

La graine à l'intérieur est d'un jaune pâle, de forme irrégulière allant de la vrille (Figure 7).



Figure 6 . Aspect morphologique de *C.arvensis*



Figure 7 .Différentes parties de *C.arvensis* (Abbès Tanji, 1996)

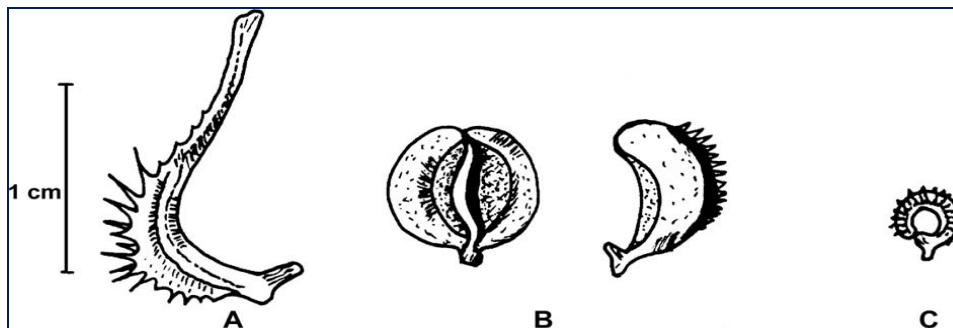


Figure 8 . Morphologie de *C. arvensis* akènes. A, Rostrate; B, Cymbiforme; C, Annula.

Les akènes sont seulement produits par les fleurs ligulées et présentent un polymorphisme complexe lié à la position des fleurs dans le capitule. Il existe trois types distincts d'akènes (**Figure 8**), Occasionnellement, des formes intermédiaires peuvent apparaître. Dans le verticille externe, les akènes incurvés à bec étroit et à nombreuses épines dorsales (akènes rostrés, ci-après dénommés akènes), alternent avec des akènes larges et cymbiformes (akènes cymbiformes, ci-après dénommés akènes). Les autres verticilles sous-périphériques des fleurs ligulées produisent des akènes vermiculés ou annulaires à dos tuberculé ou rugueux (akènes annulaires, ci-après dénommés A akènes). Tous les akènes manquent d'aigrettes (**Heyn et Joel, 1983**); (**Heyn., 1988**).

Suggère que les akènes périphériques (akènes B et C) peuvent être adaptés à la dispersion à longue distance. Les racines dorsales des Racines facilitent la dispersion par les animaux (exozoochory) et les ailes dans les akènes permettent la dispersion par le vent (anémochorie). Les a kènes manquent d'un véhicule de dispersion et sont adaptés aux akènes de dispersion à courte portée.

Les akènes utilisés pour comparer le caractère des fruits, la germination et la croissance des semis ont été recueillis dans les trois sites de la population naturelle au printemps précédent, combinés ensemble et stockés à la température du laboratoire.

Trois mille akènes de chaque type ont été utilisés en 2 ans (1500 akènes chaque année), les akènes ont été obtenus à partir de capitules récoltés en deux à trois visites par an aux trois sites utilisés dans l'étude. Des capitules matures (environ 500 capitules par an) ont été recueillis, un par plante, dans des plantes choisies au hasard. Des observations phréologiques de la germination, de la floraison, de la fructification et de la dispersion des akènes ont été effectuées sur la population naturelle.

b. Taxonomie (Linnaeus et al., 1763)

La classification de *C.arvensis* étant bien définie est résumée dans le **tableau 7** suivant :

Tableau 7: Taxonomie de *C.arvensis*

| | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Embranchement | Magnoliophyta |
| Sous Embranchement | Spermatophytes |
| Classe | Dicotylédones |
| Ordre | Asterales |
| Famille | Astéracée |
| Genre | Calendula |
| Espèce | <i>Calendula arvensis</i> |
| Nom en classique Arabe | الحنوة الحقلية، الأذريون الحقلية |
| Nom en Arabe Marocain | الجَمْرَة |
| Autre nom Français | Le gauchefer |

c. Répartition géographique

Cette plante est originaire de la région de la méditerranée, quoique l'espèce est répandue au niveau de plusieurs zones géographiques à travers le monde (**figure 9A**), on la rencontre au niveau de tous les pays de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye et Egypte), le Moyen-Orient (Palestine, Jordanie, Liban, Syrie, Iran, Irak, Afghanistan) et l'Europe (Portugal, Espagne, France, Italie, Allemagne, Suisse, Grèce, Chypre, Roumanie, Hongrie, et l'Ukraine), l'espèce est même présente dans quelques pays du Caucase.

En effet, l'espèce est tellement présente, que, par exemple, en Italie, l'espèce

pousse dans toute la péninsule (à l'exception du Val d'Aoste et le Trentin). Elle est abondante dans tout le Maroc sauf le Sahara (**Abbès Tanji, 1996**) (**figure 9 B**). Elle pousse sur les prairies ensoleillées, mais aussi sur les bords de routes et les zones cultivées, d'une altitude de 0 à 1400 mètres.

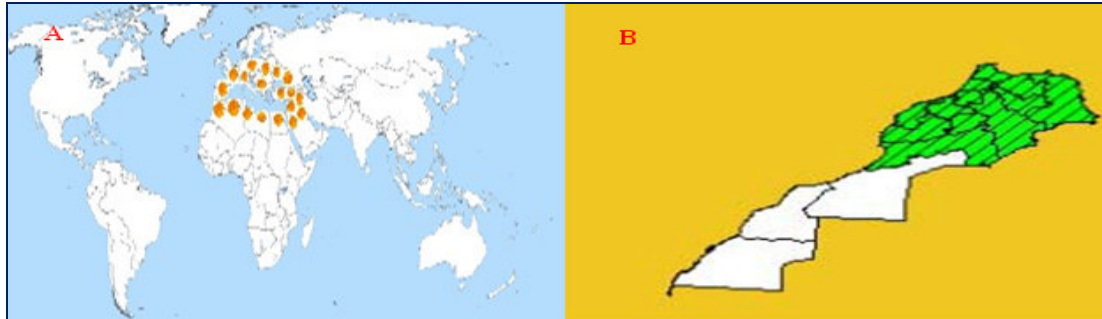


Figure 9 A. Répartition géographique de *C. arvensis* dans le monde et 9B. dans le Maroc.

d. Aspects phytochimiques

De nombreuses enquêtes ont démontré que des extraits des parties aériennes de *C. arvensis* sont riches en glycosides sesquiterpéniques (d'après leurs squelettes alloaromadendarien, eudesmane et cubebane) (**De Tommasi et al., 1990, Ahmed et al., 1993**) et les saponines triterpénoïdes (par exemple l'arvensoside A et B) (**Chemli et al., 1987, Pizza et De Tommasi, 1987, Kirmizibekmez et al 2006**). Dans l'autre littérature montré que l'huile de *C. arvensis* est riche en sesquiterpènes et les composants principaux des composés sesquiterpéniques étaient le δ cadinène (15,1%) et l' α -cadinol (12,4%). Par rapport des principaux constituants de l'huile essentielle de *C. Micrantha* étaient (E) - β -caryophyllène, α -gurjunène, α -pinène, aromadendrène, guaiol et formiate de benzyle. Cadinane ou muquelones muurolane étaient les principaux composants dans les floraux volatiles de *C. officinalis*. Généralement, la comparaison de nos données avec la littérature ont montré que les principaux constituants de la composition chimique des huiles de *C. arvensis* étudiées étaient sesquiterpènes (30,5% et 23,4%) et monoterpène composés (26,3% et 24,3%) et nettement différent des espèces de *Calendula* connues (**Marczal et al., 1987; Chalchat et al., 1991; Radulescu et al., 2000; Crabas et al., 2003; Gazim et al., 2007, 2008; Okoh et al., 2007, 2008**).

La comparaison des contenus d'huile essentielle de *C. arvensis* avec le littérature, β -ocimène, γ -terpinène, néo-allo-ocimène, 7-épi-silphiperfol-5-ène, β -elemene, E-caryophyllène, α - guaine, β -sélinène, viridiflorène, α -sélinène, α -cuprénène,

δ -amorphène, 2-norpinène, viridiflorol, (Z) -sesquilavandulol, α -acérénol, épi- α -muurolol, α -muurolol, tétraméthyl-2-hexadécén-1-ol et hexahydrofarnésyl acétone. La différence de la composition des huiles pourraient être attribuées à la source géographique, le temps de collecte de la plante et le climat spécifique.

e. ctraditionnelle

C.arvensis a des propriétés très similaires à celles de *C. officinalis* et trouve des emplois similaires en médecine traditionnelle à base de plantes (en phytothérapie), notamment en application cutanée comme adoucissant (après une piqûre, une brûlure). Les fleurs possèdent des propriétés dépuratives anti spasmodique et stimulante ; sa tisane agit pour atténuer les spasmes gastriques et intestinaux ; quant aux feuilles leur sucs calme les vomissements et les ulcérations internes et elles sont utilisées aussi pour effacer les verrues, les durillons et les corrs (Khalid A, Khalida et al., 2010). Elle est actuellement utilisée en phytothérapie, on trouve différentes préparations sur le marché, notamment les pommades pour les bébés, huile de massage, crème protectrice pour le visage et des savons. A l'issue de cette recherche bibliographique, il est à révéler aisément que les flavonoïdes et les sesquiterpènes lactones constituent principalement la majorité des métabolites secondaires que renferme cette plante. Ces composés possèdent des activités biologiques intéressantes qui sont tout à fait typiques des plantes de la famille des astéracée en générale.

Dans ce contexte, on propose :

- Extraction des constituants des fleurs de *C. arvensis* selon la technique d'extraction continue par soxhlet et par macération dans l'eau.
- Etude phytochimique :
 - Etudier la composition phytochimique et la quantification des flavonoides et polyphénoliques contenus dans les fleurs.
 - Identifier les composés phénoliques présents dans les extraits méthanolique et aqueux par CLHP-DAD-MS.
- Evaluation des activités biologiques (*in vitro*) : activités, antioxydante, antimicrobienne et cytotoxique.
- Evaluation des activités pharmacologiques : activités, anti-inflammatoire (*in vivo*), antidiabétique (*in vitro*).

2^{ÈME} PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Récolte et préparation de la drogue végétale

Dans l'objectif d'augmenter les chances d'isoler de nouvelles molécules et/ou de nouvelles voies d'application thérapeutiques (ou cosmétiques), il est plus judicieux de choisir une espèce qui a été peu ou pas étudiée jusque-là. Cependant, le scientifique Averti pourra également faire des découvertes dignes d'intérêt en investiguant une plante largement étudiée sous un nouveau angle: autre organe ou extrait, technique analytique nouvelle, cible biologique différente, etc. Dans les deux cas, une recherche de la littérature approfondie devra précéder le début des processus d'extraction. Pour le présent travail, en tenant compte de tous ces critères, on a sélectionné des fleurs de *C.arvensis* plante médicinale d'origine du Maroc de la famille d'*Asteraceae* ayant un fort potentiel d'activité du fait de leurs usages traditionnels largement répandus.

On a récolté la plante entière de *C.arvensis* de Sidi El Abid de la région de Rabat, **(Figure 10)** sous l'assistance du Professeur Taleb Mohammed Al Sghir Enseignant-Chercheur à l'institut Scientifique de Rabat pendant la journée du 28/3/2014 à 17 heures 30 minutes et par la suite, on a procédé comme ci-dessous :

Séchage : Réalisé à l'ombre dans un endroit sec et aéré, pendant 7 jours jusqu'à dessiccation complète des parties utilisées de la plante séchée.

Broyage : Effectué à l'aide d'un broyeur classique jusqu'à l'obtention d'une poudre grossière.

Tamisage : Réalisé à l'aide d'un tamis ordinaire jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène.



Figure 10 .Récolte de *C.arvensis*

2. Extraction

2.1. Préparation des extraits bruts par percolation Soxhlet

Il s'agit d'une extraction continue solide-liquide. L'extracteur soxhlet permet d'extraire des constituants contenus dans des solides de toutes tailles par des solvants organiques. On met 200 g de poudre dans une cartouche en cellulose, on place cette dernière dans un soxhlet lié à son tour à un ballon contenant une quantité suffisante de solvant organique (hexane, méthanol) et surmonté d'un réfrigérant. A l'aide d'un chauffe ballon, et on porte le solvant à ébullition permettant par la suite l'extraction continue des constituants contenus dans la poudre.

Tableau 8. Procédure expérimentale d'une extraction par soxhlet.

| Procédure expérimentale | | |
|------------------------------------|---|------------------|
| Masse initiale (g) | 200 | 200 |
| Type de solvant | Héxane | Méthanol |
| Quantité des solvants (L) | 0,7 Litre | 0,7 Litre |
| Chauffage | Chauffe ballon | plaque chauffant |
| Durée totale de l'extraction (min) | 245 | 245 |
| Séparation | Evaporation des solvants par un rota vapeur | |

Dès que le niveau de solvant est à la hauteur du coude 2 (**figure 11A**).

Le réservoir se vide automatiquement, l'extrait est récupéré dans le ballon et les extraits obtenus sont concentrés à l'aide de l'évaporateur rotatif sous pression réduite (**figure 11 B**). Les conditions expérimentales utilisées lors de l'extraction par les solvants organiques sont regroupées dans le **tableau 8**.



Figure 11 . A) Appariel Soxhlet.

B) Rotavapor.

- Calcul du rendement

Le rendement total est exprimé par la relation suivante :

$$R (\%) = \frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse initiale}} \times 100$$

Pour l'extrait N-héxanique: $R (\%) = 20.44 / 200 * 100 = 10.22\%$

Pour l'extrait Méthanolique : $R (\%) = 40.87 / 200 * 100 = 20.5\%$

2.2. Extraction par macération dans l'eau

L'extraction par macération dans l'eau a été réalisée selon la méthode décrite ci-dessous :

200 grammes des fleurs de *C.arvensis* en poudre sont macérés dans 2 litres d'eau distillée pendant 5 heures, le mélange est agité vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique. Puis ils subissent une double filtration sur coton hydrophile et sur papier filtre (**figure 12**). Le filtrat obtenu est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite (**tableau 9**).

Tableau 9. Procédure expérimentale d'une extraction par macération dans l'eau

| Procédure expérimentale | |
|------------------------------------|---|
| Masse initiale (g) | 200 |
| Type de solvant | L'eau |
| Durée totale de l'extraction (min) | 300 |
| Séparation | Evaporation de l'eau par un rota vapeur |

• Calcul du Rendement

Le rendement total est exprimé par la relation suivante :

$$R (\%) = \frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse initiale}} \times 100$$

Pour l'extrait aqueux: $R (\%) = 40.57 / 200 * 100 = 20.3\%$



Figure 12 .Extraction par macération dans l'eau.

3. Analyse phytochimique

3.1. Screening phytochimique

Des tests en tube sont réalisés sur les poudres végétales afin de déterminer de manière préliminaire la nature des différents constituants contenus dans la plante étudiée. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ainsi qu'à des examens en lumière ultraviolette.

Le **tableau 10** représente les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés. La présence des principales classes phytochimiques est classée comme suit.

Tableau 10. Réactifs spécifiques et réactions de caractérisation du criblage phytochimique

| Groupes chimiques | Réactifs et résultats positifs |
|------------------------------|---|
| Alcaloïdes | - Mayer (Iodomercurate de potassium) → précipité blanc jaunâtre - Dragendorff (iodobismuthate de potassium) → précipité rouge orangé |
| Flavonoïdes | - Réaction à la cyanidine → coloration orangée, rouge ou violette |
| Tanins | - FeCl ₃ → coloration bleu-foncée, verte ou noire |
| Coumarines | - NH ₄ OH (25%) → fluorescence sous lumière UV |
| Dérivés quinoniques | Bornträger (réaction entre cycles quinoniques en milieu NH ₄ OH) → coloration rouge violacée |
| Stéroïdes et Terpènes | - Liebermann-Burchard (anhydride acétique-H ₂ SO ₄) → coloration violette bleue ouverte |
| Saponosides | - Détermination de l'indice de mousse (IM*): test positif si IM >100 |

IM est le degré de dilution d'un décocté aqueux de la drogue végétale qui, dans les conditions déterminées, donne une mousse persistante +: présence certaine +/-: présence incertaine -: absence

3.2. Analyses quantitatives

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux et des flavonoïdes des différents extraits sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage et exprimées en mg équivalent par g de la matière végétale sèche. La raison principale pour le choix de ces substances

réside dans le fait que la majorité des activités biologiques et pharmacologiques des fleurs de *C.arvensis* leur sont attribués.

a. Dosage des flavonoïdes (FL)

a. Principe

La teneur en flavonoïdes des extraits bruts a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium décrite par **Barros et al (Barros et al, 2011)**.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et la soude, entraînant ainsi la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm.

b. Methode

Une prise de 500 µl d'extrait convenablement dilué est mise dans un tube en présence de 2 ml d'eau distillée additionnée de 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2 , 5%). Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150 µl d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%) sont ajoutés au mélange. On apporte à ce dernier 2 ml d'une solution de soude (NaOH , 4%) après 6 mn de repos, puis on ajuste le volume final à 5 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la couleur rose est mesurée à 510 nm après 15 min d'incubation. Une gamme étalon à base de rutine est également préparée dans les mêmes conditions.

b. Dosage des polyphénoliques totaux (PPT)

a. Principe

La teneur en polyphénols totaux des extraits bruts a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu suivant la méthode décrite par **Lister et Wilson (Lister et Wilson., 2001)**. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Les deux acides sont réduits, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (**Ribéreau-Gayon et al, 1968**). L'intensité de cette couleur renseigne sur le contenu en polyphénols totaux dans le mélange.

b. Methode

Une prise de 100 µl d'extrait convenablement dilué est mise dans un tube en présence de 750 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué). Après agitation vigoureuse et repos du mélange pendant 5 mn à 22°C, 750 µl d'une solution de

carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% sont ajoutés. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec l'acide gallique, est mesurée à 725 nm après 90 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait.

4-Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-DAD-MS)

D'une manière générale, la CLHP, fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, reste une technique populaire et efficace dû à leur reproductibilité et à ses diverses possibilités de couplages avec d'autres instruments et systèmes de détection (**Figure 12**).

4.1. Appareillage

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec un système de détection de barrette à diodes couplée à la spectroscopie de masse (**HPLC-DAD-MS**) est constituée d'une pompe binaire (G1312A, Agilent 1100) d'un échantillonneur automatique (G1330B) couplé à un détecteur UV / Visible à diodes et un Spectromètre de masse équipé d'une source d'ioniseur par électrospray (MS; ESI-; Micromass Quattro Micro; Waters, Milford, MA, USA).

La séparation par CLHP en phase inverse a été effectuée à l'aide d'une colonne zorbax C18 Zorbax (100mm x 2.1mm x 1.7 μ m).

Le spectromètre de masse a fonctionné en mode ion négatif avec les paramètres suivants: tension capillaire, 3,0 kV; Tension de cône, 20 V; l'extracteur, 2 V.

La température de la source était de 100 °C, la température de désolubilisation était de 350 °C, le débit de gaz conique était de 30 L/h, et le débit de distillation était de 350 L / h.

4.2. Conditions opératoires

Les extraits de la plante *C.arvensis* ont été étudiés afin d'identifier et quantifier leurs composés phénoliques (**figure 13**). La phase mobile est constituée d'un mélange binaire de solvants A (acétonitrile à 0,1 % d'acide formique) et B (l'eau distillée à 0,1 % d'acide formique). L'échantillon est dissout dans le méthanol et filtré à travers un filtre millipore 0,2 μ m. La séparation a été réalisée à température ambiante sous un débit de 0,5 mL/min avec un gradient de solvants programmé selon le **tableau 11**.

Tableau 11. Programme (temps, débit et gradient de solvant) utilisé en CLHP analytique pour l'injection de nos extraits ainsi que pour les témoins.

| Temps (min) | A% | B % | Débit |
|-------------|-----|-----|-----------|
| 0 | 90% | 10% | 0.5mL/min |
| 0-18 | 30% | 70% | 0.5mL/min |
| 18-20 | 30% | 70% | 0.5mL/min |
| 20-23 | 30% | 70% | 0.5mL/min |
| 23-25 | 90% | 10% | 0.5mL/min |
| 25-30 | 90% | 10% | 0.5mL/min |

Le volume de l'injection est de 10 μ l. Les pics sont examinés à 280 nm et 330 nm et identifiés grâce à la comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des témoins purs. Une gamme de 18 standards a été utilisée composée d'acide phénolique et de flavonoïde.

**Figure 13 . Appareil CLHP-DAD-MS.**

5. Potentiel antioxydante

Beaucoup de tests sont utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. La plupart de ces tests sont basés sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Notre étude est basée sur quatre tests: Le test DPPH, FRAP, ABTS et Inhibition du blanchiment du β -carotène. Des modifications ont été, cependant, apportées afin de les optimiser et de les adapter à notre étude.

5.1. Activité anti-radicalire par DPPH

a. Principe

L'effet anti-radicalaire des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH° est basé sur la méthode décrite par Huang (**Huang et al, 2002**), en y apportant quelques modifications. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil).

Ce dernier de couleur violette se réduit en 2.2-diphényl -1- picryl hydrazine de couleur jaune en capant un atome d'hydrogène.

b. Méthode

Dans des tubes, on introduit 2,5 ml des différentes concentrations de chaque extrait et 0.5 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.2 mM DPPH, dissous dans le méthanol) fraîchement préparée.

Les mélanges sont vigoureusement agités au vortex et mis en obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Après agitation au vortex, la lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm.

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en CI₅₀. Ce paramètre est défini comme étant la concentration de l'antioxydant qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Les valeurs des CI₅₀ moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des extraits testés et l'ordonnée par le pourcentage de réduction (PR) du radical DPPH, ce dernier est calculé par la formule suivante :

$$I\% = \frac{\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs Échantillon}}{\text{Abs contrôle négatif}} \times 100$$

I% : pourcentage de l'activité antiradicalaire (AAR%)

Abs contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif

Abs de l'échantillon : Absorbance de l'échantillon

Le contrôle négatif est composé de la solution de DPPH dans le méthanol seul, et le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard le

BHT, avec des concentrations de 0,48 à 1000 µg/ml. En outre, les valeurs des CI50 ont été déterminées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.

5.2. Test de pouvoir réducteur du fer (FRAP)

a. Principe

Le test de la réduction du fer est considéré comme un test direct et rapide est utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques. Le test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) est effectué selon la méthode décrite par Oyaizu (Oyaizu, 1986).

Cette méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe²⁺, la réaction est révélée par le virage de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺), l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotométrie à 700 nm.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Doukani Koula et al., 2014).

b. Méthode

1 ml de chaque extrait (1 mg/ml) a été mélangé avec 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de la solution aqueuse du ferricyanure de potassium (K₃FeCN₆) à 1% (m/v). Les solutions ont été secouées immédiatement et bien mélangées, puis ils ont été incubés dans un bain-marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% est additionné au mélange réactionnel. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. A la fin, 2.5 ml du surnageant a été mélangé avec 2.5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl₃ à 0,1%.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique de concentration égale à 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/ml :

$Y = 0.005 x + 0.163$; $R=0,997$. Les absorbances ont été mesurées à la longueur d'onde 700 nm.

5.3. Capacité antioxydante équivalente de trolox (TEAC)

a. Principe

Le test TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) ou test de décoloration de l'ABTS^{°+} est effectué selon la méthode décrite par **Tuberoso (Tuberoso & al., 2010)**, ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{°+}, sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton de l'antioxydant. Une comparaison est faite avec la capacité du Trolox (analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer ABTS^{°+}. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester.

Le radical ABTS^{°+} se forme par arrachement d'un électron e⁻ à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H⁺), le radical d'azote concerné piège un H⁺, conduisant à l'ABT⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

b. Méthode

Le radical cationique ABTS^{°+} a été produit par la réaction entre 10 ml d'ABTS (2 mM) dans H₂O et 100 µl de persulfate de potassium (70 mM). Le mélange a été mis en incubation à l'obscurité pendant 16 h à température ambiante.

La solution d'ABTS^{°+} a été ensuite diluée avec le méthanol pour obtenir une absorbance de 0,70 à 734 nm. 200 µl de chaque extrait à une concentration de 1 mg/ml ont été mélangés avec 2 ml de la solution d'ABTS^{°+} diluée, et laisser réagir pendant 1 min. L'absorbance du radical ABTS^{°+} est mesurée à 734 nm. Tous les échantillons ont été réalisés en triplicat. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de Trolox par gramme d'extrait en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage de Trolox (0.48, 0.95, 1.42, 1.90, 2.85, 3.80, 4.76 µg/ml) $Y = -0,09982 x + 0,5394$; $R = -0,9934$.

5.4. Inhibition du blanchiment du β -carotène

a. Principe

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir du groupement méthylène diallylique de l'acide linoléique (**Kaur et Kapoor, 2002**). Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β - carotène hautement insaturé qui perd ses doubles liaisons entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (**Yanishlieva et Marinova, 1995 ; Yang et al., 2008**).

b. Méthode

La méthode décrite par **Koleva (Koleva et al. 2002)** a été employée avec une légère modification. Une émulsion β -carotène/acide linoléique est préparée par solubilisation de 2 mg de β - carotène dans 20 ml de chloroforme. 4 ml de cette solution sont mises dans un ballon avec 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme (40°C), 100 ml d'eau distillée aérée sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée. Des aliquotes de 10 μ l d'extrait à différentes concentrations sont placées dans une plaque à 96 puits en présence de 150 μ l d'émulsion. Deux témoins (positif où l'échantillon est remplacé par l'antioxydant des extraits et négatif sans antioxydant) ont été aussi préparés avec la même procédure. Les microplaques sont alors mises en incubation à 50°C pendant 120 min et l'absorbance est mesurée (t = 0 et t = 120 min) à 490 nm grâce à un lecteur de microplaques. Le pourcentage d'inhibition (PI) est obtenu comme suit :

$$PI \% = \frac{AE - AC_{120}}{AC_0 - AC_{120}} \times 100$$

AE : absorbance de l'extrait à t = 120 min

AC₁₂₀ : absorbance du contrôle (témoin négatif) à t = 120 min

AC₀ : absorbance du contrôle (témoin négatif) à t = 0 min Cette activité est également exprimée en CI₅₀.

6. Potentiel antimicrobien des plantes

Dans cette partie, on recherche des composés antimicrobiens présents dans les extraits de *C.arvensis* connus pour leurs propriétés thérapeutiques.

6.1. Microorganismes utilisés pour l'étude de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée sur 22 souches bactériennes pures et 6 souches fongiques. Les souches bactériennes et fongiques proviennent du Laboratoire de Microbiologie de l'Institut National d'Hygiène (INH) à Rabat.

a. Bactéries à Gram positif

- ***Rhodococcus equi***

C'est une bactérie gram positif, bacille ou un court bacille, intracellulaire facultative, capsulée (le matériel capsulaire est synthétisé en grande quantité à tel point qu'il peut tomber dans le couvercle d'une boîte de Pétri lors de l'incubation), Elle est présente dans le sol et dans les fèces de nombreuses espèces animales (bovins, chats, chèvres, chevaux, chiens, daims, lapins, moutons, opossums, pigeons, poules, porcs.). *Rhodococcus equi* est un pathogène opportuniste pour de nombreuses espèces animales (notamment pour le cheval) et pour l'homme, dont les formes cliniques sont variées : pneumonies aiguës, caractérisée par une grande détresse respiratoire et mortelle en quelques jours; abcès de l'intestin accompagnés d'une ulcération des nœuds lymphatiques ; entérites avec diarrhées, souvent mortelle (Bellks et al., 1998).

- ***Staphylococcus aureus MDR***

Staphylococcus aureus dit staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Cette bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses (principalement les fosses nasales) et des zones sous cutanées humides (périnée, aisselles). La transmission interhumaine s'opère généralement par contact direct (main portage). Elle peut aussi être indirecte par les vêtements, la literie, ou les aliments. *Staphylococcus aureus* peut causer des infections urinaires (Freney J., 2007).

- ***Staphylococcus aureus* SARM**

L'introduction en 1961 des pénicillines semi-synthétiques résistantes aux pénicillinases fut suivie de l'émergence de souches de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM). Cette résistante s'étend aux autres pénicillines résistantes aux pénicillinases et à toutes les autres β -lactamines.

La proportion de SARM en milieu hospitalier atteignait en 1990 en France 30 à 40%, l'un des taux les plus élevés d'Europe. Ces souches étaient multi résistantes aux antibiotiques (aminosides, macrolides, fluoroquinolones). Depuis 1990, plusieurs cas d'infections communautaires à SARM ont été décrits en Australie, au Canada, en France, et aux Etats-Unis ([Leclerc H., 1995](#)).

- ***Streptococcus***

Les Streptocoques sont des cellules ovoïdes, sphériques ou quelquefois allongées en fuseaux, se divisent sur un seul plan pour former des paires ou des chaînettes. Ce sont des anaérobies aérotoleérantes c'est-à-dire incapables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence, se cultivent bien dans une atmosphère contenant du CO₂. Les espèces de ce groupe, peuvent être responsables d'infections de gravité variable. Le pyogènes est un hôte inconstant du rhinopharynx des individus en bonne santé et peut déterminer des infections aiguës, de la sphère ORL (angines érythémateuses, scarlatine, rhinites, sinusites, otites), de la peau et des muqueuses (érysipèle, impétigo, pyodermite), des complications non suppurées (rhumatisme articulaire aigu, glomérulonéphrite aiguë) ([Leclerc H., 1995](#)).

- ***Streptococcus agalactiae***

Cette bactérie est un pathogène responsable des méningites, pneumonie, conjonctivite, otite chez le nouveau-né et le jeune enfant. Cette espèce est aussi responsable des infections urogénitales chez la femme.

b. Bactéries à Gram négatif

- ***Pseudomonas***

Ce genre appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Les bactéries de cette famille sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les *Pseudomonas* se cultivent facilement sur milieux usuels, en aérobiose, à la température de 30°C, certaines espèces comme *P. aeruginosa* sont capables à 41°C et même 43°C, d'être utilisé pour le diagnostic. La production d'un pigment

est assez commune dans ce genre. Certaines du genre *Pseudomonas* sont connues par leur caractère pathogène opportuniste. *P. aeruginosa*, est un germe ubiquiste communément rencontré dans le sol et plus encore dans les eaux, capable de se multiplier à 41°C contrairement à *P. fluorescens* et *P. putida*. Fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier, il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.) et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanée). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre (Leclerc H., 1995).

- ***Acinetobacter***

Les *Acinetobacter* appartiennent à la famille des Neisseriaceae, ce sont des bacilles à gram négatif, souvent coccoïdes, aérobies stricts, et habituellement résistants à la pénicilline. Elles ont un caractère ubiquiste, présentes naturellement dans le sol et les eaux, possédant des capacités de dégradation voisines de celles des *Pseudomonas*, et par conséquent, ont un rôle important dans les processus de minéralisation (eaux) ou d'altération (aliments). Elles colonisent la flore cutanée des patients hospitalisés, et sont fréquemment rencontrées dans les infections nosocomiales chez les malades immunodéprimés: septicémies, des méningites, des endocardites, des abcès du cerveau, pneumonies, l'espèce de *A. baumannii* est très reconnue par sa résistance aux antibiotiques (Leclerc H., 1995).

- ***Salmonella***

Les bactéries du genre *Salmonella* forment une seule espèce, qui est subdivisée en 6 sous espèces, chaque sous espèce est divisée en sérotypes caractérisés par une formule antigénique spécifique. Les sérotypes peuvent être subdivisés à leur tour en biotypes (caractères biochimiques). Certaines *Salmonella* sont strictement adaptées à l'homme comme: *S. typhi*, *S. paratyphi* (A, B et C), *S. sendaii*, responsables de la fièvre typhoïde et paratyphoïde humaine, et ne manifestent pas de pouvoir pathogène en dehors de l'espèce humaine, pour cette raison en l'appel "salmonelles majeures". D'autres stéréotypes, dits "salmonelles

mineures" des toxi-infections alimentaires comme *S. enteritidis* et *S. typhimurinum* (Berche P., 1989). Qui peuvent déterminer des infections chez de nombreuses espèces animales Un manque d'hygiène est très souvent à l'origine de la transmission.

- **Proteus**

Ces bactéries sont caractérisées par leur grande mobilité, et sont vraisemblablement d'origine tellurique. Certaines espèces d'intérêt médical tels que *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *Morganella morganii* (ancien *Proteus morganii*), peuvent induire des infections des voies urinaires (dans 60% des cas d'infections urinaires), des infections cutanées (surinfections des plaies chirurgicales, brûlures), des infections des voies respiratoires (otites chroniques suppurées, sinusites), et même des septicémies (Berche P.,1989).

- **Escherichia Coli**

E. coli, un hôte commun de l'intestin de l'homme (10^8 FC/g de selles), et des animaux; elle est recherchée à ce titre, comme germe témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments. A l'intérieure de l'espèce il existe des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro- entérites et diarrhées), le pouvoir pathogène d'*E.coli* est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *E.coli* entéro-pathogène (diarrhées infantiles), *E. coli* entérotoxino-gène (tourista), *E.coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *E. coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *E. coli* entéro-adhérent (diarrhée du voyageur). Les autres sont responsables des méningites néonatales, des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes hospitalisées (Leclerc H., 1995).

- **Levures du genre Candida spp.**

Les levures du genre *candida* sont des champignons fréquemment retrouvés au niveau de la bouche et du tractus gastro-intestinal de plusieurs personnes normales. Parmi les conditions favorisant une infection à candida, on note le diabète, la grossesse, les antibiotiques, les cortico- stéroïdes et toute maladie pouvant affecter l'état général d'un individu. La nystatine est très efficace dans le contrôle des infections muco-cutanées, L'espece *Candida albicans* est souvent

incriminée dans les infections urogénitales chez la femme (**Pieri F., Kirkiacharian S., 1992**).

6.2. Méthodes de l'évaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et organiques de *C.arvensis* a été réalisée par la technique de diffusion en puits, en procédant comme suit :

a. Solubilisation des extraits à tester

Les extraits organiques (EO) d'héxane et de méthanol de *C.arvensis*, sont solubilisés dans le diméthylsulfoxyde DMSO à 0,5 %. Le DMSO est un solvant organique incolore de formule brute C₂H₆O₂S, utilisé en chimie pharmaceutique pour sa capacité à solubiliser de nombreux extraits organiques (**Kathrin-Maria Roy., 2000**).

Le DMSO est utilisé tout seul comme contrôle négatif. L'extrait aqueux est solubilisé dans l'eau distillée stérile.

b. Activation des souches stockées

Les souches pures stockées dans les cryotubes à -20°C sontensemencées dans des tubes à essai contenant le milieu de culture BHI et incubées à 37°C pendant 2h. Par la suite, elles sontensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu CLED et incubées à 37°C durant 24h.

c. Préparation des suspensions

Les boîtes contenant les souches actives de durée de vie de 24h sont utilisées pour la préparation des suspensions bactériennes à base d'eau physiologique : on répartit stérilement de l'eau physiologique dans des tubes à hémolyse à raison de 9 ml dans chaque tube, puis on met en suspension des colonies prélevées à l'aide d'une anse stérile. La densité de la suspension doit présenter une opacité comparable à celle de l'étalon Mac Ferland n° 0,5 (1,5 *10⁷ UFC/ml). On ajuste l'opacité en ajoutant de l'eau physiologique stérile si la suspension est trop trouble, soit les colonies bactériennes si la suspension est claire.

d. Diffusion en puits

On prépare la gélose de Mueller-Hinton qui doit être séchée (absence complète de l'eau à sa surface), puis on procède à un ensemencement par la technique d'écouvillonnage qui consiste à tremper d'abord un écouvillon stérile dans

la suspension et à ensemercer par la suite la gélose par cette dernière. On laisse sécher de 3 à 5 min, puis on pratique des puits à l'aide d'une pipette pasteur stérile (il faut éloigner les puits de 1 cm minimum du bord de la boîte de Pétri).

Le nombre des puits par boîte correspond aux différentes dilutions effectuées pour les extraits, on injecte 50 µl d'extrait à tester ainsi que ses différentes dilutions dans les puits, ensuite on incube les boîtes de Pétri pendant 24h à 37°C.

e. Lecture des boîtes

L'évaluation de l'activité antibactérienne est faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits à l'aide d'une règle après incubation. Ce diamètre inclut celui du puit.

6.3. Technique de la détermination des CMI et CMB des extraits de *C.arvensis*

a. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Définition

La concentration minimale inhibitrice est la plus faible concentration de l'extrait capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier. Les CMI ont été déterminées en milieu liquide dans des microplaques de plastique, stériles contenant 96 puits à fond rond.

100 µL d'extrait de concentration de 80 mg/ml à tester sont déposés dans les puits de 1^{ère} et 2^{ème} ligne. Après homogénéisation des puits de 2^{ème} ligne qui contiennent 100 µL de BHI et 100 µL de l'extrait à tester, des dilutions de raison 2 sont réalisées d'un puits à un autre pour chaque colonne, de telle sorte que tous les puits de microplaque contiennent 100 µL de l'extrait dilué avec BHI, sauf les puits de la première ligne qui contiennent juste 100 µL de l'extrait pur, et les puits de la dernière ligne qui renferment 200 µL de la dilution la plus faible de l'extrait dans BHI.

L'inoculation a été réalisée par dépôt de 10 µL de la suspension des souches bactériennes sensibles aux extraits organiques et extrait aqueux. Chacune des deux colonnes contenait les différentes dilutions d'un extrait organique, et une seule souche bactérienne (essai en double). Les microplaques sont bouchées avec des feuillets adhésifs à la dimension des plaques et sont incubées dans l'étuve pendant 24 h à 37 °C. Après 24 h d'incubation, on ajoute dans chaque puit

10 μ L de réactif de sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) qui est un révélateur de la croissance bactérienne. On laisse la microplaque dans l'étuve 15 minutes à 37 °C, et on observe par la suite la coloration des puits. L'apparition d'une coloration violette montre une croissance bactérienne. La CMI correspond à la concentration du puits qui existe juste avant le premier puits coloré en violet (**Figure 14**).

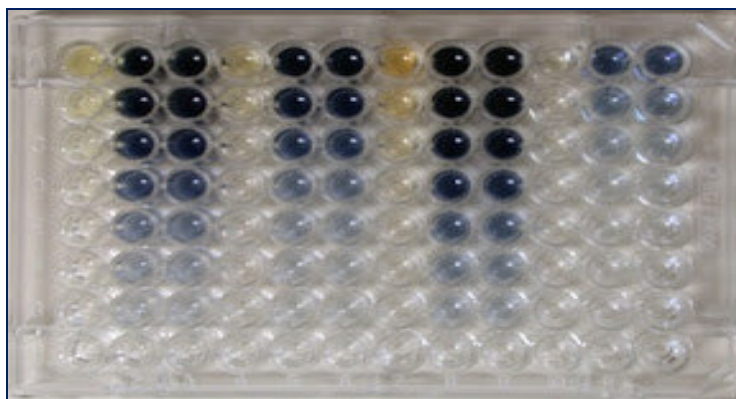


Figure 14 .Microplaque 96 puits contenant les différentes dilutions.

b. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) **Définition de la CMB**

La concentration minimale bactéricide est la plus faible dose capable de tuer le microorganisme. Alors que la CMB a été déterminée en repiquant par ensemencement à l'aide d'une anse sur un milieu CLED les puits sans croissance bactérienne visible. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24h à 37°C. Après incubation, les boîtes où il n'y avait pas une croissance bactérienne correspondaient aux concentrations des extraits qui représentent les CMB.

La CMB de nos extraits est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie ou de levure. Chaque expérience est réalisée trois fois au cours de trois expériences successives.

6.4. Méthode de l'évaluation de l'activité antifongique

L'évaluation (*in vitro*) de l'activité antifongique des extraits organiques et aqueux de *C.arvensis* a été réalisée par la technique de diffusion en puits, en procédant comme suit :

a. Solubilisation des extraits à tester

Elle est réalisée exactement comme celle utilisée pour les tests antibactériens, selon la même procédure et ceci le jour même de l'expérimentation.

b. Activation des levures stockes

Les souches pures stockées dans les cryotubes à -20°C sontensemencées dans des tubes à essai contenant le milieu de culture Sabouraud liquide et incubées à 30 °C pendant 2 h. Par la suite, elles sontensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu CLED et incubées à 37°C durant 24h.

c. Préparation des suspensions

Les boîtes contenant les levures actives de durée de vie de 48h sont utilisées pour la préparation des suspensions fongiques à base d'eau physiologique : on répartit stérilement de l'eau physiologique dans des tubes à hémolyse à raison de 9 ml dans chaque tube, puis on met en suspension des colonies prélevées à l'aide d'une anse stérile.

d. La diffusion en puits

On prépare la gélose préalablement liquéfiée : Sabouraud qui est le milieu usuel utilisé pour ce type de culture. Puis on procède à un ensemencement par la technique d'écouvillonnage qui consiste à tremper d'abord un écouvillon stérile dans la suspension et à ensemencer par la suite la gélose par un 1ml de cette dernière. On laisse sécher à 15 min, puis on pratique des puits à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Pour les extraits, on injecte 50 µl d'extrait à tester ainsi que ses différentes dilutions dans chaque puits, ensuite on incube les boîtes de Pétri de 2 à 3 jour à 30°C.

e. Lecture des boîtes

On utilise la même procédure effectuée pour la détection de l'effet des extraits sur les bactéries.

7. Cytotoxicité

La cytotoxicité permet de chercher l'effet toxique cellulaire par une méthode évaluant un paramètre donné (croissance cellulaire, intégrité cellulaire, activité fonctionnelle cellulaire). Son but est de déterminer la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) qui est la concentration qui inhibe de moitié la prolifération cellulaire globale. Plusieurs méthodes pour déterminer la cytotoxicité existent;

Les méthodes des perturbations de la perméabilité membranaire et les méthodes fondées sur des altérations de la prolifération cellulaire. La lignée myéloïde provenant du patient homme, sur lesquelles on a testé nos extraits, provenant du

Laboratoire de National Centre for Cell Sciences, Fes, Morocco, puis stockées dans l'azote liquide.

a. Décongélation des cellules

On sort l'ampoule contenant les cellules de la bonbonne d'azote liquide, son contenu est décongelé d'une manière progressive et transféré à l'aide d'une pipette stérile dans un flask de culture cellulaire de 75 cm³ contenant 20 mL de milieu de culture MEC (minimum essential communications), 10 % de SVF, 2% d'antibiotique, et 2 % de la L-glutamine, transféré dans une haute à flux laminaire horizontal pour la culture cellulaire. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C dans une étuve humidifiée à 5 % de CO₂. Après l'incubation, le milieu de culture est éliminé puis remplacé par 20ml de milieu MEC à 2% d'antibiotique, 2 % de la L-glutamine et 2 % de SVF.

Ensuite les cellules sont de nouveaux incubées à 37°C jusqu'à la formation d'une couche confluente (24 à 72 heures).

b. Trypsination

Après formation de la couche confluente on procède à l'étape de trypsination, on lave les cellules deux fois avec PBS, on ajoute 1 mL de Trypsine, le tout est incubé pendant 30 secondes à 37°C (la température optimale de fonctionnement de la trypsin). La trypsin est une enzyme protéolytique qui transforme les chaînes polypeptidiques en acides aminés simples détachant les cellules.

On arrête l'action de la Trypsine par l'addition de 2 mL de milieu de culture MEC.

c. Préparation des plaques de 96 puits

Après trypsination et comptage des cellules par TC20™ Automated Cell Counter **Figure 15 A.** Les cellules sont préparées à partir de milieu MEC. Cette suspension cellulaire est utilisée pour la préparation des plaques de 96 puits par l'addition de 100 µL dans chaque puits de la plaque, Enfin, les plaques sont incubées à 37°C dans une étuve à 5 % de CO₂ jusqu'à la formation d'un tapis cellulaire confluent.

d. Inoculation des plaques de 96 puits

On ajoute 5 mg de chaque extrait en solution dans 0,5 mL de DMSO, 1 mL de la solution stock on ajoute 9 mL du milieu de culture constituant la solution mère. 200 µL de cette solution mère sont déposés dans le premier puit de la plaque contenant 100 µL de milieu de culture cellulaire MEC dans chaque puit.

On procède une dilution de $\frac{1}{2}$, ainsi 100 μ L de ce premier puits sont mis dans le deuxième puit et ainsi de suite jusqu'au onzième puit. Laissant le douzième puits comme témoin négatif et préparant ainsi une série de dilutions de $\frac{1}{2}$ jusqu'à $\frac{1}{32}$, sachant que tous les puit de la plaque contiennent 100 μ L de milieu MEC (**Figure 15 B**). La plaque est ensuite incubée pendant 48 heures à 37°C.

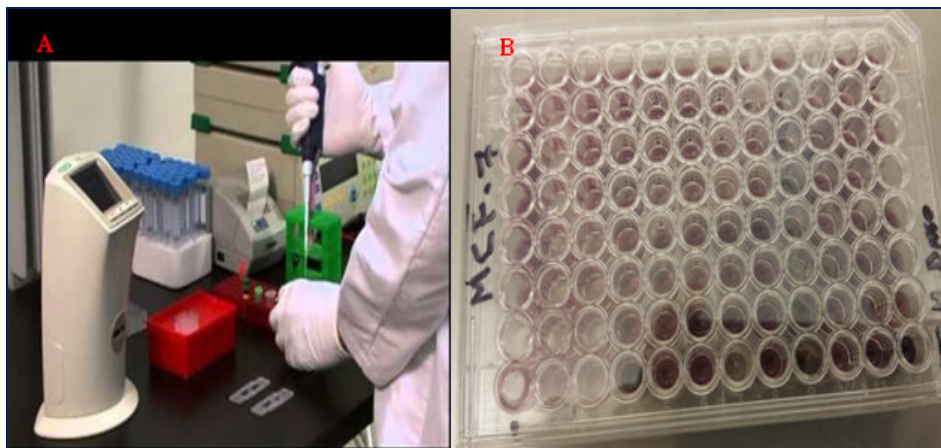


Figure 15 .A. TC20™ Automated Cell Counter et B. Illustration d'une plaque de 96 puits dont on réalise un test colorimétrique MTT

e. Révélation de la cytotoxicité

On a étudié l'activité cytotoxique de nos extraits sur le taux de croissance globale de la lignée cellulaire cancéreuse par le test colorimétrique MTT.

Ce test est l'un des méthodes fondées sur des perturbations des fonctions mitochondriales des cellules, il utilise le sel de tétrazolium MTT comme colorant dans l'étape de métabolisation après sa pénétration dans les cellules vivantes.

Le test colorimétrique MTT a été décrit par Mosmann (**Mosmann, 1983**) puis modifié par Carmichael et collaborateurs (**Carmichael et collaborateurs, 1987**). Le dit test est basé sur la mesure du nombre des cellules vivantes, métaboliquement actives et capables de réduire le tétrazolium par la succinate déshydrogénase mitochondrial en cristaux de Formazan violet. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et est quantifiée par Lecteur de microplaques VersaMax ELISA à 540 nm. Avant de commencer le test, on compte les cellules mortes en utilisant un Automated Cell Counter. Les lignées cellulaires ont étéensemencées au jour J₀ dans des plaques de 96 puits et incubées durant 24 heures pour assurer une adhésion adéquate des cellules.

La première rangée de la plaque multipuits est utilisée comme blanc, ne

contenait que le milieu de culture.

Les extraits organique sont dissous avec une fraction 1% V/V de DMSO, puis sont mis en contact avec les cellules en incubation pendant 72 heures.

Les rangées 5 et 9 sont des témoins.

A J₄, le sel de tétrazolium MTT est introduit dans les 96 puits, 10 µL dans chaque puit , après élimination du surnageant, les plaques sont incubées pendant 2 heures. 200 µL de DMSO est introduit dans les puits pour dissoudre les cristaux de Formazan. On agite les plaques pendant 30 minutes.

Détermination de la concentration cytotoxique à 50% (CI₅₀) Le pourcentage de cytotoxicité est déterminé par la relation suivante (**Betancur-Galvis et al., 1999**) :

$$\text{Pourcentage de cytotoxicité} = \frac{\mathbf{A-B}}{\mathbf{A}} \times 100$$

A : La moyenne des densités optiques de tous les puits témoins.

B : La densité optique du puit test.

On trace la courbe de pourcentage de cytotoxicité en fonction de la concentration d'extrait et on déduit la concentration cytotoxique à 50%.

8. Activité anti-inflammatoire

a. Principe

Les expériences ont été effectuées chez des rats wistar mâles (180-220 g).

Ces animaux proviennent de l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie- Rabat. Tous les animaux ont été gardés dans une pièce maintenue dans des conditions contrôlées de l'environnement de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ avec un cycle de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité, Ces animaux ont un accès libre à l'eau et à un régime standard d'alimentation. Ils ont été acclimatés au moins une semaine avant de commencer les expériences. Les animaux soumis à l'administration par voie orale des extraits des médicaments sont mis à jeun de nourriture (mais pas d'eau) pendant 18 h avant et 3 heures après l'expérience.

- Une tige d'acier de 10 mm de diamètre pesant environ 50 g.
- Un tube en plexiglas de 12 mm de diamètre intérieur et de 50 cm de longueur.

b. Appareille

Le Pléthysmomètre sert à mesurer l'efficacité des agents anti-inflammatoires. Il s'agit d'un appareil conçu pour la mesure précise et rapide de l'inflammation et de l'œdème de la patte chez les rongeurs de laboratoire comme les rats et les souris. La mesure est effectuée en insérant la patte postérieure gauche dans la solution saline, contenu dans une cellule spéciale de l'appareil. Le volume est déterminé à partir du changement de pression qui est proportionnel au poids et à la densité en se basant sur le principe d'archimède. Ce changement de pression est calibré en millilitre (mL) durant la phase d'étalonnage.

La patte postérieure gauche de l'animal est plongée dans le liquide présent dans la cuvette, vers le bas jusqu'au point marqué au début sur la patte (**Figure 16**).

La solution de remplissage de pléthysmomètre contient NaCl 9 ‰ et quelques gouttes de Triton X-100 (Fluka Biochemica).

Préparation de la solution de carragénine (25 mg de carragénine dissous dans 10 mL de NaCl 9 ‰)



Figure 16 .Digital plethysmometer LE7500.

c. Méthode

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des trois des extraits de la plante étudiée , méthanolique, N-héxanique et aqueux de *C.arvensis* est plante étudiée réalisée par deux méthodes, une méthode chimique à la carragénine et une autre méthode physique par traumatisme expérimental (**Winter et al , 1962**).

i. Méthode chimique

L'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de rat provoque un oedème qui peut être réduit par une substance douée de propriétés anti-inflammatoires.

L'activité anti- inflammatoire a été évaluée sur la base d'inhibition d'un œdème

induit par l'injection de la carragénine sous la région plantaire de la patte postérieure gauche du rat.

Les rats wistar mâles (180-220g) ont été divisés en différents groupes (n=6).

Les animaux ont jeûné pendant la nuit (18h).

Tous les groupes ont reçu 5mL/kg d'eau VO , le groupe standard reçoit le médicament de référence indométacine 10 mg/kg, VO, Les groupes de l'essai reçoivent différentes concentrations de l'extrait méthanolique, N-héxanique et aqueux de *C.arvensis* (300 et 500 mg/kg, VO) , respectivement. Une demi-heure après l'administration orale des différentes substances, 0,05 ml d'une suspension fraîche de carragénine à 1% est injecté à tous les animaux dans la patte postérieure gauche (**figure 17**).

La patte postérieure droite n'est pas traitée, elle est considérée comme un témoin. La différence de volume entre la patte gauche et la patte droite est mesurée en utilisant un Pléthysmomètre Digital 7500 à 1 h 30, 3 h et 6 h après l'induction de l'inflammation (**Alaoui et al., 1998**).

Les pourcentages d'inhibition de l'inflammation sont calculés selon la formule suivante

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Moyenne } (V_{\text{Gauche}} - V_{\text{Droit}}) \text{ contrôle} - \text{Moyenne } (V_{\text{Gauche}} - V_{\text{Droit}}) \text{ traités}}{\text{Moyenne } (V_{\text{Gauche}} - V_{\text{Droit}}) \text{ contrôle}} \times 100$$

V gauche signifie le volume de l'œdème sur la patte postérieure gauche et V droit le volume sur la patte postérieure droite.

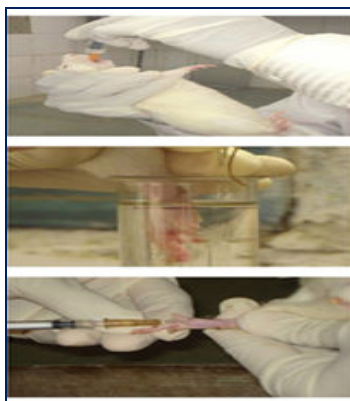


Figure 17 .Méthode chimique d'anti inflammatoire aigue.

ii. Méthode physique

L'activité anti-inflammatoire est évaluée selon la méthode décrite par le test de **Riesterer et Jaques (Riesterer et Jacques., 1970)**, Des rats mâles Wistar (180-220 g) ont été divisés en différents groupes (n = 6). Les animaux ont jeûné pendant la nuit (18h).

Tous les groupes ont reçu 5 mL/kg d'eau VO, le groupe standard reçoit le médicament de référence indométacine 20 mg/kg, VO). Les groupes de l'essai reçoivent différentes concentrations de l'extrait méthanolique , N-héxanique et aqueux de *C.arvensis* 300 et 500 mg/kg, VO, respectivement .

Au niveau de la patte postérieure gauche du rat (PG), une heure après l'administration orale des différentes substances, on crée un oedème expérimental en faisant chuter un poids de 50 g. La patte postérieure gauche est déposée sous un tube vertical en plexiglas puis on laisse tomber le poids à travers le tube au-dessus de la patte.

La patte postérieure droite est considérée comme témoin.

La différence de volume entre la patte gauche et la patte droite est mesurée en utilisant un plethysmometer Digital 7500 à 1h30, 3h et 6h après l'induction de l'inflammation (**Alaoui et al., 1998**) .

Les pourcentages d'inhibition de l'inflammation ont été calculés selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Moyenne (V}_{\text{gauche}} - \text{V}_{\text{Droit}}) \text{ contrôle} - \text{Moyenne (V}_{\text{gauche}} - \text{V}_{\text{Droit}}) \text{ traité}}{\text{Moyenne (V}_{\text{gauche}} - \text{V}_{\text{Droit}}) \text{ contrôle}} \times 100$$

V gauche signifie le volume sur l'oedème de la patte arrière gauche et V droit le volume sur la patte arrière droite.

9. Activité antidiabétique

On a réalisé l'activité antidiabétique en utilisant l'inhibition de trois enzymes : l' α -amylase, l' α -glucosidase et la β -galactosidase.

9.1. Tests d'inhibition de l'activité d' α -amylase

Les potentiels inhibiteurs de l' α -amylase ont été étudiés en faisant réagir différentes concentrations des extraits avec une enzyme α -amylase et une solution d'amidon, selon la méthode décrite par A. Hashim

(A. Hashim et al. , 2013), avec de légères modifications. Le principe de cette méthode repose sur le dosage des sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse par l' α -amylase.

En milieu alcalin et à chaud, l'oxydation de ces fonctions provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique de couleur jaune orange en acide 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm. Dans un Erlen Meyer, 912 mg de DNS, et 1,6 g de NaOH sont solubilisés dans 100 ml d'eau distillée chaude. A cette solution 28,2 g de tartrate de sodium et de potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est limpide et de couleur orange, doit être conservé à l'abri de la lumière à +4°C. L'enzyme utilisé est l' α -amylase du *Bacillus licheniformis* (E.C.3.2.1.1), son poids moléculaire 28 KDa, il est conservée à +4 °C sous forme de solution, 1 mL d' α -amylase est solubilisé dans 49 mL de solution tampon de phosphate (0.02 M, pH 6,9).

La solution obtenue contient une activité α -amylase de 240 UI/ml. Le substrat utilisé est l'amidon soluble de pomme de terre. L'amidon est préparé dans la solution tampon de phosphate (0.02 M, pH 6,9) afin de réaliser le test sur l' α -amylase. La concentration finale utilisée dans le milieu réactionnel est 0.4 mg/ml. Différentes concentrations des extraits sont préparées dans la solution tampon de phosphate (0.02 M, pH 6,9) afin d'évaluer leur effet sur l'activité enzymatique de l' α -amylase. Un mélange de 250 μ l d'échantillons (de chaque concentration) et 250 μ l de tampon de phosphate de sodium 0,02 M (pH = 6,9) contenant l'enzyme α -amylase (240 U/ mL) a été incubée à 37 °C pendant 20 min. Ensuite, 250 μ l de la solution d'amidon à 1% dans du tampon de phosphate de sodium 0,02 M (pH = 6,9) a été ajoutée au mélange réactionnel. Par la suite, le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C pendant 15 min. Ensuite, 1 mL d'acide dinitrosalicylique (DNS) 40 mM a été ajouté et le mélange réactionnel a été incubé dans un bain marie bouillant pendant 10 min. Enfin, le mélange réactionnel a été dilué en ajoutant 2 mL d'eau distillée, et l'absorbance a été mesurée à 540 nm on utilisant le spectrophotomètre UV. L'Acarbose a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés en utilisant la formule suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Ac} - \text{Acb}) - (\text{As} - \text{Asb})}{(\text{Ac} - \text{Acb})} \times 100$$

Où Ac se réfère à l'absorbance de contrôle (enzyme et tampon);

Acb se réfère à l'absorbance de blanc témoin (tampon sans enzyme);

As se réfère à l'absorbance de l'échantillon (enzyme et inhibiteur);

Et A†sb est l'absorbance de l'échantillon vierge (inhibiteur sans enzyme).

En outre, les valeurs CI₅₀ (Concentration d'inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de l'enzyme Activité) ont été déterminées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.

9.2. Tests d'inhibition de l'activité d'α-glucosidase

L'activité inhibitrice d'α-glucosidase des différentes concentrations des extraits à été déterminée en utilisant le substrat P-nitrophényl-α-D-glocopyranoside (PNPG), qui est hydrolysé par α-glucosidase pour libérer P-nitrophényl (un agent coloré qui peut être photométrie à 405 nm), selon la méthode décrite par Kee **(Kee, K. T et al., 2013)**, avec une certaine modification. Dans un erlen Meyer, 1,06 g de Na₂CO₃ sont solubilisé dans 100 ml d'eau distillée. L'enzyme utilisé est l'α-glucosidase du *Saccharomyces cerevisiae* (E.C.3.2.1.20) sous forme lyophilisé (Sigma), son poids moléculaire est de 63 kDa et conservée à +4 °C. 250 µl

d'α-glucosidase est solubilisé dans 9,8 ml de solution tampon de phosphate solution (0.1 M, pH 6,7). La solution obtenue contient une activité α-glucosidase d'IU/50 µl.

Le substrat utilisé est P-nitrophényl-α-D-glocopyranoside (PNPG) lyophilisé. La concentration de PNPG préparée dans la solution tampon phosphate (0.1M, pH 6,7) afin de réaliser le test sur l'α-glucosidase. La concentration finale utilisée dans le milieu réactionnel est de 1 mg/mL. Différente concentrations des extraits sont préparées dans la solution tampon phosphate (0.1M, pH 6,7) afin d'évaluer leur effet sur l'activité enzymatique de l'α-glucosidase. En bref, un mélange de 150 µl des échantillons et 100 µl du tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH =6,7) contenant la solution d'enzyme α-glucosidase (0,1 U / mL) a été incubé à 37 °C pendant 10 min. Après la préincubation, on a ajouté 200 µl de la solution de pNPG 1 mM solubilisé dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M (pH = 6,7). Les mélanges réactionnels ont été incubés à 37°C pendant 30 minutes. Après incubation, on a ajouté 1 mL de 0,1 M de Na₂CO₃ pour stopper la réaction. L'absorbance a été enregistrée à 405 nm en utilisant le spectrophotomètre UV. L'activité inhibitrice de l'α-glucosidase a été exprimée en pourcentage d'inhibition et calculée en utilisant la même formule que celle du test α-amylase, Ainsi, les valeurs des CI₅₀ ont été déterminées. L'acarbose a été utilisé comme témoin positif.

9.3. Tests d'inhibition de l'activité de la β -galactosidase

L'activité inhibitrice de la β -galactosidase des différentes concentrations des extraits a été déterminée en utilisant le substrat 2-Nitrophényl- β -D-galactopyranoside), qui est hydrolysé par la β -galactosidase pour libérer le 2-nitrophényl (un agent coloré qui peut être photométrie à 410 nm). Dans un Erlen Meyer, 1,06 g de Na_2CO_3 est solubilisé dans 100 mL d'eau distillée.

L'enzyme utilisé est β -galactosidase du *Aspergillus oryzae* (E.C.3.2.1.23) sous forme lyophilisé (Sigma), son poids moléculaire est de 52,6 conservée à +4°C. 250 μl de la β -galactosidase est solubilisé dans 9,8 mL de la solution tampon de phosphate (0.1M, pH 7,6) (La solution obtenue contient une activité β -galactosidase de 20U/200 μl . Le substrat utilisé est 2-Nitrophényl- β -D-galactopyranoside, lyophilisé). Afin de réaliser le test sur la β -D-galactopyranoside, on a préparé la solution tampon de phosphate de sodium de concentration (0.1M, pH 7,6).

La concentration finale utilisée dans le milieu réactionnel est de 1 mg/ml.

Différentes concentrations des extraits sont préparées dans la solution tampon de phosphate (0.1M, pH 7,6) afin d'évaluer leur effet sur l'activité enzymatique de la β -galactosidases. Ainsi, un mélange de 150 μl des échantillons et 100 μl du tampon de phosphate de sodium 0,1 M (pH = 7,6) contenant la solution d'enzyme beta-galactosidase (0,1 U/ mL) a été incubé à 37 °C pendant 10 min. Après la préincubation, on a ajouté 200 μL de solution de gala 1 mM solubilisé dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M (pH=7,6). Les mélanges réactionnels ont été incubés à 37 °C pendant 30 minutes. Après incubation, on a ajouté 1 mL de 0,1 M de Na_2CO_3 pour stopper la réaction et l'absorbance a été enregistrée à 410 nm en utilisant le spectrophotomètre UV (**Figure 18**).

L'activité inhibitrice de β -galactosidase a été exprimée en pourcentage d'inhibition et calculées en utilisant la même formule que celle du test α -amylase, Ainsi les valeurs des CI_{50} ont été déterminées. La quercétine a été utilisé comme témoin positif.

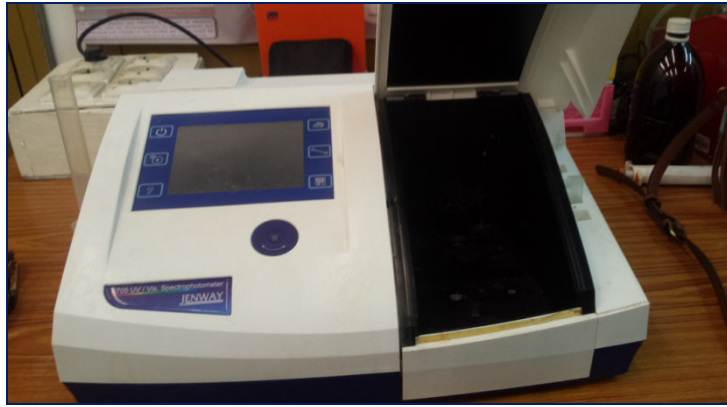


Figure 18 .Spectrophotometer UV.



**3ÈME PARTIE : RÉSULTATS ET
DISCUSSION**

1. Identification botanique

L'identification botanique de *C.arvensis* a été réalisée par **Monsieur Mohammed Fanane** Professeur à l'institut Scientifique de Rabat, le numéro de référence est **(RAB 78161) (Figure 19)**.



Figure 19 .Confirmation Scientifique de l'espèce *C.arvensis*

2. Rendements des extraits végétaux

Le processus général de caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir de matrices complexes, telles que les plantes, fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques (**Hostettmann et Wolfender, 2004**).

Les techniques qu'on a utilisé lors de l'extraction ont permis d'obtenir des rendements qui diffèrent d'un extrait à l'autre. L'extrait méthanolique et l'extrait aqueux ont un bon rendement, par ailleurs l'extrait -N-héxanique possède un rendement moins important (**tableau 12**)

Tableau 12. Rendements des extraits végétaux.

| Les extraits | Les rendements |
|----------------------|----------------|
| Extrait N-héxanique | 10.2% |
| Extrait méthanolique | 20.5% |
| Extrait aqueux | 20.3% |

Les meilleurs rendements sont obtenus avec les solvants les plus polaires à savoir l'eau et le méthanol, alors que le rendement faible a été obtenu avec l'héxane qui est un solvant apolaire. On a constaté que le rendement est meilleur

lorsqu'on utilise les solvants polaires et ceci quel que soit le type d'extraction (macération ou extraction continue).

3. Résultats du screening phytochimique

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des fleurs de *C.arvensis* a permis de mettre en évidence la présence de quelques familles chimiques représentées dans le **tableau 13** :

Tableau 13. Résultats du screening phytochimique

| Métabolites Secondaires | Anthocyane | Flavonoïdes | Tanins | Saponines | Alcaloïdes | Stéroïdes et Terpènes |
|---|------------|-------------|--------|-----------|------------|-----------------------|
| Résultats des fleurs du <i>C.arvensis</i> | +++ | ++ | ++ | + | - | - |

+Indique la présence de constituants et -indiquer l'absence de constituants

Les résultats du screening phytochimique réalisé sur les fleurs de *C.arvensis* présentés dans le **(Tableau 13)** montrent que la présence des anthocyanes est plus marquée que les autres métabolites.

L'étude complète du screening phytochimique met en évidence la présence d'autres composés chimiques qui possèdent des activités biologiques intéressantes, notamment des substances polyphénoliques (Flavonoïdes, Tanins et Saponines). La nature des principes constituants chimiques mise en évidence par le criblage phytochimique laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes des plantes étudiées. Il s'agit essentiellement :

- **Des anthraquinones** appartenant à la famille chimique des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ils sont dotés d'un pouvoir thérapeutique avéré pour soigner les troubles fonctionnels intestinaux comme la colopathie fonctionnelle, la laxophobie, la constipation etc.
- **Des flavonoïdes** souvent présentés comme anti-inflammatoire, anti-allergique, hépatoprotecteur, antispasmodique, hypocholestérolémiant, diurétique, antibactérien, antiviraux in vitro (**Bruneton, 2009**).
- **Des tanins** : les applications des drogues à tanins sont assez restreintes et découlent de leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie externe, elles imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un

effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. Par voie interne, ils exercent un effet antidiarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique – antibactérien et antifongique – clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhée infectieuses, dermatites) (Bruneton., 2009) ;

- **Des saponosides** : sont habituellement hémolytiques. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. Il est également assez fréquent que ces molécules aient une très forte activité spermicide, logiquement corrélée avec l'activité hémolytique. *In vivo*, bon nombre de saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique. Quasiment dépourvus d'activité antibactérienne, les saponosides sont parfois actifs, *in vitro*, sur des virus (Bruneton., 2009).

4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes

Les différents extraits bruts, obtenus par extraction ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en polyphénols et flavonoïdes. En se basant sur les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extraits, le contenu des polyphénols totaux des extraits de la plante étudiée a été déterminé en utilisant la méthode de Folin Ciocalteu et exprimé en équivalents d'acide gallique (GAE) en milligrammes par gramme d'extrait.

Le tableau 14 montre de grandes variations dans la teneur en polyphénols totaux des extraits étudiés. Les espèces de *Calendula* sont une source riche de composés phénoliques (Pizza C et al., 1987) et les différences de TPC entre les extraits aqueux et méthanoliques ont montré ces résultats.

Il est très intéressant de mentionner que nos données étaient plus élevées que celles obtenues par Tawaha et al (Tawaha et al., 2007 et Ercetin et al. 2012). Cela pourrait être dû aux différences résultant des effets géographiques et environnementaux ou des méthodes d'extraction et d'évaluation. En outre, la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium a été utilisée pour déterminer le contenu total des flavonoïdes (tableau 14).

La teneur en flavonoïdes a été déterminée comme l'équivalent de la rutine à

partir de la courbe d'étalonnage des solutions standard de rutine et exprimée en équivalent de rutine (mg ER / g d'extrait).

Les quantités des teneurs en flavonoïdes étaient de **174,93 ± 5,21 et 74,93 ± 1,50 mg** d'extrait de ER/g pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux respectivement et les quantités des teneurs en polyphénols totaux étaient de **50.26 ± 0.18 et 47.89 ± 2.34 mg** d'extrait de EAG/g pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux respectivement.

Tableau 14. Teneurs en polyphénols (mg EAG/g) et en flavonoïdes totaux (mg ER/g)

| Extraits | PC ^W | FC ^Y |
|----------|---------------------------------|----------------------------------|
| EH | n.d | n.d |
| EA | 47.89 ± 2.34^a | 74.93 ± 1.50^a |
| EM | 50.26 ± 0.18^b | 174.93 ± 5.21^b |

PC : Contenu phénolique; FC: teneur en flavonoïdes; EM : Extrait Méthanolique; EH : Extrait N-Hexanique ;
EA: Extrait Aqueux.

N.d: non déterminé. Les données sont indiquées comme significatif (n = 3) ± erreur standard. Les valeurs dans la même colonne ne partageant pas une lettre commune différent considérablement à P < 0,05. ^wmg EGA/g dw. ^ymg RE/g dw.

5. Caractérisation des composés phénoliques par Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-DAD-MS)

La vaste gamme de polarité des composés phénoliques nécessite souvent de travailler en gradient d'élution pour éviter les co-élutions et pour éluer l'ensemble des composés. L'ordre d'élution de ces molécules étant aussi déterminé par la nature et le gradient des solvants utilisés. Nos analyses ont été effectuées sur les extraits aqueux et méthanolique des fleurs de *C.arvensis*.

En se basant sur l'importance des activités biologiques, l'identification chromatographique n'a été effectuée que sur les fractions les plus actives.

Le profil chromatographique des extraits méthanolique et aqueux des fleurs de *C.arvensis* est représenté au niveau des **Figures 20 et 21**.

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le **tableau 15**.

Les résultats des extraits aqueux et méthanolique sont comme suit : acide caféique (9297.79, 22906.91 µg/ mg Ms), Rutine (8332.37, 10012.63 µg/ mg Ms), acide

chlorogénique (**2043.61, 13671.62 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$**), acide vanillique (**194.72, 856.24 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$**) respectivement, On remarque l'absence de pyrocatechol dans l'extrait méthanolique par contre l'acide caféique est le plus représentatif.

D'après ces résultats on aperçoit que, l'extrait méthanolique est plus riche en composés phénoliques.

Tableau 15. Caractérisation chromatographique des composés phénoliques

| Molécule | TR | Mm | Extrait aqueux $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ | Extrait méthanolique $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ |
|-----------------------|------|-----|---|---|
| Acide gallique | 0.79 | 170 | 232.78 \pm 12.43 | 181.34 \pm 9.89 |
| Catéchine | 1.51 | 290 | 2.65 \pm 0.21 | 0.43 \pm 0.05 |
| Rutine | 2.99 | 610 | 8332.37 \pm | 10012.63 \pm |
| Acide chlorogénique | 1.47 | 354 | 2043.61 \pm 121.22 | 13671.62 \pm 201.22 |
| Acide Vanillique | 1.9 | 168 | 194.72 \pm 10.55 | 856.24 \pm 36.44 |
| Acide caféique | 1.83 | 180 | 9297.79 \pm 189.33 | 22906.91 \pm 309.22 |
| Quercétine | 5.57 | 302 | 69.48 \pm 6.77 | 11.297 \pm 2.33 |
| Acide Synergique | 2 | 198 | 127.15 \pm 8.66 | 106.39 \pm 11.34 |
| Acide phydrobenzoïque | 1.59 | 138 | 100.02 \pm 14.33 | 130.02 \pm 12.89 |
| Acide Rosmarique | 4.32 | 360 | 11.32 \pm 0.56 | 35.53 \pm 3.44 |
| Acide Sinapique | 3.31 | 224 | 15.40 \pm 0.76 | 3.67 \pm 0.09 |
| Epicatchine | 2.42 | 290 | 26.83 \pm 1.22 | 6.414 \pm 0.12 |
| Acide coumarique | 2.61 | 164 | 12.43 \pm 1.02 | 14.11 \pm 0.16 |
| Acide salicylique | 4.22 | 138 | 248.51 \pm 21.23 | 217.53 \pm 34.56 |
| Resvératrol | 5.12 | 228 | 1.75 \pm 0.07 | 4.59 \pm 0.11 |
| Pyrocatechol | 1.79 | 110 | 27.59 \pm 1.32 | Nd |
| Pyrogallol | 1.07 | 126 | 45.71 \pm 4.75 | 219.43 \pm 19.88 |
| Acide férulique | 3.3 | 194 | 24.39 \pm 1.90 | 5.48 \pm 0.16 |

TR : Temps de rétention Mm : Masse moléculaire

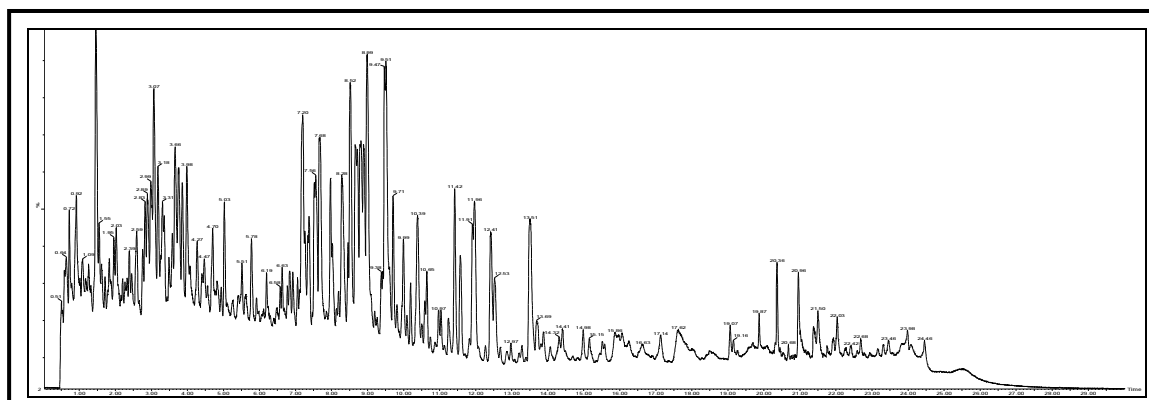


Figure 20 .Chromatogramme du contenu phénolique de l'extrait méthanolique.

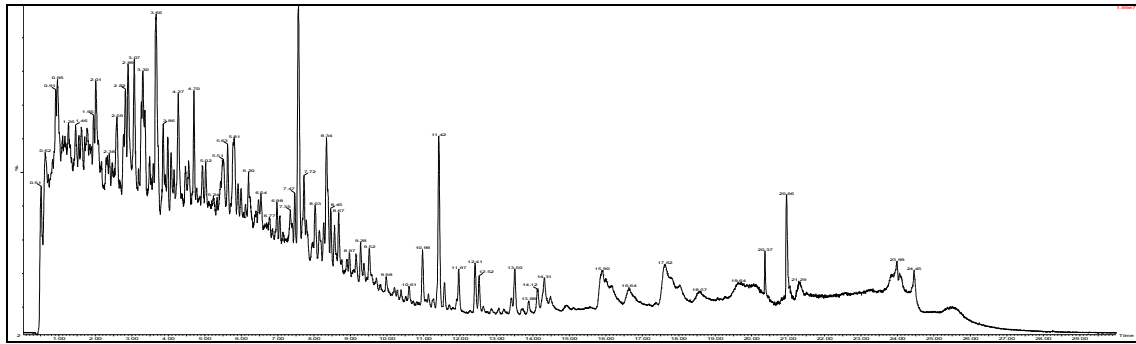


Figure 21 .Chromatogramme du contenu phénolique de l'extrait aqueux.

ACTIVITES BIOLOGIQUES

**ACTIVITES
ANTIOXYDANTE,
ANTIFONGIQUE,
ANTIBACTERIENNE
ET CYTOTOXIQUE**

6. Résultats des activités biologiques

6.1. Evaluation du potentiel antioxydant

A travers nos recherches bibliographiques et compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est basé sur l'utilisation de quatre tests chimiques. Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques. Dans ce qui suit, on présente les résultats du potentiel antioxydant des extraits bruts sélectionnés pour cette étude.

6.1.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI %), on a établi les profils d'activité antiradicalaire présentés dans la **figure 22**, et c'est à partir de ces profils qu'on a déduit la valeur correspondante à la CI₅₀ (la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres).

Tableau 16. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

| Extraits | DPPH ^Z |
|----------|------------------------------|
| EH | n.d |
| EA | 33.2±2.12^b |
| EM | 20.9±5.34^a |

CI₅₀ Exprimé en µg / ml.

Le profil de l'activité antiradicalaire obtenu révèle que les extraits testés possèdent une activité dose-dépendante. La présence d'une phase stationnaire signifie une réduction presque totale du radical DPPH• en sa forme non radicalaire DPPH-H.

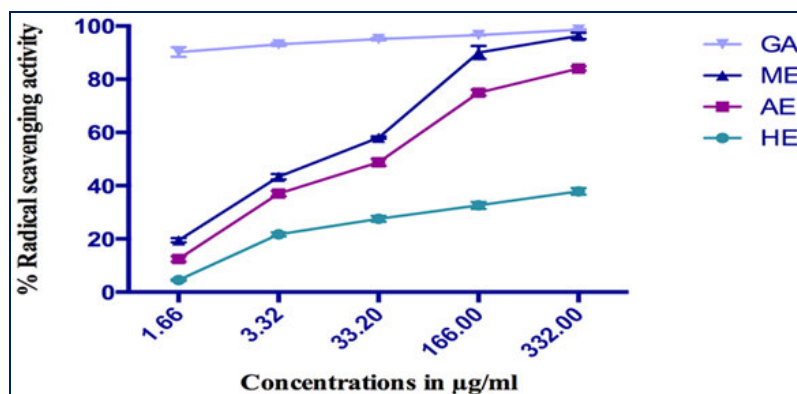


Figure 22 .Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

L'extrait méthanolique présente un pouvoir réducteur plus important que les autres extraits. Sa concentration est de 332.00 µg/mL.

En 2012, l'équipe de **Tugba Ercetina et al Tugba (Ercetina T et al, 2012)** a réalisé des travaux sur les extraits des feuilles et fleurs de *C. arvensis* et *C. officinalis* et elle a montré que les extraits de méthanol et d'acétate d'éthyle de fleurs de *C. arvensis* avait la plus forte activité de piégeage des radicaux DPPH•.

6.1.2 .Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits par ce test a révélé une différence significative attribuée au solvant d'extraction, et pour confirmer ce résultat,

Le pouvoir réducteur des extraits a été évalué à l'aide d'une activité de réduction de fer selon la méthode **d'Oyaizu (Oyaizu, M.1986)** qui sert à mesurer la capacité de réduction de ces extraits. Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir d'indicateur important de son potentiel d'activité antioxydante (**figure 23**). L'activité antioxydante de *C.arvensis* déterminée par la méthode FRAP, Des différences importantes ont été démontrées par les fleurs de *C.arvensis* dans l'ordre suivant **EM>EA> EH**.

La capacité de réduction de *C.arvensis* la plus puissante est celle trouvée par l'EM (**203.96 ± 1.92 mg EAA/g**). Ces résultats sont tout à fait semblables aux résultats obtenus par le test DPPH•. Cette ressemblance est due certainement au mécanisme des réactions mises en Jeu (transfert d'électrons).

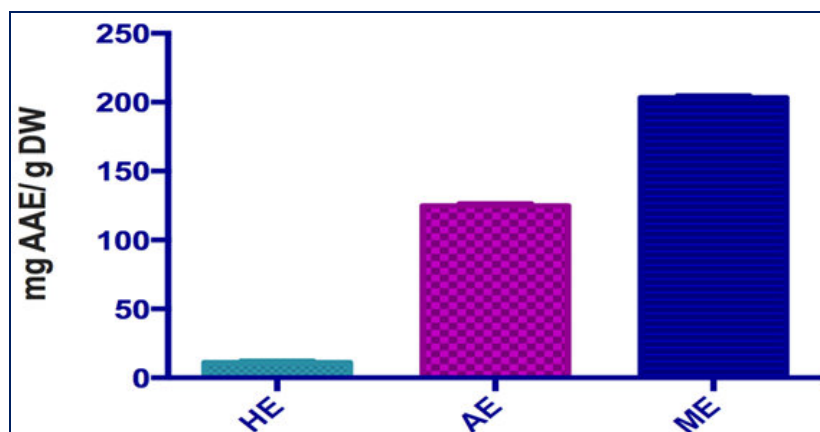


Figure 23 .Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP).

6.1.3. Test TEAC

L'activité antioxydante des différents extraits est déduite de leur capacité à inhiber le radical $ABTS^{\bullet+}$, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La **figure 24**. Illustre l'histogramme représentatif de l'activité antioxydante des extraits par le test ABTS.

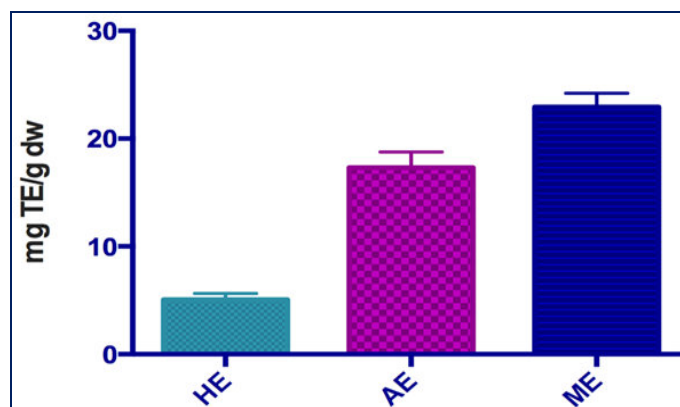


Figure 24 . Pouvoir antioxydant des extraits des fleurs du *C. arvensis* en utilisant le test ABTS

L'activité antioxydante du *c.arvensis* du Maroc évaluée par les deux tests antioxydants in vitro, le test DPPH et le test TEAC, évaluant la capacité d'élimination des radicaux H, ont développés des résultats similaires, ce qui a été démontrée dans de nombreuses études ([Ercetin T et al., 2012](#)). Selon une étude réalisée en Serbie et Monte-Negro, les extraits obtenus de *C.arvensis* et *C. officinalis* ont montrées un fort pouvoir anti-radicalaire ([C'etkovic et al., 2004](#)), Les IC_{50} enregistré dans notre étude était plus moins importantes que celles des études antérieures faite par Ercetin ([Ercetin T et al., 2012](#)).

6.1.4. Inhibition du blanchiment de β -carotène

Le test d'activité de blanchiment de bêta-carotène a également été utilisé pour démontrer les propriétés antioxydantes des extraits de *C.arvensis*. Il était important d'évaluer les extraits de *C.arvensis* dans un système d'émulsion de β -carotène- acide linoléique contrairement au système radicalaire peu représentative du milieu vivant (Gülçin I. 2012). Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux libres dérivés de l'hydroperoxyde qui attaque les onze paires de doubles liaisons de la β -carotène, entraînant un blanchiment de la réaction d'émulsion. Un extrait capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation du β -carotène peut être décrite comme un éliminateur de radicaux libres et un antioxydant primaire (Marmouzi I et al ., 2015). L'inhibition de l'activité de blanchiment de la β -carotène des extraits de *C.arvensis* est représentée sur la Figure 25. Tous les extraits de fleurs de *C.arvensis* ont inhibé le blanchiment du β -carotène en éliminant les radicaux libres dérivés du linoleate.

L'extrait méthanolique inhibe la β -carotène avec un taux comparable au BHT.

Les différences dans le dosage de blanchiment de β -carotène reflètent clairement la teneur en dérivés phénoliques comme indiqué dans la Figure 25.

Selon Liyana-Pathirana (Liyana-Pathirana et al., 2006), un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

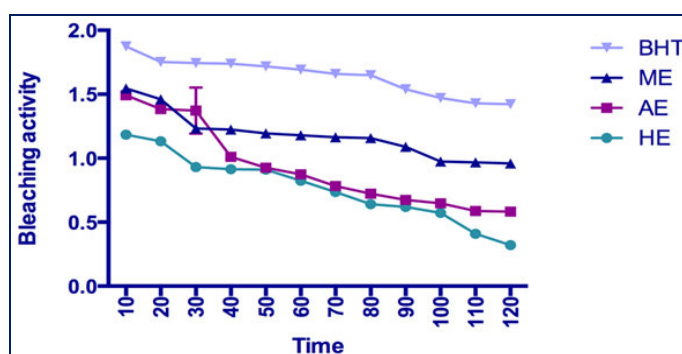


Figure 25 .Pouvoir de l'activité inhibitrice (test de blanchiment de β -carotène) des extraits de *C .arvensis*.

* Models
MYCMED-655; No. of Pages 8

ARTICLE IN PRESS

Journal de Mycologie Médicale (2016) xxx, xxx–xxx



ELSEVIER

Available online at

ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com



ORIGINAL ARTICLE/ARTICLE ORIGINAL

Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers

Activité anti-candidose, antibactérienne, cytotoxique et antioxydante des fleurs de *Calendula arvensis*

A.-M. Abudunia^{a,b}, I. Marmouzi^{c,*}, M.E.A. Faouzi^c,
Y. Ramli^b, J. Taoufik^b, N. El Madani^d, E.M. Essassi^e, A. Salama^a,
K. Khedid^f, M. Ansar^b, A. Ibrahimi^{a,*}

^a Department of Biotechnology Laboratory (Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, Rabat, Morocco

^b Department of Medicinal Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, Rabat, Morocco

^c Laboratoire de pharmacologie et toxicologie, équipe de pharmacocinétique, University Mohammed V in Rabat, faculté de médecine et pharmacie, Rabat Instituts, BP 6203, Rabat, Morocco

^d Laboratoire de chimie des plantes et de synthèse organique et bioorganique, faculté des sciences, université Mohammed V, BP 1014, Rabat, Morocco

^e Department of Heterocyclic Organic Chemistry Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco

^f Department of Bacteriology, Institute National of Health (INH), P.O. Box 769, 27, avenue Ibn-Batouta-Agdal, Rabat, Morocco

Received 15 July 2016; received in revised form 29 October 2016; accepted 20 November 2016

KEYWORDS

Calendula arvensis;
Chemical
characterization;
Candida;
Cytotoxic

Summary *Calendula arvensis* (CA) is one of the important plants used in traditional medicine in Morocco, due to its interesting chemical composition. The present study aimed to determine the anticandidal, antioxidant and antibacterial activities, and the effects of extracts of CA flowers on the growth of myeloid cancer cells. Also, to characterize the chemical composition of the plant. Flowers of CA were collected based on ethnopharmacological information from the villages around the region Rabat-Khemisset, Morocco. The hexane and methanol extracts were

* Corresponding authors.

E-mail address: ilias.marmouzi@gmail.com (I. Marmouzi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.11.002>

1156-5233/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Abudunia A-M, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. Journal De Mycologie Médicale (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.11.002>

obtained by soxhlet extraction, while aqueous extracts was obtained by maceration in cold water. *CA* extracts were assessed for antioxidant activity using four different methods (DPPH, FRAP, TEAC, β -carotene bleaching test). Furthermore, the phenolic and flavonoid contents were measured, also the antimicrobial activity has been evaluated by the well diffusion method using several bacterial and fungal strains. Finally, extracts cytotoxicity was assessed using MTT test. Phytochemical quantification of the methanolic and aqueous extracts revealed that they were rich with flavonoid and phenolic content and were found to possess considerable antioxidant activities. MIC values of methanolic extracts were 12.5–25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. While MIC values of hexanolic extracts were between 6.25–12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and were bacteriostatic for all bacteria while methanolic and aqueous extracts were bactericidal. In addition, the extracts exhibited no activity on *Candida* species except the methanolic extract, which showed antifungal activity on *Candida tropicalis 1* and *Candida famata 1*. The methanolic and aqueous extracts also exhibited antimyeloid cancer activity (IC_{50} of 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In our study, we conclude that the methanolic and aqueous extracts were a promising source of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic agents. © 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

MOTS CLÉS

Calendula arvensis ;
Caractérisation
chimique ;
Candida ;
Cytotoxique

Résumé *Calendula arvensis* (*CA*) est très connue en tant que thérapie traditionnelle au Maroc. La présente étude vise à déterminer l'effet anticandidosé, antioxydant, antimicrobienne et les effets des extraits de fleurs de *CA* sur la croissance des cellules cancéreuses myéloïdes. Aussi, à faire une caractérisation phytochimique de la plante. Les fleurs de *CA* ont été recueillies sur la base des informations ethnopharmacologique des villages autour de la région de Rabat-Khemisset au Maroc. L'extrait de l'hexane et du méthanol ont été obtenus par soxhlet, tandis que les extraits aqueux ont été obtenus par macération froide. Ces extraits ont été évalués pour l'activité antioxydante en utilisant quatre méthodes différentes (DPPH, FRAP, TEAC, test de blanchiment β -carotène). Par ailleurs, la teneur en produits phénoliques et flavonoïdes ont été mesurées, aussi l'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion de puits utilisant plusieurs champignons et bactéries. Finalement, la cytotoxicité a été évaluée en utilisant le test MTT. Le dosage phytochimique, la teneur riches en flavonoïdes et phénoliques contribuant aux activités antioxydantes. Les valeurs CMI de l'extrait méthanoliques étaient 12,5–25 mg/mL. Alors que la CMI de l'extrait hexanique étaient entre 6,25–12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en étant bactériostatique pour toutes les bactéries tandis que les extraits méthanoliques et aqueux étaient bactéricide. En outre, les extraits présentaient aucune activité sur les espèces de *Candida* à l'exception de l'extrait méthanolique, qui a montré une activité antifongique sur *Candida tropicalis 1* et *Candida famata 1*. En plus, les extraits aqueux et méthanolique ont montré également une activité sur le cancer antimyeloïde (CI_{50} de 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dans notre étude, nous concluons que les extraits méthanoliques et aqueux sont une source prometteuse d'antioxydants, d'agents antimicrobiens et cytotoxiques. © 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

The World Health Organization (WHO) has catalogued 20,000 plant species studied for medicinal purposes [1]. Natural products from plants include phenolic compounds that could delay or inhibit the inception of infectious diseases [2]. Literature surveys show that plant-based drugs play a promising role in the treatment of infectious diseases [3]. Efficacy and safety of plant extracts against some several pathogens is also well-documented [4]. The use of plant derived natural compounds as part of herbal preparations and alternative sources of drugs continues to play major roles in the general wellness of people all over the world. The search for new antioxidant, antimicrobial and anticancer agents are becoming an important objective for scientists.

Calendula arvensis (*CA*) is an interesting medicinal plant, known as "Aljemrah" in Morocco; *CA* is abundant, spring, annual, weeds and is doubtfully native. It is found as gregarious in open places, wastelands, roadside, and

graveyard and field margins [1]. *CA* is traditionally used as food dye, spice and tea as well as tincture, ointment or cosmetic cream [5]. Numerous investigations have proved that extracts of the aerial parts of *CA* are rich in sesquiterpene glycosides (based on their alloaromadendrane, eudesmane and cubebane skeletons) [6]. Also, some triterpenoid saponins (e.g., *arvensoside A* and *B*) were isolated [7]. Furthermore, phytochemical studies [8,9] have shown that *CA* contains various families of compounds such as phenolic acids and flavonoids. In this study, we have explored the anticandidal and cytotoxic effect of the *Calendula Arvensis* flowers, to explore its proclaimed antibacterial and anticancer properties in traditional medicine.

The objectives of this study were:

- to investigate antioxidant activities using different tests;
- to quantify the phenolic and flavonoid contents present in *CA* flowers;

Please cite this article in press as: Abudunia A-M, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. Journal De Mycologie Médicale (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.11.002>

- to estimate the antimicrobial capacities against human pathogen strains;
- to evaluate the cytotoxic potential on acute myeloid leukemia cells.

Materials and methods

Sample collection and authentication

Flowers of *CA* were collected based on ethnopharmacological information from the villages around the region of Rabat-Khemisset, with the agreement from the authorities and respecting the United Nations Convention of Biodiversity and with assistance of traditional medical practitioner. The plant material was authenticated by Pr. M. Fanan (botanist from Institute Scientific in Rabat) and a voucher specimen (N°RAB 78161) was deposited in the herbarium of the botany department.

Samples preparation and extraction

For the aqueous extract (AE), *CA* flowers powder (200 g) was extracted with boiling water (500 mL) for 30 min. The infusion was filtered and then freeze-dried (aqueous extract) [10].

For the organic extracts (OE), hexanolic and methanolic extracts were obtained by soxhlet extraction of 200 g of *CA* flowers for 6 h in about 500 mL of solvents. Then, the filtrated extracts were evaporated in vacuo until dryness using rotator evaporator. This extracts were concentrated to dryness and the residue was kept at 4 °C [10].

Phytochemical screening of the extracts

The amount of total phenolic contents was determined according to Folin–Ciocalteu method as described by Lister and Wilson [11]. The standard curve of gallic acid is obtained under the same conditions as above. The total phenolic content was measured as gallic acid equivalents (mg GAE/g edw). The total flavonoids in the extracts were determined using a colorimetric method by Zhishen and Mengcheng. (1999) [12]. The absorbance was recorded against a blank at 510 nm. The flavonoid content was determined as the rutin equivalent from the calibration curve of rutins.

Antioxidant activity

The free radical scavenging activity of the extracts was measured by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) as described by Huang and Ke [13] with some modifications. Briefly, 0.2 mm solution of DPPH in methanol was prepared and 0.5 mL of this solution was added to 2.5 mL of plant extract and was allowed to stand at room temperature for 30 min, and then absorbance was read at 517 nm against blank samples. Lower absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity. The radical-scavenging activity (RSA) was calculated as a percentage of DPPH discoloration. Using the equation:

$$\% \text{ RSA} = [(A_D - A_E) / A_D] * 100''$$

where A_D is the absorbance value of the DPPH blank sample and A_E is the absorbance value of the test solution. A_E was evaluated as the difference between the absorbance value of the test solution and the absorbance value of its blank.

The ferric ions (Fe³⁺) reducing antioxidant power (FRAP) method [14] was used to measure the reducing capacity of oat extracts with a slight modification, which involves the presence of extracts to reduce the ferricyanide complex to the ferrous form. The absorbance was measured at 700 nm at the reaction time of 30 min. The reducing power of the extracts was represented as ascorbic acid equivalent (mg AAE/g edw).

The Trolox equivalent of antioxidant capacity (TEAC) was used. The assay is based on the inhibition of the absorbance of the radical cation 2,2'-azino bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS⁺) solution when it is exposed to an antioxidant as described by Re et al. [15]. The ABTS⁺ cation radical was produced by the reaction between 10 mL of 2 mM ABTS in H₂O and 100 µL of 70 mM potassium persulphate, stored in the dark at room temperature for 24 h. The ABTS⁺ solution was then diluted with methanol to obtain an absorbance of 0.70 at $k = 734 \text{ nm}$ and equilibrated at 30 °C. Samples were prepared in triplicate by diluting 50 µL of extracts in 2 mL of the ABTS⁺ solution diluted with methanol and let to react for 1 min. Absorbances were recorded at 734 nm. The antioxidant activities samples were expressed as TEAC values, defined as the concentration of standard Trolox with the same antioxidant capacity of the extract under investigation.

The antioxidant activity of the extracts was also evaluated using a β -carotene-linoleic acid (linoleate) model system [16] with slight modifications. The method works in an aqueous emulsion of linoleic acid and β C, which is discolored by the radicals generated by the spontaneous oxidation of the fatty acids [17] and spectrophotometrically followed at 470 nm.

Antimicrobial activity screening

For the screening, the hexane and methanol extracts were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) solvent. As a precaution not to miss trace amount of antimicrobial agent for preliminary screening, a relatively high concentration (200 mg/mL) of each extract were prepared for the bioassay.

The extracts of *CA* flowers were individually tested against seven bacteria strains and six species of *Candida* spp. including: *Salmonella blockley*, *Salmonella aequatoria*, *Salmonella braenderup*, *E. coli* enteropathogenes, *E. coli*, *E. coli* ATCC, *E. coli* MDR and 6 species of *Candida* spp. (2 *Candida tropicalis*, 2 *Candida famata* and 2 *Candida glabrata*). These strains were obtained from three different sources; the American Type Culture Collection (ATCC, USA), Bacteriology Lab of the Institute National of Health (INH, Morocco) and Institute of Agronomy and Veterinary (IAV, Morocco). All media used were manufactured by Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England). All bacteria and fungi were stored in BHI (brain and heart infusion broth) containing 30% (v/v) glycerol (Sigma-Aldrich) at -20 °C. Prior to use bacterial strains were first grown in Muller Hinton agar (MHA) at 37 °C for 24 h.

Please cite this article in press as: Abudunia A-M, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. Journal De Mycologie Médicale (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.11.002>

Mueller-Hinton agar (MHA) and Sabouraud Dextrose agar (SDA) (Hi-Media, Bombay, India) were respectively used for bacteria and yeasts growth. Microbial cultures, freshly grown at 37/30 °C were appropriately diluted in sterile normal saline solution to obtain the cell suspension at 10⁵ CFU/mL. To evaluate antimicrobial activity, an agar well diffusion method was used as described by Nongpanga and Aporn [18], the organisms were spread on MH and SD agar plates by cotton swab. Wells of 6 mm diameter were punched into the agar medium and filled with 50 µL/mL of plants extracts. The plates were incubated for 24 h at 37 °C for bacteria and 48 h at 30 °C for yeast. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition zone diameter against the test organism.

Determination of the minimum inhibitory concentration (MICs)

MICs are defined as the lowest concentration of CA extracts that will inhibit the visible growth of a microorganism after overnight incubation, the determination of MICs of extracts of CA flowers against the target test microorganisms was performed by microtitration technique as recommended by CLSI guidelines. The 0.5 McFarland suspension of bacterial strain from 24 h culture in Muller Hinton agar was appropriate diluted in saline water solution (0.85% w/v) to obtain the final inoculums to 10⁵ cfu/mL.

Determination of the minimum bactericidal concentration (MBCs)

MBCs are defined as the lowest concentration of CA extracts that will prevent the growth of an organism after subculture on to antibiotic-free media, minimum bactericidal concentration was carried out by subculturing 50 µL aliquots from each well. Least concentration of extract showing no visible growth on subculturing was taken as MBCs value.

Cytotoxicity effect

Cancer cells of myeloid cell lines were procured by the National Centre for Cell Sciences, Fes, Morocco. Culture medium MEC (minimum essential communications) was purchased from Biopharma Society, Morocco. Antibiotics and FBS (fetal bovine serum). Cells were grown in nutrient mixture F-12, 82.5% supplemented with 2.5% FBS, 0.2% sodium bicarbonate, antibiotic and antimycotic solution. The cells were grown in the following conditions: 5% CO₂, 95% atmosphere in high humidity at 37 °C in a CO₂ incubator.

Mitochondrial activity by MTT assay

Cells (1 × 10⁶/well) were seeded in poly-L-lysine precoated 96 well tissue culture plates and allowed to adhere for 48 h in CO₂ incubator at 37 °C. The medium was replaced with the serum free medium containing different concentrations of CA extracts (10–100 mg/mL) separately again for 48 h in CO₂ incubator at 37 °C. Tetrazolium bromide salt solution (10 µL/well) was added in cell suspension (100 µL), four hours prior to completion of incubation period. Periodically viewing the cells under an inverted microscope for the presence of

intracellular punctuates purple precipitate, dimethyl sulfoxide (200 µL) added to each well by pipetting up and down several times unless the contents get homogenized. Plate was placed in the dark for four hours at room temperature. The plates were kept on rocker shaker for 10 min at room temperature and then read at 550 nm using Multiwell microplate reader (Synergy HT, Biotech, USA). The average values were determined from triplicate readings and subtract from the average values of the blank. Percent of inhibition was calculated by using the formula:

$$\text{Percent of inhibition} = (C - T)/C \times 100$$

where C = absorbance of control, T = absorbance of treatment.

Results and discussion

Phytochemical content

Total phenolic contents of the plant extracts were determined by using the Folin Ciocalteu method and expressed as Gallic acid equivalents (GAE) in milligrams per gram of extract. Table 1 shows large variations in the total phenolic content of the investigated extracts. CA. *Catendula* species are a rich source of phenolic compounds [9] and TPC differences between aqueous and methanolic extracts (Table 1) supported those results. It is very interesting to mention that our data were higher than those obtained by Tawaha et al. [19] and Ercetin et al. [20]. This might be due to the differences resulted from geographic and environmental effect or extraction and evaluation methods. Furthermore, aluminum chloride colorimetric method was used to determine the total flavonoid contents (Table 1). The flavonoid content was determined as the rutin equivalent from the calibration curve of rutin standard solutions and expressed as rutin equivalent (mg RE/g extract dw). The amounts of total flavonoid contents were 174.93 ± 5.21 and 74.93 ± 1.50 mg RE/g extract dw for methanolic extract and aqueous extract respectively.

Antioxidants properties

In order to estimate the in vitro antioxidant scavenging activities of CA extracts, the DPPH free radical scavenging assay was used. Fig. 1 shows the percentage of scavenging

Table 1 Phenolic, flavonoid contents and radical scavenging activity of extracts from CA flowers.
Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et activité antiradiculaire des fleurs des extraits de CA.

| Extracts | PC ^W | FC ^Y | DPPH ^Z |
|----------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| HE | n.d | n.d | n.d |
| AE | 47.89 ± 2.34 ^a | 74.93 ± 1.50 ^a | 33.2 ± 2.12 ^b |
| ME | 50.26 ± 0.18 ^b | 174.93 ± 5.21 ^b | 20.9 ± 5.34 ^a |

PC: phenolic content; FC: flavonoid content; ME: methanolic extract; HE: hexane extract; AE: aqueous extract; n.d: not determined. Data are reported to mean (n = 3) ± standard error. Values in the same column not sharing a common letter differ significantly at P < 0.05. ^Wmg GAE/g dw. ^Ymg RE/g dw. ^ZEC₅₀ expressed in µg/mL.

Please cite this article in press as: Abudunia A-M, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Catendula arvensis* flowers. Journal De Mycologie Médicale (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.11.002>

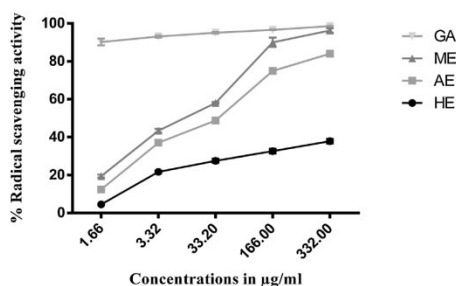


Figure 1 Radical scavenging activity of CA Flowers extracts. GA (gallic acid), ME (methanolic extract), AE (aqueous extract), HE (hexanolic extract). No significant differences have been registered between methanolic extract (ME) and the reference gallic acid (GA) at a concentration of 332 µg/mL. *Activité antiradicalaire des fleurs des extraits de CA.*

activity of CA methanolic extract, aqueous extract and hexanolic extract on free radicals of DPPH. The radical scavenging effects of different concentrations of methanol, water and hexane extracts of CA and Gallic acid (GA) are demonstrated. The antioxidant activities of the extracts were compared with GA, which is a synthetic antioxidant. Both water and methanol extracts had radical scavenging effects. However, this effect was not as great as the radical scavenging effect of GA. The radical scavenging effect of the methanol extract appeared to be closer to that of GA at 332 µg/mL. The magnitude of the radical scavenging effect at all concentrations was ranked as GA > ME > AE > HE with EC₅₀ of 20.9 ± 5.34 and 33.2 ± 2.12 µg/mL for methanolic and aqueous extracts respectively (Table 1). Results from ABTS assay (Fig. 3) were comparable to DPPH activity. Radical scavenging activity has been demonstrated before in numerous studies [20,21]. Manifestly, the extracts obtained from CA and *C. officinalis* growing in Serbia and Montenegro scavenged all radicals in concentration dependant manner [21]. EC₅₀ registered in our assay was lower and with potent antioxidant activities compared to previous studies by Ercetin et al. [20].

To confirm this result the reducing power of the extracts were assessed using ferric to ferrous reduction activity by Oyaizu's method [14] which is used to measure the reducing capacity of these extracts. The reducing power of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity. The antioxidant activity of the CA polar and a polar extracts, determined by the FRAP method are shown in Fig. 2. Significant differences were shown by CA flowers in the following order ME > AE > HE. The reducing ability of CA was most potent among the three extract in methanol solvent (203.96 ± 1.92 mg AAE/g Ext).

The beta-carotene bleaching activity test was also used to demonstrate the antioxidants properties of CA extracts. It was important to assess CA extracts in a β-carotene–linoleic acid system: water emulsion assay since free radical scavenging models don't use a food or biologically relevant, oxidisable substrate [22]. In this test, oxidation of linoleic acid produces hydroperoxide-derived free radicals that

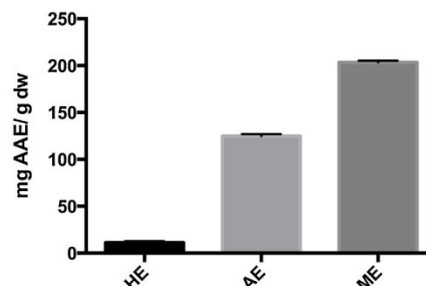


Figure 2 Ferric reducing antioxidant power of CA Flowers extracts. GA (gallic acid), ME (methanolic extract), AE (aqueous extract), HE (hexanolic extract). Data are reported to mean (n = 3) ± standard error. The results are expressed in mg ascorbic Acid equivalent/g dry weight (mg AAE/g dw). *Pouvoir réducteur de fer des extraits de fleurs de CA.*

attack the eleven pairs of β-carotene double bonds, resulting in a bleaching of the reaction emulsion. An extract capable of retarding or inhibiting the oxidation β-carotene may be described as a free radical scavenger and primary antioxidant [16]. Inhibition of β-carotene bleaching activity of CA extracts is exposed in Fig. 4. As it is shown in Fig. 4, all of the flowers extracts inhibited the bleaching of β-carotene by scavenging linoleate-derived free radicals methanolic extract inhibit β-carotene with a comparable rate to BHT. Differences in β-carotene bleaching assay reflect clearly the phenolic content as shown in Table 1.

Antimicrobial activity

To demonstrate the antimicrobial activity of CA extract, *Candida species*, *E. coli species* and *Salmonella species* were used. Table 2 indicates that all extracts of CA flowers show

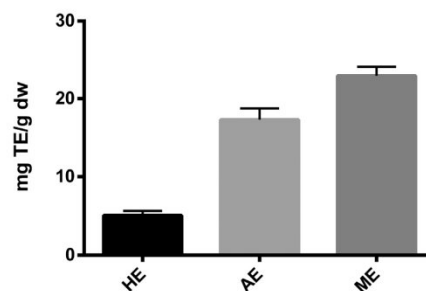


Figure 3 Trolox equivalent antioxidant capacity of CA Flowers extracts using ABTS. ME (methanolic extract), AE (aqueous extract), HE (hexanolic extract). Data are reported to mean (n = 3) ± standard error. The results are expressed in mg Trolox equivalent/g dry weight (mg TE/g dw). *Capacité antioxydante équivalente de Trolox des extraits de fleurs de CA utilisant l'ABTS.*

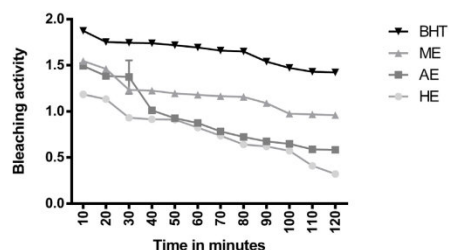


Figure 4 Beta-carotene bleaching activity of CA flowers extracts. ME (methanolic extract), AE (aqueous extract), HE (hexanolic extract). Bleaching activity of CA extracts is presented by the emulsion absorbance.

Blanchiment du beta-carotene par les extraits des fleurs de CA.

Table 2 Antifungal and antibacterial activities of different extracts from CA Flowers.

Activité antifongique et antibactérienne des extraits de fleurs de CA.

| | ME | HE | AE |
|---------------------------------|-----|-----|-----|
| <i>Candida tropicalis 1</i> | 14 | n.d | n.d |
| <i>Candida tropicalis 2</i> | n.d | n.d | n.d |
| <i>Candida famata 1</i> | 20 | n.d | n.d |
| <i>Candida famata 2</i> | n.d | n.d | n.d |
| <i>Candida glabrata 1</i> | n.d | n.d | n.d |
| <i>Candida glabrata 2</i> | n.d | n.d | n.d |
| <i>Salmonella blockley</i> | n.d | n.d | n.d |
| <i>Salmonella aequatoria</i> | 14 | 12 | 14 |
| <i>Salmonella braenderup</i> | 8 | n.d | n.d |
| <i>E. coli enteropathogenes</i> | n.d | n.d | n.d |
| <i>E. coli ATCC</i> | 14 | 8 | 12 |
| <i>E. coli</i> | 15 | n.d | n.d |
| <i>E. coli MDR</i> | n.d | n.d | n.d |

n.d: not determined.

inhibitory activity against *Salmonella aequatoria* and *E. coli ATCC*. Moreover, methanolic extract inhibited *E. coli ATCC*, *E. coli* and *Salmonella braenderup*. Additionally, there were no inhibitory effects of extracts against *Salmonella blockley*, *E. coli enteropathogenes* and *E. coli MDR* (Table 2). However, no effect of CA extracts was observed on fungi species except methanolic extracts which showed moderate activity against two strains tested namely *Candida tropicalis 1* and *Candida famata 1* with inhibition zones (IZ) of 14 and 20 mm

Table 3 Determination of MIC₅ and MBC₅ of the CA flowers extracts.

Determination des CMI et CMB des extraits de fleurs de CA.

| Strains | Methanolic | | | Hexanolic | | | Aqueous | | |
|------------------------------|------------|------|----|-----------|------|----|---------|------|----|
| | MIC | MBC | AA | MIC | MBC | AA | MIC | MBC | AA |
| <i>Salmonella aequatoria</i> | 12.5 | 12.5 | + | 6.25 | 6.25 | - | 12.5 | 12.5 | + |
| <i>Salmonella braenderup</i> | 12.5 | 12.5 | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>E. coli ATCC</i> | 12.5 | 12.5 | + | 6.25 | 6.25 | - | 12.5 | 12.5 | + |
| <i>E. coli</i> | 25 | 25 | + | 12.5 | 12.5 | - | 25 | 25 | + |

(+): bactericidal; (-): bacteriostatic; AA: antibacterial activity.

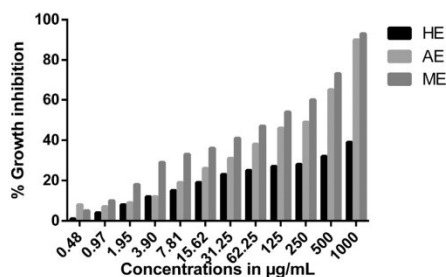


Figure 5 Cytotoxic activities of CA flowers extracts on acute myeloid cancer cells.

Activités cytotoxique des extraits de fleurs de CA sur les cellules de cancer myéloïde.

respectively. The phenolic compounds and flavonoids found in CA could be responsible for its antimicrobial activity against *Salmonella aequatoria*, *E. coli ATCC*, *Candida tropicalis 1* and *Candida famata 1*. Similarly, the aqueous-methanolic extracts from *C. officinalis* also showed antimicrobial activity against tested germs [23]. Following these results, we could conclude that aqueous-methanolic flower extract from CA has very interesting antibacterial and antifungal activities against the tested microorganisms. MIC values of methanolic and aqueous extracts were between 12.5–25 µg/mL and were bactericidal for all bacteria. While MICs of values of hexanolic extracts were between 6.25–12.5 µg/mL and were bacteriostatic for all bacteria (Table 3) confirming our previously published results [4].

Cytotoxic activity

To test the potential anticancer properties of CA extracts, human cancer of myeloid cells were used for cytotoxicity assays. Cells were treated with twelve increasing concentrations (2–0.00093 mg/mL) for 48 h by MTT bioassay. Percent inhibition of methanolic and aqueous extracts of the CA flowers were calculated for cancer cells of myeloid cell and presented in subsequent (Fig. 5). A perusal indicates the presence of noticeable percent inhibition of methanolic and aqueous extracts against cancer cells of myeloid cell.

MTT bioassay which provides a real picture of percent inhibition of herbal extract was used for the present study. Percent inhibition resulting MTT bioassay demonstrated that methanolic and aqueous extracts are the efficient

candidates as cytotoxic bioagent (antimyeloid cancer activity). The percent inhibition for these extracts showed more pronounced efficacy compared to hexanolic extract. It was also inferred that comparatively methanolic extract is more significant antimyeloid cancer agent, showing maximum 89% inhibition at the concentration 100 mg/mL at 24 h ($P < 0.05$). Attempts were also made to present our findings in graphical forms highlighting the significant cytotoxicity of both extracts against myeloid cell line. Methanolic and aqueous extracts of the CA flowers being potent, therefore, was further studied for its percent inhibition as a function of time (24–96 h) and dose (20–100 mg/mL). This study is in accordance with previous reports [24] describing the isolation of flavonoids from different parts of *A. nervosa*, *A. corniculatum*, *C. pulcherrima*, *C. viscosum*, *D. indica*, *D. peregrina*, *G. luteoalbum*, *G. oppositifolius*, *J. sambac*, *L. coromendatica* and *M. nagi* [24]. It is likely that these constituents are also associated with the anticancer activity observed in this study [25–27].

The trend of the caused anticancer activity showed that 48 h is the optimum time for significant effect. On the basis of the observed encouraging cytotoxic effect by the in vitro bioassays, it can be revealed that methanolic and aqueous extracts of CA (flowers) have promising antimyeloid cancer bioefficacy and must have some chemical moiety in the flowers part of this plant which are responsible for the observed beneficial effect. We suggest that detailed in vivo studies should be carried out to elucidate the mechanism.

Screening of phytochemicals for anticancer activity is extremely important in today's context as a variety of tumors are getting resistant to conventional anticancer drugs. Structural elucidation of bioactive principle of methanolic and aqueous fraction of CA is to be worked. Phytoconstituents such as polyphenols, flavonoids and catechins have long been recognized as having potential anticancer, anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial properties and efforts on the above lines are in progress in the Lab.

Conclusion

Our study demonstrates that antioxidant and cytotoxic activities were observed for methanol and aqueous CA flowers extracts, which might be correlated to its leading phenolic and flavonoid contents as compared to its hexanolic counterparts. All extracts of CA flowers show an inhibitory activity against most bacteria and fungi species. In fact, we were able to demonstrate the cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of methanol and aqueous extracts. Future work is underway to isolate bioactive constituents of CA flowers extract to determine potential pharmacological agents.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgments

We would like to thank Pr M. Fanan (botanist from Institute Scientific [IS] in Rabat) for the botanical identification and collection of the plants used in this study. This work was

carried out under intramural funding from the University Mohammed V in Rabat.

References

- [1] Gulluce M, Aslan A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Pamelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nyländeriana*. *Phytomedicine* 2006;13:515–21.
- [2] Robards K, Prenzlara PD. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* 1999;66:401–36.
- [3] Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol* 2001;74:113–23.
- [4] Abudunia AM, Ansar M. Evaluation of antibacterial activity of extracts from *Calendula arvensis* flowers. *J CPR* 2014;6:156–61.
- [5] De Clavijo R. The reproductive strategies of the heterocarpic annual *Calendula arvensis* (Asteraceae). *Acta Ocol* 2005;28:119–26.
- [6] Paolini J, Barboni T. Chemical composition, intraspecific variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. *Biochem Syst Ecol* 2010;38:865–74.
- [7] Tommasi D, Pizzi C. Structure and in vitro antiviral activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *J Nat Prod* 1990;53:830–5.
- [8] Chemli R, Babadjamian A. Structure of Arvensoside A and B, two new triterpenoids glycosides from *Calendula arvensis* L. *Phytochemistry* 1987;26:1785–8.
- [9] Pizzi C, Tommasi D. A new sesquiterpene glycoside from *Calendula arvensis* L. *J Nat Prod* 1987;50:784–7.
- [10] Harbone JB. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. New York: Halsted press, John Wiley and Sons Inc; 1976: 1–26.
- [11] Lister E, Wilson P. Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity (personal communication). Lincoln, New Zealand: Crop Research Institute; 2001.
- [12] Zhishen J, Mengcheng T. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999;64:555–9.
- [13] Huang B, Ke H. Extracts of *Halenia elliptica* exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 2011;49:185–90.
- [14] Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr* 1986;44:307–15.
- [15] Re R, Pellegrini N, Proteggente A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 1999;26:1231–7.
- [16] Marmouzi I, El Madani N, Charrouf Z, Cherrah Y, Faouzi MEA. Proximate analysis, fatty acids and mineral composition of processed Moroccan *Chenopodium quinoa* Willd and antioxidant properties according to the polarity. *Phytotherapie* 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-015-0931-5>.
- [17] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agril Food Chem* 2008;53:1841–56.
- [18] Nongpanga K, Aporn W. Screening and identification of lactic acid bacteria producing antimicrobial compound from pig gastrointestinal tracts. *Kmitl Sci Tech* 2008;8:1.
- [19] Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohamma M, El-Elmatc T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem* 2007;104:1372–8.
- [20] Erceetin T, Senol FS, Orhan IE, Tokerb G. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis*. *Ind Crop Prod* 2012;203–8.
- [21] Cetković GS, Djilas SM, Čanadanović-Brunet JM, Tumba VT. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Res Int* 2004;37:643–50.

Please cite this article in press as: Abudunia A-M, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *Journal De Mycologie Médicale* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.11.002>

+ Models

MYCMED-655; No. of Pages 8

ARTICLE IN PRESS

8

A.-M. Abudunia et al.

- [22] Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 2012;86:345–91.
- [23] Rigane G, Ben Younes S, Ghazghazi H, Ben Salem R. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *J Int Food Res* 2013;20:3001–7.
- [24] Akter R, Uddin SJ. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *J Nat Med* 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-013-0789-5>.
- [25] Pawar CR, Mutha RE. Antioxidant and cytotoxic activities of *Caesalpinia pulcherrima* wood Indian. *J Biochem Biophys* 2009;46:198–200.
- [26] Uddin SJ, Grice ID, Tiralongo E. Cytotoxic effects of Bangladeshi medicinal plant extracts. *ECAM* 2011;1–7. <http://dx.doi.org/10.1093/ECAM/nep111>.
- [27] Meo AA, Khan MA. Palynological observations on the genus *Calendula* (Calenduleae-compositae) from Pakistan. *Pak J Bot* 2006;38:511–20.

Please cite this article in press as: Abudunia A-M, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *Journal De Mycologie Médicale* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.11.002>

ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

6.2. Potentiel antimicrobien

La thérapeutique des infections bactériennes est basée principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (**Billing et Sherman., 1998**).

La médecine traditionnelle par les plantes jusqu'à aujourd'hui continue d'être utilisée par une grande partie de la population dans la plupart des pays en développement. Si ces utilisations sont justifiées par des effets validés, les plantes pourraient être des sources de biomolécules actives exploitables.

6.2.1. Résultat de l'évaluation de l'activité anti bactériennes

Dans le **tableau 17**, on présente les travaux sur l'activité antimicrobienne des extraits des fleurs de *C.arvensis*. L'examen des zones d'inhibition de croissance des bactéries a montré que l'extrait N-héxanique de *C.arvensis* présente une activité antibactérienne sur les souches gram positive testées, avec un taux d'inhibition de 57% et sur les souches gram négative, avec un taux d'inhibition de 40%.

De même, l'extrait méthanolique a montré une activité sur les souches gram positive testées, avec un taux d'inhibition de 72% et sur les grams négatifs avec un taux d'inhibition de 60 %. L'extrait aqueux n'a montré d'activité que sur 3 bactéries testées à savoir *Rhodococcuss equi* (Gram+), *Salmonella aequatoria* et *Morganella morganii* (Gram-). Ainsi l'extrait méthalonique présente les meilleurs résultats (**tableau 17**).

Tableau 17. Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits de *C.arvensis*

| Groupes bactériens | Les souches bactériennes testées | Diamètre en mm de la zone d'inhibition des extraits de <i>C.arvensis</i> | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|-----------|-------------|
| | | EH | EM | EA |
| Gram + | <i>Rhodococcus equi</i> | 18 | 22 | 12 |
| | <i>Staphylococcus aureus SARM</i> | 0 | 10 | 0 |
| | <i>Staphylococcus aureus MLD</i> | 10 | 8 | 0 |
| | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 0 | 10 | 0 |
| | <i>Entéococcus faecalis</i> | 10 | 15 | 0 |
| | <i>Listeria spp</i> | 8 | 0 | 0 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 0 | 0 | 0 |
| Le taux d'inhibition % | | 57 | 72 | 14 |
| Le diamètre moyen | | 11.5 | 13 | 12 |
| Gram - | <i>Pseudomonas aeruginosa 1</i> | 0 | 8 | 0 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa 2</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 0 | 8 | 0 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa ATCC</i> | 10 | 15 | 0 |
| | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Salmonella blockley</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Salmonella aequatoria</i> | 12 | 14 | 14 |
| | <i>Salmonella braenderup</i> | 0 | 8 | 0 |
| | <i>Proteus rettgeri MDR</i> | 0 | 14 | 0 |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 15 | 0 | 0 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 20 | 22 | 16 |
| | <i>E coli enteropathogenes</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Escherichia coli 1</i> | 12 | 14 | 0 |
| | <i>Escherichia coli 2</i> | 10 | 15 | 0 |
| <i>Escherichia coli MDR</i> | 0 | 0 | 0 | |
| Le taux d'inhibition % | | 40 | 60 | 13 |
| Le taux total d'inhibition % | | 45 | 64 | 13.6 |
| Le diamètre moyen | | 13 | 13 | - |

Ca = *C.arvensis*, EH = Extrait N-N-héxanique, EM = Extrait Méthanoilque, EA = Extrait Aqueux.

Figure 26. Quelques photos des zones d'inhibition des extraits relatives aux souches sensibles.

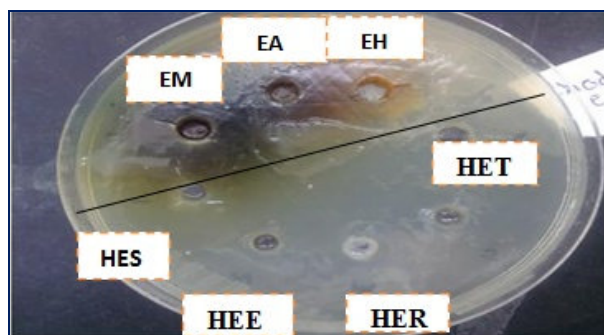


Photo 1. Activité antibactérienne des extraits de *C.arvensis* et des HE des PAM par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur *Rhodococcus equi*.

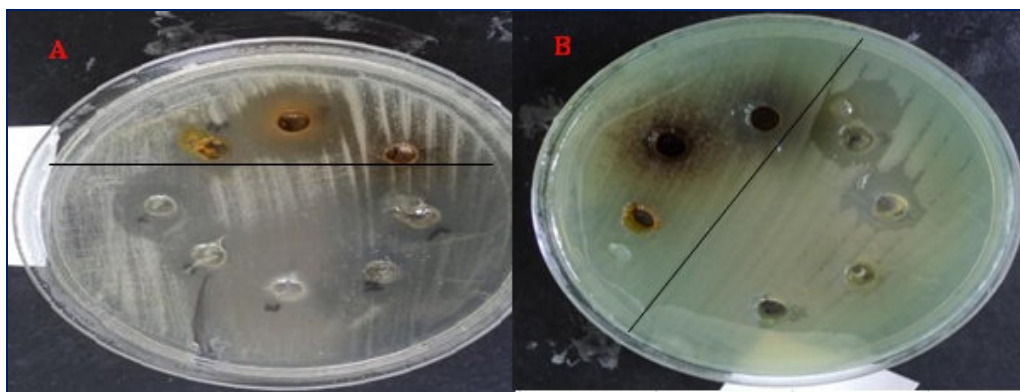


Photo 2 A. Activité antibactérienne des extraits de *C.arvensis* et des HE des PAM par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur *Entérocooccus faecalis* .

Photo 3 B: Activité antibactérienne des extraits de *C.arvensis* et des HE des PAM par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur *Listeria monocytogenes*.

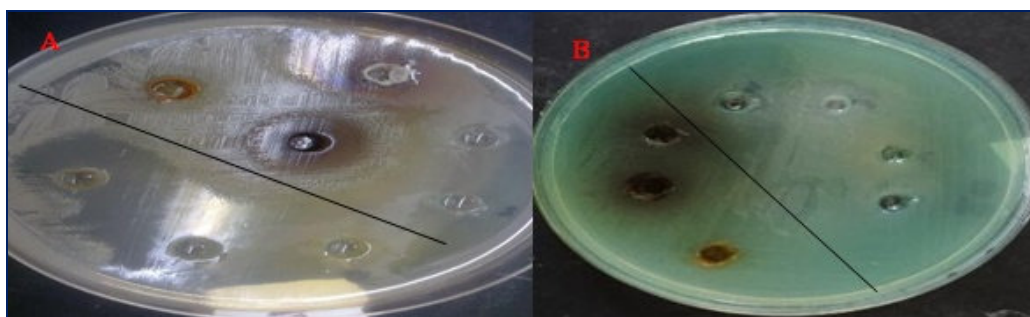


Photo 4 A: Activité antibactérienne des extraits de *C.arvensis* et des HE des PAM par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur *Morganella morganii* ;

Photo 5 B: Activité antibactérienne des extraits de *C.arvensis* et des HE des PAM par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur *Pseudomonas aeruginosa* 1. milieu gélosé sur *Acinetobacter baumani*.

6.2.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des extraits de *C.arvensis*.

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB) permet non seulement de confirmer, quantifier et comparer les activités, mais aussi de caractériser la nature de l'effet révélé par un extrait sur un micro-organisme donné. Les résultats obtenus avec les extraits méthanolique et N-hexanique sont présentés dans les **tableaux 18 et 19**.

a. Effet de l'extrait méthanolique

La CMI obtenue varie de 12.5 à 25 mg/ml pour les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif. Toutefois la CMB montre que l'extrait méthanolique est bactéricide sur 50% des souches bactériennes et bactériostatique sur l'autre moitié des souches testées ; en revanche il est plus bactériostatique sur les bactéries Gram positif (**tableau 18**).

Tableau 18. Détermination de la CMI et de la CMB de l'extrait méthanolique

| Groupes bactériens | Souches bactériennes testées. | CMI mg/ml | CMB mg/ml |
|--------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|
| Gram + | <i>Rhodococcus equi</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> MDR | 12.5 | - |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> SARM | 25 | - |
| | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 25 | - |
| Gram - | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1 | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 25 | 25 |
| | <i>Salmonella braenderup</i> | 12.5 | - |
| | <i>Proteus rettgeri</i> MDR | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 25 | - |
| | <i>Escherichia coli</i> 1 | 12.5 | - |
| | <i>Escherichia coli</i> 2 | 12.5 | 12.5 |

CMI = Concentration minimale inhibitrice, CMB = Concentration minimale bactéricide. (-) = CMB non déterminée car l'extrait méthanolique n'a pas montré un effet bactéricide.

b. Effet del'extrait N-héxanique

La CMI obtenue varie de 6.25 à 12.5 mg/ml pour les bactéries gram négatif et les bactéries gram positif. Toutefois la CMB indique dans l'ensemble que l'extrait N-héxanique est totalement bactéricide sur les souches bactériennes gram positif et les souches gram négatif sauf *Staphylococcus aureus* MDR, où il est bactériostatique (**tableau 19**).

Tableau 19. Détermination de CMI et de CMB de l'extrait N-héxanique

| Groupes bactériens | Les souches bactériennes testées | CMI mg/ml | CMB mg/ml |
|--------------------|----------------------------------|-------------|-------------|
| Gram + | <i>Rhodococcus equi</i> | 6.25 | 6.25 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> MDR | 6.25 | - |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Listeria spp</i> | 12.5 | 12.5 |
| Gram - | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2 | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Salmonella aequatoria</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Escherichia coli</i> 1 | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Escherichia coli</i> 2 | 6.25 | 6.25 |

CMI = Concentration minimale inhibitrice, CMB = Concentration minimale bactéricide, (-) CMB non déterminée.

6.2.3. Résultat de l'évaluation de l'activité antifongique

L'étude des diamètres de la zone d'inhibition a révélé que les extraits organiques présentent une activité antifongique, par contre, les extraits aqueux n'ont aucune activité antifongique. Par ailleurs l'extrait méthanolique donne des résultats plus satisfaisant que l'extrait N-héxanique qui s'est montré inactif, sauf sur la souche *Candida glabrata* 2 (**tableau 20**).

Tableau 20. Evaluation de l'activité antifongique des extraits

| Groupes | Les souches fongiques testées | Diamètre d'inhibition (mm) | | |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------|----------|
| | | EH | EM | EA |
| <i>Candida spp</i> | | | | |
| 1 | <i>Candida tropicalis</i> 1 | 0 | 14 | 0 |
| 2 | <i>Candida tropicalis</i> 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | <i>Candida famata</i> 1 | 0 | 20 | 0 |
| 4 | <i>Candida famata</i> 2 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | <i>Candida glabrata</i> 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | <i>Candida glabrata</i> 2 | 8 | 0 | 0 |
| Le taux d'inhibition % | | 16 | 33 | 0 |

Ca = *Calendula arvensis*, EH = Extrait N-héxanique, EM= Extrait méthanolique, EA= Extrait Aqueux

Discussion des résultats

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de nos extraits, on a utilisé la méthode de diffusion en puits. Les extraits de *C.arvensis* ont montré un effet antibactérien sur les souches bactériennes testées. Les résultats de cette étude ont révélé que les extraits, méthanolique et N-héxanique des fleurs de *C.arvensis* ont des taux d'inhibition très important que l'extrait aqueux et qui sont successivement de 64 et 45% (**Tableau 17**) avec un diamètre d'inhibition moyen de 13 mm pour l'extrait méthanolique. Ces extraits organiques sont plus actifs que l'extrait aqueux qui a possédé un effet notable sur *Rhodococcuss equi*, *Salmonella aequatoria* et *Morganella morganii*. L'analyse des souches sensibles aux extraits organiques (Extrait méthanolique et N-héxanique de *C.arvensis*) montre respectivement que 72 et 57 % des souches sensibles à ces extraits appartiennent au groupe des bactéries gram+ et 64 et 45 % des souches sont de groupe des bactéries gram-. (**Tableau 17**)

Dans la littérature on trouve que les bactéries gram- sont plus résistantes que les bactéries Gram+ ([Cowan, M.M., 1999](#)).

La résistance des bactéries gram- est le résultat de la structure complexe de leur couche externe qui agit comme une barrière à la pénétration de différents agents antimicrobiens.

Le fait que 64 et 45 % des souches sensibles aux extraits organiques de *C.arvensis* sont des gram-, montre que ces extraits ont le pouvoir de dépasser la couche externe complexe des gram- pour inhiber leur croissance.

Les extraits organiques de *C.arvensis* sont actifs sur *Salmonella braenderup*, *Salmonella aegutoria*, Ces deux souches bactériennes sont connues par leur implication dans les toxi- infections alimentaires et les infections gastro-intestinales caractérisées par des syndromes diarrhéiques. Ceci justifie l'utilisation de *C.arvensis* dans la médecine traditionnelle marocaine pour le traitement de diarrhée.

Les marocains dans la médecine traditionnelle font recours à *C.arvensis* pour traiter les infections urinaires, et on a trouvé au cours de cette étude que tous les extraits organiques de cette plante présentent une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* SARM et *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *porteuse mirabilis* qui sont très impliqués dans ce genre d'infection. Finalement, tous les extraits organiques de *C.arvensis* sont actifs sur *Staphylococcus aureus* MDR et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Rhodococcus equi*, *Enterococcus faecalis* quatre souches bactériennes multi résistantes aux antibiotiques et responsables des infections nosocomiales qui sont considérés actuellement comme un problème majeur de santé publique. L'absence de pouvoir antibactérien des extraits aqueux de *C.arvensis* pourrait s'expliquer par les faibles quantités de principes actifs. L'activité antibactérienne de l'extraits aqueux de *C.arvensis* est très faible comparée à celle des extraits organiques.

Ces résultats sont en accord avec la littérature où on trouve généralement que l'activité antibactérienne la plus faible est associée aux extraits aqueux.

Des résultats similaires sont été obtenus lors d'une étude portant sur les extraits de dichlorométhane, de méthanol et un extrait aqueux de 30 plantes médicinales de Yémen ([AlFatimi Mohamed., 2007](#)),

Le méthanol et l'eau sont des solvants polaires pouvant extraire la matière végétale tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, hétérosides, tanins, sels, oses et

acides aminés, avec presque le même rendement d'extraction.

L'hexane est un solvant apolaire, cette caractéristique lui confère la propriété d'extraire: les quinones, caroténoïde, stérols, acides gras, hydrocarbure **(Snyderl, Kirkl.j., 1979)**.

Les effets observés avec les extraits de *C.arvensis* pourraient être dus aux flavonoïdes, qui en plus de leurs vertus spasmolytique, anti-inflammatoire et anthelminthique, possèdent une activité antimicrobienne. Les flavonoïdes, qui seraient présents dans les extraits de *C.arvensis* pourraient être la cause de son efficacité comme substances antimicrobienne. Cette propriété serait due à une inhibition des enzymes bactériennes, du fait de la réaction d'addition avec leur groupement thiol ou amine **(Abdalla.s., 1988)**.

Les caroténoïdes, sont des molécules à pouvoir fongicide. On a pu mettre en évidence leur action antifongique contre les dermatophytes et *Candida albicans* ainsi qu'une action antibactérienne contre certaines bactéries gram+ et gram- **(Abdalla.s., 1988)**.

Selon les valeurs obtenues des CMI et CMB, l'extrait méthanolique qui est à moitié bactéricide possède une CMI de 25 mg /ml pour la plupart des souches ; avec l'extrait N-héxanique on obtient 12.5 mg/ml, cet extrait est plus bactéricide. L'extrait N-héxanique est plus inhibiteur que l'extrait méthanolique. Dans notre travail on a mis en évidence l'effet antibactérien et l'effet antifongique notable des extraits méthanolique, N-héxanique et aqueux des fleurs de *C.arvensis*. Des résultats identiques aux nôtres ont été obtenus sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgari* **(Hamdi pacha., 1993)**. Des résultats similaires ont été obtenus par *Stayeh* et ses collaborateurs, 1998, l'inhibition bactérienne a été évaluée à 90% **(Ali stayeh., 1998)**. Une action fongicide a été détectée sur 3 souches parmi 6 souches de *candida spp*, avec une meilleure action d'EM ; Cependant il n'existe presque pas de travaux effectués sur *C.arvensis* pour qu'on puisse faire une comparaison concluante de ces résultats, Il convient de noter que les extraits organiques ont plus d'activité antibactérienne qu'antifongique.

Available online www.jocpr.com

Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2014, 6(8):156-161



Research Article

ISSN : 0975-7384
CODEN(USA) : JCPRC5

Evaluation of antibacterial activity of extracts from *Calendula arvensis* flowers

Abdul-Malik Abudunia^{1,2,4}, M'Hammed Ansar², Jamal Taoufik², Youssef Ramli³, El Mokhtar Essassi³, Azeddine Ibrahim¹ and Khadija Khedid⁴

¹Biotechnology Laboratory (Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University-Souissi, Rabat, Morocco

²Department of Medicinal Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University-Rabat, Morocco

³Department of Heterocyclic Organic Chemistry Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V University-Agdal, Rabat, Morocco

⁴Department of Bacteriology, National Institute of Health (INH), Avenue, Ibn Batouta -Agdal, Rabat, Morocco

ABSTRACT

Calendula arvensis (C.A.) is one of the herbs used in traditional medicine in Morocco, Due to its essential oil it is recognized by its smell and warmth characteristic. This work aims to evaluate the antibacterial activity of C.A. flower extracts. Hexanolic and methanolic extracts were obtained by the method of Soxhlet, while aqueous extract was obtained by maceration in cold water. Antibacterial activity screening was conducted by the well diffusion method according to the clinical and laboratory standard institute guidelines using 6 Gram positive and 7 Gram negative bacteria (sensitive and multidrug-resistant). The results indicated that, the methanolic extracts of C.A. flowers generally showed high inhibitory activity against Gram-positive and Gram negative bacteria except *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis* and *Listeria monocytogenes*. The C.A. flowers hexanolic extract inhibited all bacteria of Gram-positive and Gram negative bacteria except, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococcus agalactiae* and *Acinetobacter baumannii*. There were no inhibitory effects of the aqueous extracts against all tested bacterial strains except *Rhodococcus equi* and *Morganella morganii*, MICs values of methanolic extracts were between 12.5-25 µg/ml, while MICs of values of hexanolic extracts were between 6.25-12.5 µg/ml. In conclusion, the obtained results show an antibacterial potency of organic extracts of C.A. flowers. C.A. flowers Hexanolic extracts were bactericidal for most bacteria while methanolic extracts were bacteriostatic.

Key words: *Calendula arvensis*, antibacterial activity, MICs, MBCs, medicinal plant.

INTRODUCTION

In Morocco, as elsewhere in the world, plants are widely used in the treatment of various diseases. The varied climate and heterogeneous ecologic condition in Morocco have favoured the proliferation of more than 42,000 species of plants, divided into 150 families and 940 genera [1]. Drugs derived from natural sources play a significant role in the prevention and treatment of human diseases. In many developing countries, traditional medicine is one of the primary healthcare systems [2,3]. Herbs are widely exploited in the traditional medicine and their curative potentials are well documented [4]. Therefore, in the traditional medicine prevention and treatments of several human diseases is successfully controlled by using aromatic medicinal plants. Recently, in pharmaceutical industry, about 61% of new drugs developed between 1981 and 2002 derived from natural sources and they have been very successful, especially in the areas of infectious disease and cancer [5]. Natural products of higher plants may give a new source of antimicrobial agents with possibly novel mechanisms of action [6,7]. The effects of plant extracts on bacteria have been studied by a very large number of researchers in different parts of the world [8]. Plants are rich in a wide variety of secondary metabolites such as tannins, terpenoids, alkaloids, flavonoids,

glycosides, etc., which have been found in vitro to have antimicrobial properties [9,10]. Herbal medicines have been known to man for centuries. Therapeutic efficacy of many indigenous plants for several disorders has been described by practitioners of traditional medicine [11]. Antimicrobial properties of medicinal plants are being increasingly reported from different parts of the world. The World Health Organization estimates that plant extracts or their active constituents are used as folk medicine in traditional therapies of 80% of the world's population [12]. The harmful microorganisms can be controlled with drugs and these results in the emergence of multiple drug-resistant bacteria and it has created alarming clinical situations in the treatment of infections. The pharmacological industries have produced a number of new antibiotics resistance to these drugs by microorganisms has increased. In general, bacteria have the genetic ability to transmit and acquire resistance to synthetic drugs which are utilized as therapeutic agents [13].

Calendula L. (Asteraceae), usually known as “marigold” , is a reputed medicinal plant with ornamental properties. The yellow or orange-colored flowers are used as food dye, spice, and tea as well as tincture, ointment or cosmetic cream. Although the genus *Calendula* is usually indigenous to the southern European region including Italy, Malta, Greece, Turkey, Portugal, and Spain [14], it is nowadays cultivated in many temperate regions of the world depending on its commercial value. Since *Calendula officinalis* is grown in northern parts of Africa, it is also named as “African marigold” [15]. *Calendula* is a relatively small genus (about 12–20 species native to the Macaronesian and Mediterranean regions are currently recognized) that belongs to the Asteraceae family (tribe: *Calendula*) [16]. *Calendula arvensis* C.A. the common name of which is field marigold, is an annual herbaceous species (10–100 cm tall) that is widespread in central and southern Europe, northern Africa, southwestern Asia and the Macaronesian region [17]. The leaves, which contain tector and secretory trichomes, are lance shaped. The inflorescence consists of a single flower head with yellow or orange capitula (blossoms are produced year round, but flowering peaks between March and July). From a taxonomic viewpoint, C.A. is a complex species because of polymorphism in the size of the stems (5–60 cm), width of the leaves (5–20 mm), color of the flowers (bright yellow to yellow-orange) and the size and shape of the three types of achene (rostrate, cymbiform and annular) [18]. Thus, various subspecies have been ascribed to C.A. in various Mediterranean areas [16]. Numerous investigations have proved that extracts of the aerial parts of C.A. are rich in sesquiterpene glycosides (based on their alloaromadendrane, eudesmane and cubebene skeletons) [19]. Furthermore, phytochemical studies have shown that C.A. contains various families of compounds such as the phenolic acids and the flavonoids. To our knowledge, no data are available on the chemical composition of essential oil obtained from C.A. Several investigations on the volatile constituents of *Calendula officinalis* (also known as the pot marigold) have been conducted in which volatiles were extracted by hydrodistillation [20]. *Calendula officinalis* oils are generally characterized by a high content of sesquiterpenes with cadinane or muurolane skeletons. It should be noted that this species is cultivated worldwide for ornamental and medicinal purposes. It is also used in the manufacture of cosmetics, perfumes and pharmaceuticals and in the food industry to add color or flavor. There is only one report on the chemical composition of the essential oils of other *Calendula* species, viz., a report on the essential oil composition of the flowers of *Calendula micrantha* plants in Egypt [21]. The main components were aromadendrene, α -gurjunene, α -pinene, benzyl formate, (E)- β -caryophyllene and guaial [22].

The aim of this study is to evaluate the antibacterial activity of C.A. flowers of methanolic extracts, hexanolic and aqueous extracts, and to, therefore, determine the scientific basis for its use in traditional medicine in the treatment of infection diseases. To the best of our knowledge, this is the first study to do so against a wide range of bacteria.

EXPERIMENTAL SECTION

Plant Materials: Flowers of *Calendula arvensis* were collected based on ethno pharmacological information from the villages around the region Rabat-Temara -Sidi El-Abed, during the month of March 2011 starting around 7 AM each morning. All agreements were obtained from the authorities with respect to the United Nations Convention of Biodiversity and with assistance of traditional medical practitioner. The plant was identified by botanist from the Moroccan Scientific Institute (Rabat). Voucher specimen (N°RAB 78161) was deposited at the Herbarium of the Botany Department at the same institution.

Preparation of the extracts : **Aqueous Extract (AE) :** The powdered of C.A. flowers extracts (200g) were extracted with boiling water (200 ml) for 30 min. The decoction was filtered and then freeze-dried (aqueous extract) [23].

Organic Extracts (OE) : Hexanolic extract (H.E.) and Methanolic extract (M.E.) were obtained by using the Soxhlet extraction of 200 g of C.A. flowers of C.A. in about 700 ml of solvents for 24 h. The filtrated solvents were evaporated in vacuo until dryness using rotator evaporator. These extracts were concentrated to dryness and the residues were kept at 4°C [23].

Antibacterial activity :

Preparation of test samples : The hexane and methanol extracts were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) solvent . As a precaution not to miss trace amount of antimicrobial agent for preliminary screening, a relatively high concentration of 200 mg/ ml of each fractions were prepared for bioassay.

Bacterial strains and culture conditions : The extracts of C.A flowers were individually tested against 6 Gram positive 7 Gram negative bacteria microorganisms including : *Rhodococcus equi* , *Staphylococcus aureus* MDRSA, *Staphylococcus aureus* MLSA, *Streptococcus agalactiae* , *Enterococcus faecalis* , *Listeria monocytogenes* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC and *Acinetobacter baumannii* , *Proteus reittereri* MDRPR, *Proteus mirabilis* , *Morganella morganii* . These strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), USA ; Bacteriology Laboratory of Institute National of Health (INH) and Institute of Agronomy and Veterinary medicine (IAV), Morocco. All media used in this study, were manufactured by Oxoid (Basingstoke,Hampshire,England). All bacteria were stored in BHI (Brain and Heart Infusion broth) containing 30 % (v/v) glycerol (Sigma-Aldrich) at -20°C. Prior to use bacterial strains were first grown in Muller Hinton agar (MHA) at 37°C for 24h. An aspartate aminotransferase (AST) of ciprofloxacin, Clindamycin and Gentamicin were also determined in parallel experiments in order to control the sensitivity of the Standard test organisms (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Antibacterial activity screening : The antibacterial activity of all extracts was evaluated by the agar well diffusion method according to clinical laboratory standards directives (CLSI, 2007). The cell suspension was adjusted with sterile saline solution to obtain turbidity comparable to that of a 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 cells mL⁻¹). Therefore, the microorganisms were spread on Muller Hinton agar by cotton swab. Wells of 6 mm diameter were punched into the agar medium and filled with 50 µl of plants extracts. The plates were incubated for 24 h at 37°C. Antibacterial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition against the test organism.

Minimum Inhibitory Concentration (MICs) : Are defined as the lowest concentration of C.A. extracts that will inhibit the visible growth of a microorganism after overnight incubation . The determination of MICs of extracts of C.A. flowers against the target test microorganisms was performed by microtitration technique as recommended by CLSI guidelines. The 0.5 McFarland suspension of bacterial strain from 24h culture in Muller Hinton agar, was appropriate diluted in saline water solution (0.85%w/v) to obtain the final inoculum to 10⁵ cfu/ml .

Minimum bactericidal Concentration (MBCs) : Are defined as the lowest concentration of C.A. extracts that will prevent the growth of an organism after subculture on to antibiotic-free media . Minimum bactericidal concentration was carried out by subculturing 50 µl aliquots from each well. Least concentration of extract showing no visible growth on subculturing was taken as MBC value.

RESULTS AND DISCUSSION

Extract yield : The yield from C.A. flowers obtained by N-Hexane , Methanol and distilled water were found to be respectively 10.2, 20.5 and 20.3/200g of dry flowers. The result of this experiment showed that the methanol and distilled water fraction, which are the most polar was obtained in the highest yield, while the hexane fraction has the least yield (see Table 1). This is an indication that the methanol and water distilled fraction contains more components compared to hexane fractions.

Table 1: Yields (w/w, %) of the C.A. flowers extracts

| Type of solvents | Extract yield (w/w, %) |
|------------------|------------------------|
| N-Hexane | 10.2 |
| Methanol | 20.5 |
| distilled water | 20.3 |

Antibacterial activity:

For the evaluation of antibacterial activity of extracts of C.A. flowers , we used the well diffusion method .

The results of this study showed that methanolic and the hexanolic extracts have rates of inhibition zone (IZ) very important compared to that of aqueous extracts (Table 11) . The greatest inhibition zone was obtained with methanolic and hexanolic extracts with means of inhibition zone are 14.8 mm and 12.5 mm, and The total rate of inhibition % is 77 and 68% respectively (Table 11). Furthermore, it can be seen from (Table 11) , Absence of antibacterial activity of aqueous extracts of C.A. could be explained by low quantity of active ingredients compared to that of the organic extracts. These results are in agreement with the literature which is generally found that the lowest antibacterial activity is associated with the aqueous extracts, Similar results were obtained during a

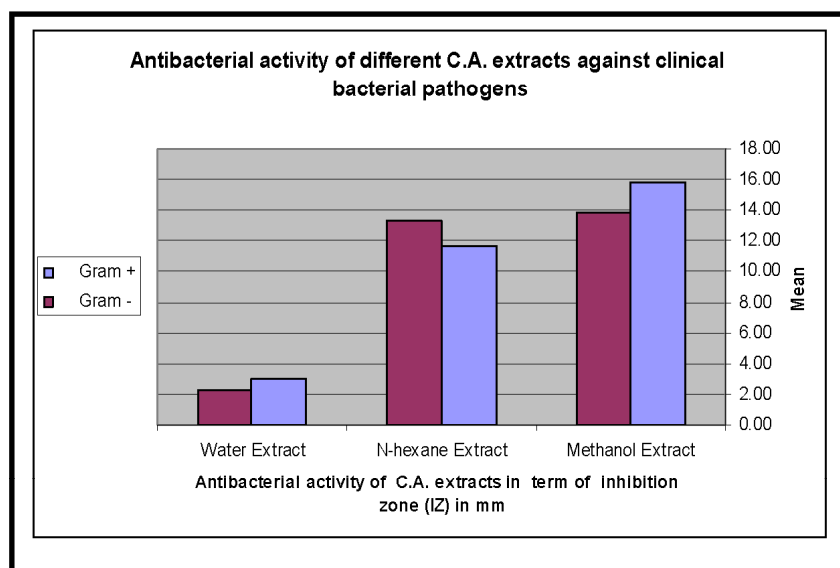
study on the extracts of dichloromethane, methanol and an aqueous extracts of 30 medicinal plants in Yemen [24].

Table II. Antibacterial activity of different C.A. extracts against clinical bacterial pathogens

| Groups of bacterial Strain | The bacterial Strain tested | Antibacterial activity of C.A. extracts in term of inhibition zone (IZ) in mm | | |
|----------------------------|--|---|------------------|---------------|
| | | Methanol Extract | N-hexane Extract | Water Extract |
| Gram + | <i>Rhodococcus equi</i> | 28 | 24 | 18 |
| | <i>Staphylococcus aureus MRSA</i> | 16 | 0 | 0 |
| | <i>Staphylococcus aureus MLDSA</i> | 14 | 16 | 0 |
| | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 16 | 0 | 0 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 21 | 16 | 0 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 0 | 14 | 0 |
| | The total of inhibition | 95 | 70 | 18 |
| | The means diameter of inhibition % | 15.8 | 11.7 | 3 |
| Gram - | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 14 | 8 | 0 |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 14 | 8 | 0 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa ATCC</i> | 21 | 16 | 0 |
| | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Proteus retgegeri MDRPR</i> | 20 | 14 | 0 |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 0 | 21 | 0 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 28 | 26 | 16 |
| | The total of inhibition | 97 | 93 | 16 |
| | The means diameter of inhibition % | 13.9 | 13.3 | 2.3 |
| Gram +, Gram - | The means total of diameter of inhibition % | 14.8 % | 12.5% | 2.6% |

IZ: Inhibition zone, MLDSA: Multi-drug resistance *S aureus*, MDRPR: Multi-drug resistance *Proteus retgegeri*, MRSA: Methicillin-resistance *S aureus*, ATCC : American type culture cell.

Figure I. Antibacterial activity of different C.A. extracts against clinical bacterial pathogens



Methanol and water are polar solvents capable of extracting the plant material such as alkaloids, flavonoids, glycosides, tannins, salts, sugars and amino acids, with nearly the same yield of extraction. while the hexane is a non polar solvent, this feature gives it the property of extract : quinones, carotenoids, sterols, fatty acids, hydrocarbon [25]. The effects observed with extracts of C.A. may be due to:

- Flavonoids , which in addition to their virtues spasmolytic , anti-inflammatory and anthelmintic, possess

Abdul-Malik Abudunia et al

J. Chem. Pharm. Res., 2014, 6(8):156-161

antimicrobial activity.

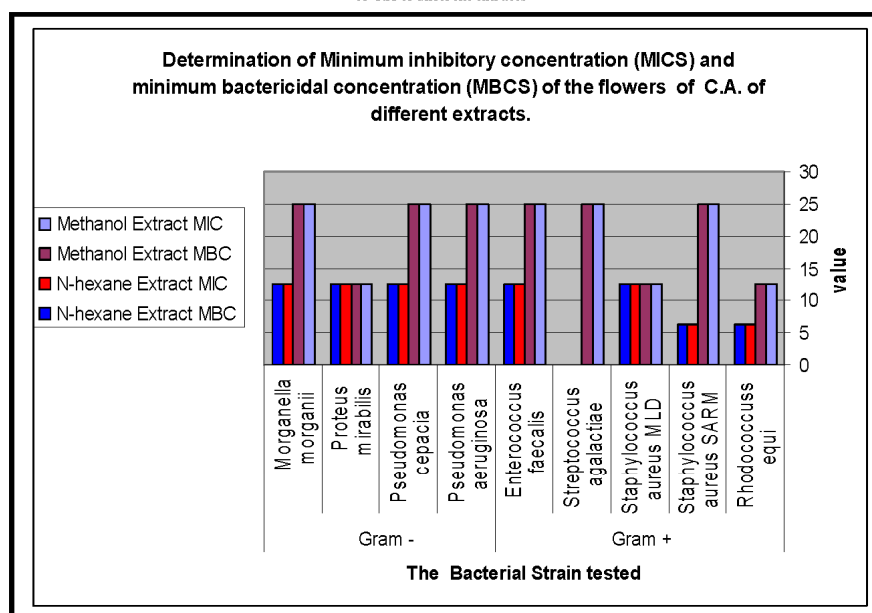
- Flavonoids, which are present in extracts of C.A. could be the cause of its effectiveness as antimicrobial substances. This property is due to inhibition of bacterial enzymes, due to the reaction of addition their amine or thiol group. [26].
- Carotenoids are molecules fungicidally power. Was able to demonstrate their antifungal activity against dermatophytes and *Candida albicans* as well as antibacterial action against certain Gram + and Gram - [26].

Table 111 : Determination of Minimum inhibitory concentration (MICs) and minimum bactericidal concentration (MBCs) of the flowers of C.A. of different extracts

| The Bacterial Strain tested | Methanol Extract | | | N-hexane Extract | | | Water Extract | | |
|-----------------------------------|------------------|-----------|-----|------------------|-----------|-----|---------------|-----------|-----|
| | MIC µg/ml | MBC µg/ml | A.A | MIC µg/ml | MBC µg/ml | A.A | MIC µg/ml | MBC µg/ml | A.A |
| <i>Rhodococcus equi</i> | 12.5 | 12.5 | + | 6.25 | 6.25 | + | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus SARM</i> | 25 | 25 | - | 6.25 | 6.25 | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus MLD</i> | 12.5 | 12.5 | - | 12.5 | 12.5 | + | - | - | - |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 25 | 25 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 25 | 25 | - | 12.5 | 12.5 | + | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 25 | 25 | - | 12.5 | 12.5 | + | - | - | - |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> | 25 | 25 | - | 12.5 | 12.5 | + | - | - | - |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 12.5 | 12.5 | - | 12.5 | 12.5 | + | - | - | - |
| <i>Morganella morganii</i> | 25 | 25 | - | 12.5 | 12.5 | + | - | - | - |

+ : Bactericidal, - : Bacteriostatic, A.A : Antibacterial activity.

Figure II. Determination of Minimum inhibitory concentration (MICs) and Minimum bactericidal concentration (MBCs) of the flowers of C.A. of different extracts



According to the values of MIC and MBC, the methanol extract which is Bacteriostatic shows an MIC between 25 µg/ml and 12.5 µg/ml for sensitive strains, with hexane extract 12.5 µg/ml and 6.25 µg/ml was obtained, this extract

Abdul-Malik Abudunia et al

J. Chem. Pharm. Res., 2014, 6(8):156-161

is bactericidal. Thus the hexane extract is more inhibitory than the methanol extract.

Thus, in our work we highlighted the antibacterial effect of hexane, methanol and aqueous extracts. Ours Identical results were obtained with *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* [27]. Similar results were obtained by Stayeh et al, 1998; bacterial inhibition was evaluated at 90% of bacterial strain [28]. in summary, we note that the extracts of the C.A. flowers has a clearly significant antibacterial action,

CONCLUSION

The results of the present study indicate that the methanol and n-hexane extracts of the C.A. flowers possesses a potential antibacterial activity .Further clinical studies are now required to determine the antibacterial principles of C.A. for various useful applications. The investigated plant extracts may be used for the preservation of processed foods as well as pharmaceutical and natural therapies for the treatment of infectious diseases in humans.

Acknowledgements

The authors wish to thank Pr. M. Fanan of the Department of Botany , Scientific Institute of Rabat , for the botanical identification and collection of the plants used in this study.

REFERENCES

- [1] R Alnamer ; K Alaoui ; H Boudida ; A Benjouad ; Y Cherrah , *Adv. Pharmacol. Sci*, **2012**: Article ID 270824, 5 pages
- [2] NR Farnsworth. *J Ethnopharmacol.*, **1993** , 38:145–52.
- [3] PJ Houghton, *J Alter Complement Med.* **1995**, 1:131–43.
- [4] NK Dubey , R Kumar, P Tripathi . *Curr Sci*. **2004**, 86:37–4.
- [5] D Runyoro, M Matee, N Olipa, C Joseph, H Mbwambo. *BMC Complement Altern Med.* **2006**,6-11.
- [6] GM Cragg, DJ Newman. *Pure Appl Chem.* **2005**,77:7–24.
- [7] BH Shahidi ; *Asian J Plant Sci.* **2004**,3:82–6.
- [8] PS Reddy, K Jamil, P Madhusudhan. *Pharmaceutical Biol.* **2001**, 39:236–8.
- [9] SA Dahanukar ; RA Kulkarni ; NN Rege. *Indian J Pharmacol.* **2000**,32:S81–118.
- [10] MM Cowan , *Clinical and Microbial Rev.* **1999**, 12:564–82.
- [11] S Ramasamy ; MA Charles ; *Asian J Microbial Biotech Env.* **2009**,6:209–10.
- [12] D Shaik ; FA Malika ; SM Rafi ; B Naqui . *J Islamic Acad Sci.* **1994**, 7:167–8.
- [13] GH Towers; A Lopez; JB Hudson. *J Ethnopharmacol.* **2001**, 77:189–96.
- [14] A Rejšková , J Brom, J Pokorný , J Korečko. *Distr. Func. Ecol. Plants.* **2010**, 205, 282-289
- [15] B.P Muley; S.S Khadabadi; N.B Banarase ; *J. Pharm. Res.* **2009**, 8, 455-465
- [16] H Coste, A Blanchard. Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes (Tome 1), Librairie des Sciences et des Arts, Paris, **1937**, 289-305.
- [17] C.C Heyn, A Joel, Pl *Syst. Evol.* **1983**, 143, 311-329.
- [18] Ruiz de Clavijo, E., *Acta. Oecol.* ,**2005**, 28, 119-126.
- [19] De Tommasi, N, Pizza, C, Conti, C, Orsi, N, Stein, M, J, *Nat. Prod.* , **1990**, 53, 830-835.
- [20] A.A Ahmed, J Jakupovic, T.J Mabry *J. Nat. Prod.* **1993**,56, 1821-1824.
- [21] A.I Hussain, S.A.S Chatha , S Noor , MU Arshad, Z.A Khan, H.A Rathore.
- [22] J Paolini, T Barboni, J.M Desjobert, N Djabou, A Muselli, J Costa, *Biochem. Syst. and Ecology.* **2010**, 38, 865-878.
- [23] J.B Harbone, Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. Halsted press, John Wiley and Sonc , Inc, New York, pp: **1976** 1-26.
- [24] Mohamed AlFatimi; Wurster Martina; Schroder Gudrun; Lindequist Ulrike. *Journal of Ethno pharmacology* 111, **2007**, 657–666.
- [25] Snyderl , Kirkl.j. Introduction to modern liquid chromatography. Ed. Wiley New York . **1979**- pp 81.
- [26] Abdalla.s ,Abu-zergam , Afidif, *Gem. Pharmacol* **1988** n°4, pp 63.
- [27] Hamdi pacha , y-Benayach.s-Benazzouz ,M Caractérisation moléculaire et effets anti-antibactérien de quelques plantes Algériennes:Inula viscosa et Centaurea pullabo, **1993**.
- [28] Ali stayeh , M.s-Yaghmour r.m-Faidi y , R. Anti microbial activity of 20 plants used in folklorie medicine in the palestinian area. **1998**.

6.3. Résultats de la cytotoxicité sur une cellule tumorale (cellules myéloïde)

Pour tester les propriétés anticancéreuses potentielles des extraits de *C.arvensis*, une souche des cellules myéloïdes a été utilisée. Les cellules ont été traitées avec douze concentrations croissantes (1-0,00093 mg/mL) pendant 48 h par le test MTT.

L'inhibition en pourcentage des extraits méthanolique et aqueux a été calculée et présentée (**figure 27**).

Le pourcentage d'inhibition de l'essai MTT a démontré que les extraits méthanoliques et aqueux sont efficaces comme bioagent cytotoxique (activité antimyloïde du cancer). Le pourcentage d'inhibition de ces extraits est prononcée par rapport à l'extrait hexanique. On a également déduit que l'extrait méthanolique est un agent antimyloïde, présentant une inhibition maximale de 89% à la concentration de 1000 µg/mL à 48 h.

Cette étude est conforme aux rapports antérieurs décrivant l'isolement des flavonoïdes de différentes parties de *A. nervosa*, *A. corniculatum*, *C. pulcherrima*, *C. viscosum*, *D. indica*, *D. peregrina*, *G. luteoalbum*, *G. oppositifolius*, *J. Sambac*, *L. coromendalica* et *M. nagi* (**Akter R., 2013**). Il est probable que ces constituants sont également associés à l'activité anticancéreuse observée dans cette étude (**Pawar CR., 2009. Meo AA, khan MA. 2006**), L'activité anticancéreuse après 48 h possède un effet maximal significatif. Le dépistage des substances phytochimiques pour l'activité anticancéreuse est extrêmement important dans le contexte d'aujourd'hui car une variété de tumeurs présente une résistance aux médicaments anticancéreux conventionnels. L'élucidation structurelle du principe bioactif de la fraction méthanolique et aqueux de *C.arvensis* doit être traitée.

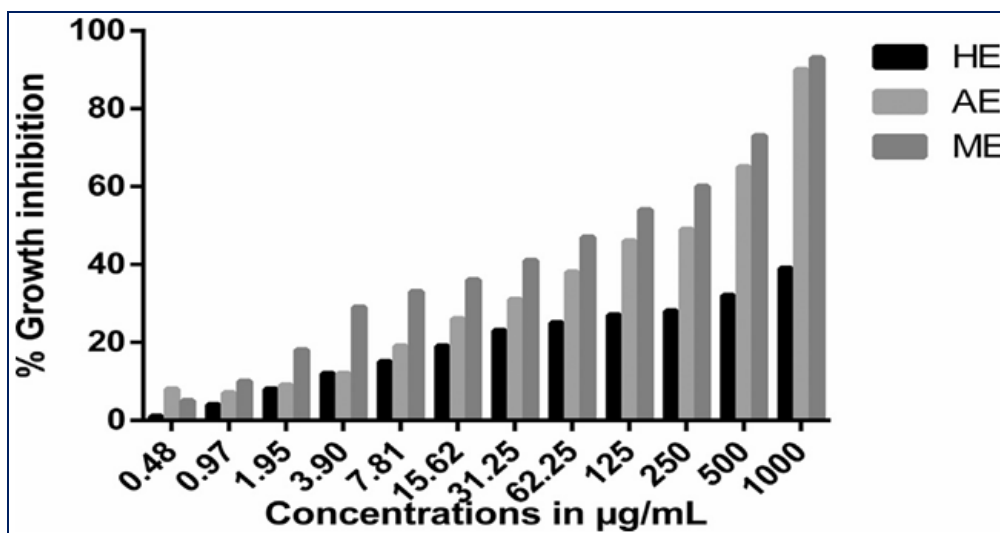


Figure 27 .Resultats de la cytotoxicité sur la cellule tumorale (myéloïde cellule).

ACTIVITÉ PHARMACOLOGIQUE

**ACTIVITÉ
ANTI-INFLAMMATOIRE *IN VIVO***

7. Résultats des activités pharmacologiques

7.1. Résultat de l'activité anti-inflammatoire (*in vivo*)

a. Œdème à la carragénine

Les résultats de l'effet des extraits des fleurs de *C.arvensis* sur l'œdème induit par la carragénine sont présentés dans le **tableau 21** et la **figure 28**.

Les extraits de la *C.arvensis* aux doses de 300 et 500 mg/kg administrés par voie orale, présentaient une activité anti-inflammatoire significative ($p < 0,05$) par rapport à l'indométhacine standard à la dose de 10 mg / kg.

Tableau 21. Influence des extraits sur l'œdème à la carragénine.

| Groupes de traitement | Dose mg/kg p.o. | Différence de volume moyen de l'œdème (patte gauche-patte droite) induit par la carragénine (ml) | | |
|-----------------------|-----------------|--|-----------------------|-----------------------|
| | | 1h30 | 3h | 6h |
| Témoin | | 0.458 ± 0.003 | 0.71 ± 0.009 | 0.55 ± 0.002 |
| IND | 10 | 0.06 ± 0.001* | 0.113 ± 0.007* | 0.135 ± 0.001* |
| EM | 300 | 0.375 ± 0.001* | 0.473 ± 0.002* | 0.426 ± 0.005* |
| EM | 500 | 0.318 ± 0.005* | 0.363 ± 0.003* | 0.325 ± 0.004* |
| EA | 300 | 0.273 ± 0.003* | 0.34 ± 0.005* | 0.291 ± 0.001* |
| EA | 500 | 0.2 ± 0.007* | 0.251 ± 0.001* | 0.235 ± 0.003* |
| EH | 300 | 0.22 ± 0.005* | 0.26 ± 0.007* | 0.24 ± 0.001* |
| EH | 500 | 0.123 ± 0.003* | 0.158 ± 0.001* | 0.136 ± 0.002* |

Notes: Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.E.M. (n = 6), extraits de fleurs *C.arvensis*, * $p < 0,05$ statistiquement significatif par rapport au Médicament de contrôle et de référence indométhacine 10 mg / Ml.

L'extrait N-héxanique a montré une réduction maximale et une inhibition de l'œdème de 51,08 et 71,43% à 300 et 500 mg/kg respectivement par rapport aux extraits aqueux et méthanoliques (48,26, 65,14 et 35,96, 52,63% respectivement) et similaires à l'indométacine standard à la dose de 10 mg/kg (72,36%) pendant les mêmes phases (**figure 28**).

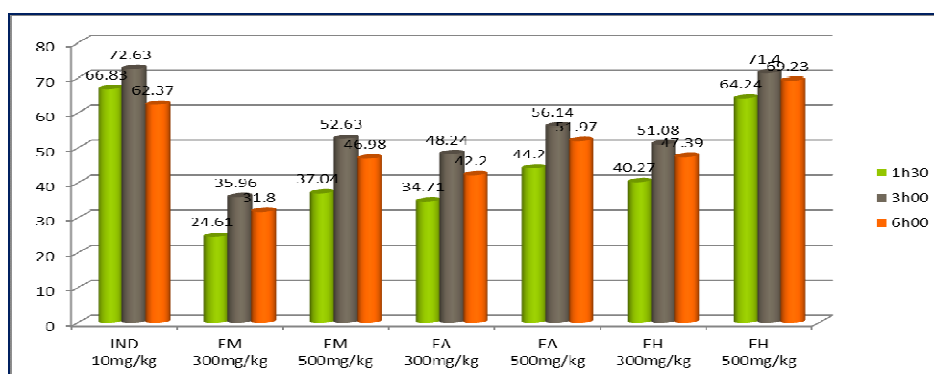


Figure 28 .Influence des extraits des fleurs de *C.arvensis* sur l'œdème à la carragénine.

b. Œdème induit par traumatisme expérimentale

L'effet anti-inflammatoire des extraits des fleurs de *C.arvensis* a été évalué sur l'œdème de la patte postérieure gauche chez le rat induit par traumatisme expérimentale. L'extrait N-hexanique a montré une réduction maximale et une inhibition de l'œdème de 63,38% et 76,33% à 300 et 500 mg/kg respectivement. Par rapport aux extraits aqueux (52,11% et 64,64%) et méthanoliques (33,38 et 48,87%), et similaires à l'indométhacine standard à la dose de 20mg / kg par voie orale de (86,89%) pendant la même phase (Tableau 22 et figure 29).

Tableau 22. Influence des extraits sur l'œdème induit par traumatisme expérimentale

| Groupes de traitement | Dose mg/kg p.o. | Différence de volume moyen de l'œdème (patte gauche-patte droite) induit par traumatisme expérimentale | | |
|-----------------------|-----------------|--|----------------|----------------|
| | | 1h30 | 3h | 6h |
| Contrôle | | 0.458 ± 0.003 | 0.71 ± 0.009 | 0.55 ± 0.002 |
| IND | 10 | 0.06 ± 0.001* | 0.113 ± 0.007* | 0.135 ± 0.001* |
| EM | 300 | 0.375 ± 0.001* | 0.473 ± 0.002* | 0.426 ± 0.005* |
| EM | 500 | 0.318 ± 0.005* | 0.363 ± 0.003* | 0.325 ± 0.004* |
| EA | 300 | 0.273 ± 0.003* | 0.34 ± 0.005* | 0.291 ± 0.001* |
| EA | 500 | 0.2 ± 0.007* | 0.251 ± 0.001* | 0.235 ± 0.003* |
| EH | 300 | 0.22 ± 0.005* | 0.26 ± 0.007* | 0.24 ± 0.001* |
| EH | 500 | 0.123 ± 0.003* | 0.158 ± 0.001* | 0.136 ± 0.002* |

Notes: Les valeurs sont exprimées en moyenne ± S.E.M. (n = 6), extraits de fleurs *C.arvensis*, * p <0,005 statistiquement significatif par rapport au Médicament de contrôle et de référence indométhacine 10 mg / mL

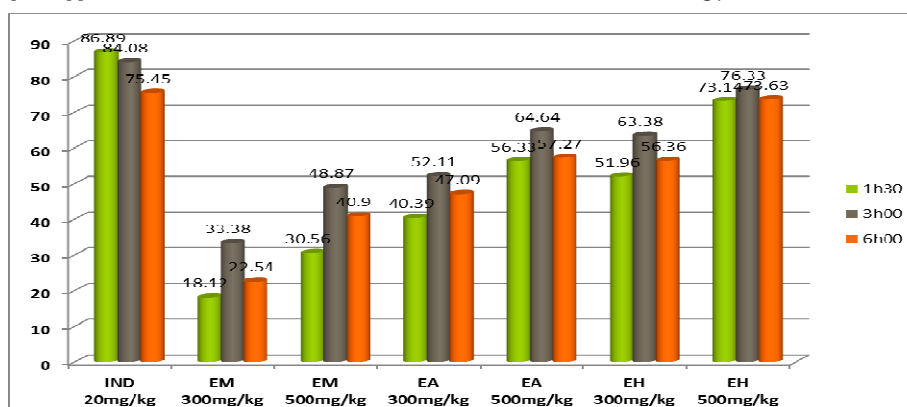


Figure 29 . Influence des extraits des fleurs de *C .arvensis* sur l'œdème induit par traumatisme expérimentale.

c. Discussion

Les extractions des plantes médicinales ont été utilisées pendant des milliers d'années dans le monde par de nombreuses civilisations. L'œdème de la patte de rat induite par le carragénine et par traumatisme expérimentale est connu pour être sensible aux inhibiteurs de la cyclo-oxygénase et a été utilisé pour évaluer l'effet des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens, qui inhibent principalement la cyclo-oxygénase impliquée dans la synthèse des prostaglandines **(Crunkhorn P., 1971)**. Il joue un rôle majeur dans le développement de la deuxième phase de la réaction inflammatoire, qui est mesurée à la troisième heure **(Di Rosa., 1971)**. L'activité anti-inflammatoire des extraits des fleurs de *C.arvensis* est attribuée à la présence des constituants phytochimiques de ces extraits, y compris les terpénoïdes phénoliques, les tanins, les flavonoïdes; ces résultats confirment nos résultats précédemment publiés **(Abudunia A-M, et al.2016)**, et cela est en accord avec de nombreuses études de la littérature rapportant que de nombreuses plantes contenant ces composés chimiques ont été connues pour posséder de puissantes propriétés anti-inflammatoires qui agissent par l'inhibition des voies de prostaglandine **(Oyekunle AO., 2012)**.

PUBLISHED BY

INTECH

open science | open minds

World's largest Science,
Technology & Medicine
Open Access book publisher



3,100+
OPEN ACCESS BOOKS



103,000+
INTERNATIONAL
AUTHORS AND EDITORS



106+ MILLION
DOWNLOADS



BOOKS
DELIVERED TO
151 COUNTRIES

AUTHORS AMONG
TOP 1%
MOST CITED SCIENTIST



12.2%
AUTHORS AND EDITORS
FROM TOP 500 UNIVERSITIES



Selection of our books indexed in the
Book Citation Index in Web of Science™
Core Collection (BKCI)

WEB OF SCIENCE™

Chapter from the book *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*

Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/nonsteroidal-anti-inflammatory-drugs>

Interested in publishing with InTechOpen?
Contact us at book.department@intechopen.com

Chapter 7

In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of Extracts from *Calendula arvensis* (CA) Flowers

Abdulmalik Abdullah Abudunia, Rabie Kamal,
Nabeel Muhsen Ziad, Methaq Algabr,
Khadija Khedid, Katim Alaoui,
M'Hammed Ansar and Azeddine Ibrahim

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68914>

Abstract


Calendula arvensis (CA) had been reported in traditional Moroccan medicine to exhibit its extensive use to treat pain and inflammation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory activity of CA flowers. The methanol, aqueous, and hexane extracts (ME, AE, and HE) were investigated for inflammatory effects by using two methods, namely, carrageenan and experimental trauma-induced hind paw edema in rats and using indomethacin (20 mg/kg body weight) as a standard drug. The results demonstrated that *Calendula Arvensis* CA extracts had significant anti-inflammatory activity where the HE at the doses of 300 and 500 mg/kg p.o. ($p < 0.001$) had the best significant reduction and inhibition of edema with 51.08, 71.33 and 63.38, 67.33% induced by carrageenan and on experimental trauma induced rat paw edema at third hour, respectively, and similar as compared with standard drug indomethacin 20 mg/kg body weight p.o. ($p < 0.001$). These results indicate that it could be suggested as contributory effects to the use of CA flowers in the management of inflammation and pain conditions.

Keywords: *Calendula arvensis*, anti-inflammatory activity, indomethacin, wistar male rats

1. Introduction

Morocco is known as the “emporium of medicinal plants” due to availability of several thousands of medicinal plants in the different bioclimatic zones, and it has favored the proliferation of more than 42,000 species of plants, divided into 150 families and 940 genres [1–4].

INTECH
open science | open minds

© 2017 The Author(s). Licensee InTech. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

Calendula arvensis (CA) (family asteraceae) [5] is found within a wide geographic distribution: central and southern Europe, northern Africa, southwestern Asia, and the Macaronesian region (the Azores Islands, the Madeira Islands, the Salvage Islands, the Canary Islands, and the Cape Verde Islands).

C. arvensis (CA) is an annual herb with tall reach to 10–50 cm, width of the leaves (5–20 mm), and is lance-shaped and borne on petioles from the slender. The inflorescence is a single flower head up to 4 cm wide, the color of the flowers are bright yellow to yellow-orange ray florets, and the fruit is an achene, which can take any of three shapes, including ring-shaped, that facilitate different methods of dispersal [6, 7].

Inflammation was described 2000 years ago by the four Latin words: rubor, calor, tumor, and dolor [8]. It is a healthy process resulting from some disturbances or disease and it is usually associated with pain as a secondary process resulting from the release of analgesic mediators: nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), steroidal drugs, and immunosuppressant drugs, which have been used usually in the relief of inflammatory diseases by people around the world for a long time [9].

Most anti-inflammatory drugs and antiarthritic drugs have wide applications in clinical conditions [10], and they are associated with several side effects such as gastrointestinal tract complications, ulcers, and cardiovascular problems [11, 12]. Therefore, alternative therapies from natural resources are ventured throughout the world.

In the recent years, inflammation is one of the major target research areas among biomedical researchers, which includes various cellular processes (e.g., phagocytosis, chemotaxis, mitosis, and cell differentiation).

Thus, the aim of this study is to evaluate the anti-inflammatory effect of the extracts of the flowers of CA and, therefore, to determine the scientific basis for its use in traditional medicine in the treatment of inflammation.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and authentication

Flowers of CA were collected based on ethnopharmacological information from the villages around the region Rabat-Khemisset, with the agreement from the authorities and respecting the United Nations Convention of Biodiversity and with assistance of traditional medical practitioner. The plant was authenticated by Pr. M. Al-Saghir [botanist from Institute Scientific (IS) in Rabat], and a voucher specimen (N°RAB 78161) was deposited in the herbarium of the botany department.

2.2. Sample preparation and extraction

The aqueous extract (AE), 200 g of CA flowers powder was extracted in 500 mL of boiling water for 30 min. Then, the infusion was filtered and then freeze-dried [13].

The hexanolic and methanolic extracts (HE and ME) were, respectively, obtained by the method of soxhlet extraction of 200 g of CA flowers for 6 h in about 500 mL of solvents.

The filtrated extracts were evaporated using a rotator evaporator. After that, the extracts were concentrated to dryness and the residue was kept at 4°C [14].

2.3. Drugs and chemicals

The following drugs and chemicals were used in the studies: carrageenan (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), PGE2 (Fluka Chemie AG), p-benzoquinone (Merck), indomethacin 20 mg/kg; all the plant extracts were dissolved in a mixture of arabic gum 5%, and then they were given to the test animals by oral mouth, and also the control group received the same treatment.

Indomethacin 20 mg/kg in 5% of gum arabic was used as the reference drug.

2.4. Animals

The study was performed on adult male rats (180–220 g), bred at the Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat. All animals were kept in a room maintained under environmentally controlled conditions of 23 ± 1°C and 12 h light–12 h dark cycle. The food was withdrawn on the day before the experiment; however, they were allowed free access to water and standard diet throughout the experiments, the animals were handled according to the prescribed ethical guidelines for laboratory animals.

2.5. Anti-inflammatory tests

In both methods, all animals were fasted 18 h before testing and received 5 mL of distilled water by gavages to minimize individual variations in response to the swelling of the paws. The left hind paw (LP) is not treated, and it is taken as control.

2.5.1. Carrageenan model

The carrageenan-induced hind paw edema model was used for the determination of anti-inflammatory activity [13–15]. Six animals were used for each extract dose, as well as the control and reference groups.

Note that 300 and 500 mg/kg doses were administered of extracts into the subplantar tissue of right hind paw of each rat that was injected with 35 µL of 30 mg/mL of freshly prepared carrageenan in physiological saline (0.9% NaCl). Note that 30 µL of saline was injected into subplantar tissue of left hind paw of control groups. Then, after the injection, the paw edema was measured at 1.5, 3, and 6 h.

Mean differences of treated groups were compared with the mean differences of the control group. The percentages of inhibition of inflammation were calculated according to the following formula:

126 Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs

$$\% \text{ of inhibition} = \frac{\text{mean} [V_{\text{left}} - V_{\text{right}}]_{\text{control}} - [V_{\text{left}} - V_{\text{right}}]_{\text{treated}}}{[V_{\text{left}} - V_{\text{right}}]_{\text{control}}} * 100 \quad (1)$$

where V_{left} is the mean volume of edema on the left hind paw and V_{right} is the mean volume of edema on the right hind paw.

2.5.2. Experimental trauma model

This assay was determined as described by Riesterer and Jacques test [16].

The test groups of rats were given orally 300 and 500 mg/kg of each extract dose, the control group received 5 mL/kg of distilled water, and the standard group received the reference drug indomethacin 20 mg/kg.

One hour after oral administration of different substances dropping weight of 50 g onto the dorsum of the left hind paw of all animals. The right hind paw is not treated; it is taken as a witness. The difference volume of two paws was measured and taken as the edema value by using digital plethysmometer LE750 at 1 h 30 min, 3, and 6 h after induction of inflammation [17].

The percentages of inhibition of inflammation were calculated according to the following formula 2 where the mean differences of treated groups were compared with the mean differences of the control groups.

$$\% \text{ of inhibition} = \frac{\text{mean} [V_{\text{left}} - V_{\text{right}}]_{\text{control}} - [V_{\text{left}} - V_{\text{right}}]_{\text{treated}}}{[V_{\text{left}} - V_{\text{right}}]_{\text{control}}} * 100 \quad (2)$$

where V_{left} is the mean volume of edema on the left hind paw and V_{right} is the mean volume of edema on the right hind paw.

2.5.3. Statistical analysis

The results are expressed as mean ± SEM and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by student's t-test. A value of $p < 0.001$ was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Carrageenan-induced rat paw edema

The results of the effect of the flowers *CA* extracts on carrageenan induced edema are shown in **Table 1** and **Figure 1** at doses of 300 and 500 mg/kg comparable to that of the control and standard drug indomethacin 20 mg/kg, p.o., and *CA* extracts exhibited significant ($p < 0.001$) anti-inflammatory activity as compared to the standard drug indomethacin 20 mg/kg (**Table 1** and **Figure 1**).

In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of Extracts from *Calendula arvensis* (CA) Flowers 127
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68914>

| Treatment groups | Dose mg/kg p.o. | 1 h 30 min | 3 h 00min | 6 h 00min |
|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| Control | | 0.458 ± 0.003 | 0.71 ± 0.009 | 0.55 ± 0.002 |
| IND | 20 | 0.06 ± 0.001* | 0.113 ± 0.007* | 0.135 ± 0.001* |
| EM | 300 | 0.375 ± 0.001* | 0.473 ± 0.002* | 0.426 ± 0.005* |
| EM | 500 | 0.318 ± 0.005* | 0.363 ± 0.003* | 0.325 ± 0.004* |
| EA | 300 | 0.273 ± 0.003* | 0.34 ± 0.005* | 0.291 ± 0.001* |
| EA | 500 | 0.2 ± 0.007* | 0.251 ± 0.001* | 0.235 ± 0.003* |
| EH | 300 | 0.22 ± 0.005* | 0.26 ± 0.007* | 0.24 ± 0.001* |
| EH | 500 | 0.123 ± 0.003* | 0.158 ± 0.001* | 0.136 ± 0.002* |

Notes: Values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6), extracts of CA flowers, *p < 0.001 statistically significant compared to the control and reference drug (indomethacin 20 mg/mL).

Table 1. Effect of extracts of CA flowers on carrageenan-induced rat paw edema.

The hexanolic extract showed maximum reduction and inhibition of edema by 51.08 and 71.43% at 300 and 500 mg/kg, respectively, compared to the aqueous and methanolic extracts 48.26, 65.14, and 35.96, 52.63% respectively, and similar to standard drug indomethacin (20 mg/kg) by 72.36% during the same time (Figure 1).

3.2. Experimental trauma-induced rat paw edema

The effect of two doses 300 and 500 mg/kg p.o. of the CA extracts on experimental trauma-induced inflammation is shown in Table 2 and Figure 2, and the results are comparable to

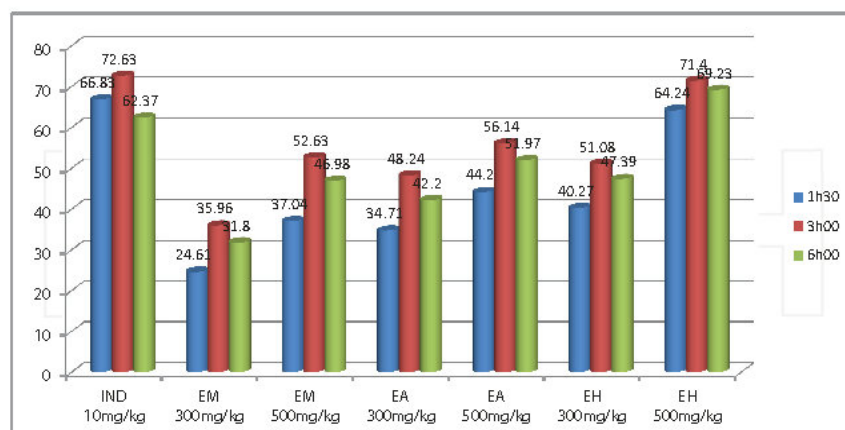


Figure 1. Percentage of inhibition of inflammation of extracts of CA flowers using carrageenan-induced rat paw edema.

128 Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs

| Treatment groups | Dose mg/kg p.o. | 1 h 30 min | 3 h 00 min | 6 h 00 min |
|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| Control | | 0.458 ± 0.003 | 0.71 ± 0.009 | 0.55 ± 0.002 |
| IND | 20 | 0.06 ± 0.001* | 0.113 ± 0.007* | 0.135 ± 0.001* |
| EM | 300 | 0.375 ± 0.001* | 0.473 ± 0.002* | 0.426 ± 0.005* |
| EM | 500 | 0.318 ± 0.005* | 0.363 ± 0.003* | 0.325 ± 0.004* |
| EA | 300 | 0.273 ± 0.003* | 0.34 ± 0.005* | 0.291 ± 0.001* |
| EA | 500 | 0.2 ± 0.007* | 0.251 ± 0.001* | 0.235 ± 0.003* |
| EH | 300 | 0.22 ± 0.005* | 0.26 ± 0.007* | 0.24 ± 0.001* |
| EH | 500 | 0.123 ± 0.003* | 0.158 ± 0.001* | 0.136 ± 0.002* |

Notes: Values are expressed as mean ± S.E.M. (n = 6), extracts of CA flower, *p < 0.001 statistically significant compared to the control and reference drug (indomethacin 20 mg/mL).

Table 2. Effect of extracts of CA flowers on experimental trauma-induced rat paw edema.

that of the control and standard drug indomethacin 20 mg/kg, p.o. CA extracts exhibited significant ($p < 0.001$) anti-inflammatory activity as compared to the standard drug indomethacin 20 mg/kg (Table 2 and Figure 2).

The hexanolic extract showed maximum reduction and inhibition of edema by 63.38 and 76.33% at 300 and 500 mg/kg, respectively, compared to the aqueous and methanolic extracts

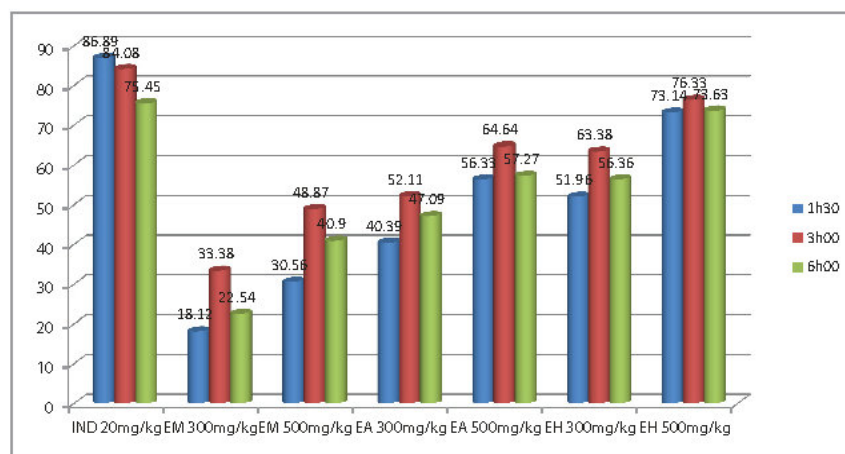


Figure 2. Percentage of inhibition of inflammation of extracts of CA flowers using experimental trauma-induced rat paw edema.

52.11, 64.64 and 33.38, and 48.87%, respectively, and similar to standard drug indomethacin 20 mg/kg by 86.89% during the same time (Figure 1).

4. Discussion

Medicinal plant extracts have been used for thousands of years in the world by numerous civilizations.

Carrageenan-induced rat paw edema in rats is known to be sensitive to cyclo-oxygenase inhibitors and has been used to evaluate the effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents, which primarily inhibit the cyclo-oxygenase involved in prostaglandin synthesis [18]. It plays a major role in the development of second phase of inflammatory reaction, which is measured at the third hour [19].

The anti-inflammatory activity of extracts of CA flowers is attributed to the present phytochemical constituents of these extracts, which include phenolic terpenoids, tannins, flavonoids; this results confirm our previously published results [20] and this is in agreement with many literature studies reporting that many plants containing these chemical classes of compounds have been reported to possess potent anti-inflammatory properties that act through inhibiting prostaglandin pathways [21].

5. Conclusion

Our study demonstrates significant anti-inflammatory activity where the hexanolic extract showed maximum inhibition of edema similar to the standard drug indomethacin (20 mg/kg) on carrageenan-induced paw edema and experimental trauma-induced rat paw edema in a dose-dependent fashion. Aqueous and methanolic extracts of CA flowers showed modest anti-inflammatory activity. This investigation suggests that CA flowers are a potential candidate for the discovery of new anti-inflammatory agents.

Acknowledgements

The authors would like to thank Pr. M. Al-Saghir [botanist from Institute Scientific (IS) in Rabat], for the botanical identification and collection of the plants used in this study. This work was carried out under intramural funding from the University of Mohammed the Vth of Rabat.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author details

Abdulmalik Abdullah Abudunia^{1*}, Rabie Kamal², Nabeel Muhsen Ziad³, Methaq Algabr⁶, Khadija Khedid⁵, Katim Alaoui², M'Hammed Ansar⁴ and Azeddine Ibrahim¹

*Address all correspondence to: abdelmalek.dunia@um5s.net.ma

1 Department of Biotechnology Laboratory (Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, Rabat, Morocco

2 Department of Pharmacodynamic Research Team ERP, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohamed V University, Rabat, Morocco

3 Department of Laboratory of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Sana'a University, Sana'a, Yemen

4 Department of Medicinal Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, Rabat, Morocco

5 Department of Bacteriology, Institute National of Health (INH), Rabat, Morocco

6 Department of Laboratory of Chemistry, Faculty of Applied Sciences, University of Hajjah, Hajjah, Yemen

References

- [1] Alnamer R, Alaoui K, Boudida HE, Benjouad A, Cherrah Y. Toxicity and psychotropic activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Lavandula officinalis* from Morocco. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 2012;14:262-272
- [2] Alnamer R, Alaoui K, Boudida HE, Benjouad A, Cherrah Y. Psychostimulant activity of *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Journal of Natural Products*. 2012;5:83-92
- [3] Alnamer R, Alaoui K, Boudida HE, Benjouad A, Cherrah Y. Psychostimulants activity of *Rosmarinus officinalis* L. methanolic and aqueous extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6(10):1860-1865
- [4] Alnamer R, Alaoui K, Boudida EH, Benjouad A, Cherrah Y. Sedative and hypnotic activities of the methanolic and aqueous extracts of *Lavandula officinalis* from Morocco. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2012;2012:5
- [5] Heyn CC, Joel A. Reproductive relationships between annual species of *Calendula* (Compositae). *Plant Systematics and Evolution*. 1983;143:311-329
- [6] Ruiz de Clavijo E. The reproductive strategies of the heterocarpic annual *Calendula arvensis* (Asteraceae). *Acta Oecologica*. 2005;28:2119-2126
- [7] Messina, Nino (2010). "Calendula arvensis". *Actaplantarum*. Retrieved 21 January 2015

In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of Extracts from *Calendula arvensis* (CA) Flowers 131
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68914>

- [8] Chatterjee A, Sen B, Das S, Chatterjee TK. Antiinflammatory and analgesic activity of methanolic extract of medicinal plant *Rhodiola rosea* rhizomes. *International Journal of Pharma Research & Review*. 2015;4(2):1-8
- [9] Alwashli A, Al-sobarry M, Alnamer R, Cherrah Y, Alaoui K. Analgesic and anti inflammatory activities of *Boswellia elongata* half methanolic extracts, as endemic plants in Yemen. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 2012;2(2):90-98
- [10] Caffo A, Saag KG, Curtis JR. Treatment of rheumatoid arthritis. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2006;63:2451-2465
- [11] Singh G, Ramey DR, Morfeld D, Shi H, Hatoum HT, et al. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal antiinflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis: A prospective observational cohort study. *Archives of Internal Medicine*. 1996;156:1530-1536
- [12] Emmanuel, J.H. & Montgomery, R.D. Gastric ulcer and anti-arthritis drugs. *Postgraduate Medical Journal*, 1971;47:227-232.
- [13] J.B. Harborne: *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. 2nd. Ed. Chapman and Hall Ltd., London, New York 1984;288
- [14] Rudzik AD, Hester JB, Tang AH, Staw RN, Friis W, editors. *The Benzodiazepines*. New York, USA: Raven Press; 1973
- [15] Yamada K, Mimaki Y, Sashida Y. Effects of inhaling the vapor of *Lavandula bur-natii* super-derived essential oil and linalool on plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH), catecholamine and gonadotropin levels in experimental menopausal female rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(2):378-379
- [16] Bignotto L, Rocha J, Sepodes B, et al. Antiinflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw edema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. *British Journal of Nutrition*. 2009;102(1):126-133
- [17] Sonavane GS, Sarveiya VP, Kasture VS, Kasture SB. Antidiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002;71(1-2):239-244
- [18] Crunkhorn P, Meacock SC. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenan. *British Journal of Pharmacology*. 1971;42:392-402
- [19] Di Rosa M, Willoughby DA. Screens for antiinflammatory drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1971;23:2978
- [20] Abudunia AM, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *Journal De Mycologie Médicale*. 2016
- [21] Oyekunle AO, Idowu AO. Antiinflammatory activity of methanolic extract of *Cnidioscolous aconitifolius* leaves in laboratory rodents. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*. 2012;2(2):770-774

7.2. Résultats de l'activité anti-diabétique (*in vitro*)

La capacité des extraits des fleurs de *C.arvensis* pour inhiber l'activité α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase (*in vitro*) a été étudiée et les résultats sont illustrés sur le **tableau 23**.

Le résultat a montré que les extraits inhibent les enzymes α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase de façon dose-dépendante (**416.16 à 3333.33 $\mu\text{g/mL}$**). Cependant, comme révélé par la CI_{50} : $573.37 \pm 36.85 \mu\text{g/mL}$, $\text{CI}_{50} = 848.83 \pm 49.93 \mu\text{g/mL}$ et $\text{CI}_{50} = 1422.66 \pm 260.87 \mu\text{g/mL}$, La CI_{50} de l'extrait aqueux des valeurs respectivement, $\text{CI}_{50} = 1368.27 \pm 9.14 \mu\text{g/mL}$, $\text{CI}_{50} = 1121.10 \pm 6.42 \mu\text{g/mL}$ et **2116.82 $\pm 17.57 \mu\text{g/mL}$** , et pour la CI_{50} de l'extrait hexanique des valeurs respectivement, $\text{CI}_{50} = 1955 \pm 28.13 \mu\text{g/mL}$, $\text{CI}_{50} = 1722.59 \pm 22.42 \mu\text{g/mL}$, $\text{CI}_{50} = 3156.98 \pm 58.17 \mu\text{g/mL}$. Les résultats d'inhibition enzymatique (α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase) des essais d'inhibition ont montré que les extraits méthanolique et aqueux sont de puissants inhibiteurs de ces enzymes, mais l'extrait hexanique présente l'effet inhibiteur le plus faibles comme représenté sur le **tableau 23**.

Tableau 23. Inhibition des enzymes digestives

| α-amylase inhibition | | | | | |
|--|--------------|---|--------------|--|--------------|
| | EA | | EM | | EH |
| Conc ($\mu\text{g/ml}$) | %INIB | Conc ($\mu\text{g/ml}$) | %INIB | Conc($\mu\text{g/ml}$) | %INIB |
| 3333.33 | 80.59 | 1666.66 | 63.48 | 3333.33 | 77.00 |
| 1666.66 | 73.06 | 833.33 | 49.66 | 2220 | 62.47 |
| 1110 | 40.57 | 416.66 | 36.05 | 1666.66 | 42.60 |
| α-glucosidase inhibition | | | | | |
| Conc ($\mu\text{g/ml}$) | %INIB | Conc ($\mu\text{g/ml}$) | %INIB | Conc($\mu\text{g/ml}$) | %INIB |
| 3333.33 | 84.50 | 1666.66 | 79.80 | 3333.33 | 79.75 |
| 1666.66 | 71.54 | 833.33 | 46.05 | 2220 | 65.99 |
| 1110 | 49.70 | 416.66 | 24.58 | 1666.66 | 48.37 |
| β-galactosidase inhibition | | | | | |
| Conc ($\mu\text{g/ml}$) | %INIB | Conc ($\mu\text{g/ml}$) | %INIB | Conc($\mu\text{g/ml}$) | %INIB |
| 3333.33 | 70.45 | 1666.66 | 84.04 | 3333.33 | 66.66 |
| 1666.66 | 39.59 | 833.33 | 29.78 | 2220 | 35.62 |
| 1110 | 24.49 | 416.66 | 14.49 | 1666.66 | 15.465 |

Les drogues synthétiques comme l'acarbose, utilisé par les diabétiques dans la gestion de la glycémie postprandiale, présente des effets secondaires tels que la distension abdominale, la flatulence et éventuellement, de la diarrhée.

Il a été suggéré que de tels effets indésirables peuvent être causés par l'inhibition excessive du pancréas α -amylase obtenue dans la fermentation bactérienne

anormal des hydrates de carbone non digérés dans le côlon.

La présente étude a révélé la présence d'antidiabétique dans les extraits méthanoliques et aqueux de *C.arvensis*, tels que les composés phénoliques et flavonoïdes. Plusieurs autres familles de composé chimiques ont également été trouvées dans nos extraits qui sont des anthocyanes, les dérivés de l'acide caféique (Laouini, 2014).

Parmi ces groupes phytochimiques de l'acide caféique et le composé phénolique qui a été rapporté pour augmenter l'absorption du glucose avec des effets secondaires minimales en accord avec la conclusion sur les composés phénoliques de *C.arvensis*, recommandée comme un régime de choix pour la gestion du diabète de type 2.

Tableau 24. Valeurs CI₅₀ (µg / mL) des extraits et contrôle positif

| Analyses | Aqueux | N-N-héxanique | Méthanolique | Acarbose | Quercétine |
|------------------------|----------------|---------------|----------------|---------------|-------------|
| α- amylase | 1368.27 ± 9.14 | 1955 ± 28.13 | 573.37 ± 36.85 | 396.42 ± 5.16 | - |
| α-glucosidase | 1121.10 ± 6.42 | 1722.59±22.42 | 848.83 ± 49.93 | 199.53 ± 1.12 | - |
| β-galactosidase | 2116.82±17.57 | 3156.98±58.17 | 1422.66±260.87 | - | 246.90±1.90 |

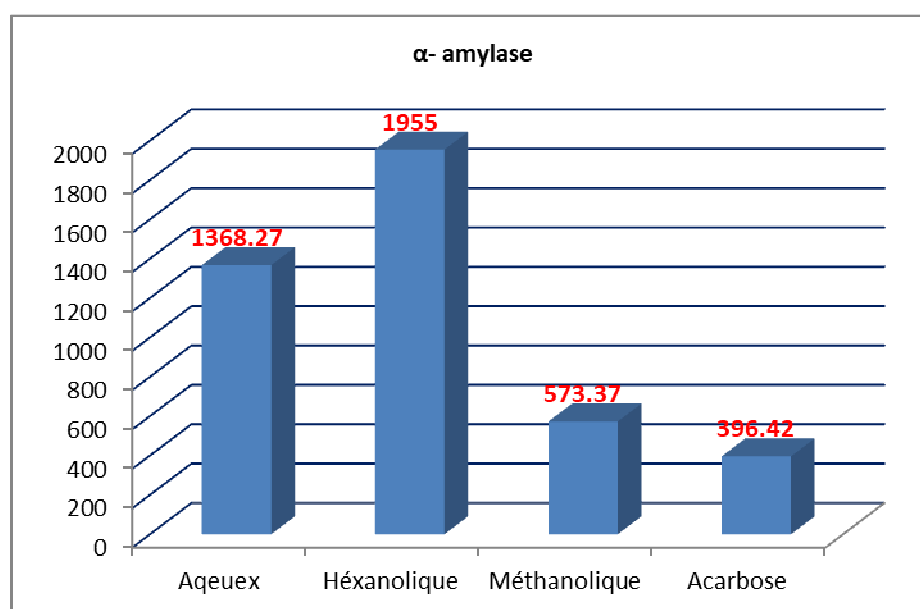


Figure 30 : CI₅₀ de l'enzyme α- amylase (µg / mL) des extraits et de contrôle positif

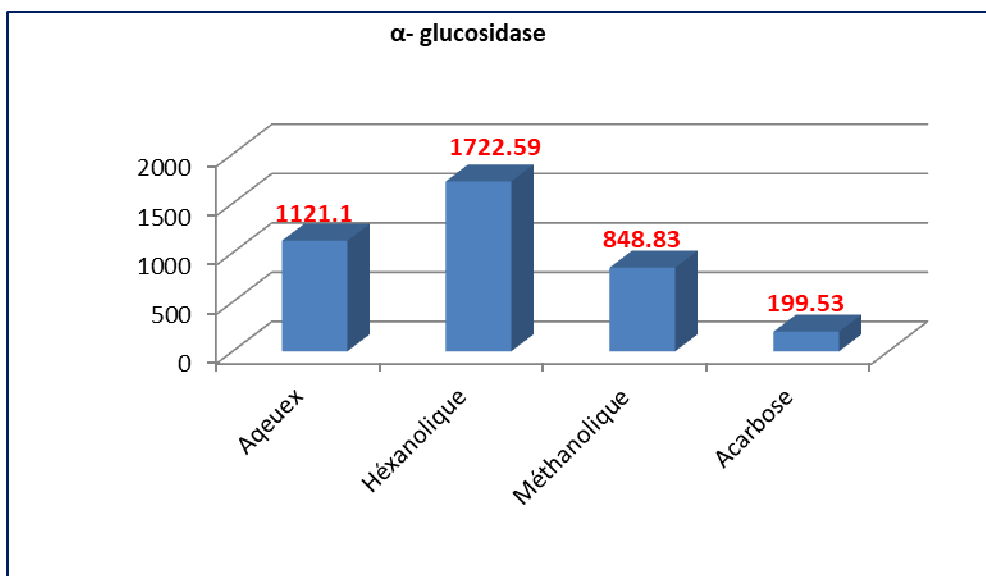


Figure 31 : CI₅₀ de l'enzyme α- glucosidase (μg / mL) des extraits et de contrôle positif

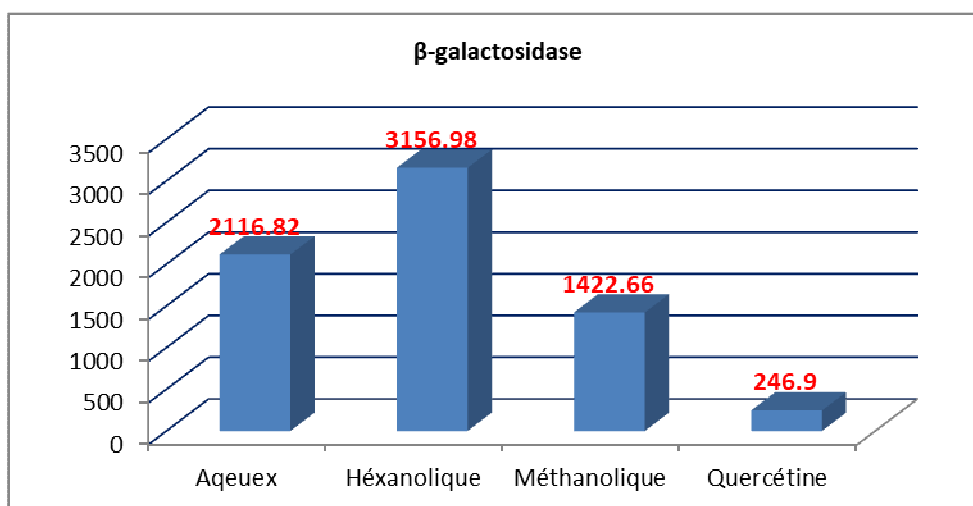


Figure 32 : CI₅₀ de l'enzyme β-galactosidase (μg / mL) des extraits et de contrôle positif

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le présent travail est consacré à l'étude phytochimique et l'activité biologique et pharmacologique (antioxydante, antimicrobienne, cytotoxicité, anti-inflammatoire et antidiabétiques) des extraits des fleurs de *C.arvensis* de la famille d'asteraceae, choisie sur la base de son usage traditionnel. Cette étude s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe du Laboratoire de Biotechnologie (**Med-Biotech**).

Pour ce faire, on a au préalable effectué un criblage phytochimique des métabolites secondaires contenus dans cette espèce de *Calendula*. La nature du composé chimique mis en évidence laisse prévoir des activités biologiques et pharmacologiques intéressantes. Il s'agit essentiellement des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et des saponosides contenus en majorité dans les fleurs de la plante.

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs. Elle dépend à la fois du solvant d'extraction et de la nature des composé à extraire. On a tenté, dans un premier temps, d'extraire les composés phénoliques totaux par extraction solide-liquide en utilisant trois solvants choisis de manière à solubiliser un maximum de composés.

Les différents extraits obtenus ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en flavonoïdes et en polyphénols. Par ailleurs, on a démontré que le méthanol est le meilleur solvant extracteur des flavonoïdes et polyphénols contenus dans cette espèce. Dans un deuxième temps, on a cherché à obtenir un extrait enrichi en métabolites des flavonoïdes. Un protocole d'extraction a été optimisé afin de concentrer les composés dans un extrait adapté en réalisant des extractions successives avec des solvants de polarités différentes.

L'identification chromatographique menée sur les extraits méthanolique et aqueux a permis de caractériser les principaux composés phénoliques.

Les grandes familles de composés ont été mises en évidence : dans l'extrait aqueux et méthanolique de la variété, il s'agit d'acid caféique, rutine, acide chlorogénique, acide vanillique. On remarque l'absence du pyrocatechol de l'acide caféique sous l'extrait méthanolique.

Ces principes actifs majeurs possèdent diverses activités biologiques et jouent un rôle reconnu dans le maintien d'un bon état de santé.

L'évaluation de l'activité antioxydante (*in vitro*) de ces extraits a été réalisée par différentes méthodes, à savoir: le piégeage duradi calibre DPPH•, Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP), le piégeage du radical-cation ABTS•+, l'inhibition du blanchiment du bêta-carotène.

On a constaté que les différents extraits bruts testés présentent des activités antiradicalaires et antioxydantes intéressantes, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes, Ainsi, une relation linéaire a été établie :

les extraits les plus riches en polyphénols et en flavonoïdes étant les plus actives. Cependant, l'intensité de l'activité antioxydante ne dépend pas uniquement de la teneur globale en polyphénols et flavonoïdes mais également de leur nature. Ainsi, on a trouvé une très forte inhibition de l'oxydation par l'extrait méthanolique.

Les extraits ont été également soumis à un criblage pour leur possible activité antimicrobienne (*in vitro*), contre 22 souches de bactéries pathogènes, 6 espèces fongiques de *Candidas* pp, en employant la méthode de diffusion en puits.

On a constaté que les extraits méthanolique et N-héxanique sont plus actifs que de l'extrait aqueux avec des diamètres variant entre 8 et 22 mm.

L'extrait méthanolique a montré une activité antibactérienne bactéricide sur 6 souches parmi les 12 utilisées à savoir *Rhodococcuss equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Proteus rettgeri* MDR, *Escherichia coli* 1 et *Escherichia coli* 2, quant à l'extrait N-héxanique , il est bactéricide sur toutes les souches sensibles sauf *Staphylococcus aureus* MDL, L'activité antibactérienne des extraits organiques justifie en grande partie l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle marocaine pour le traitement des infections urinaires, ,infections gastro-intestinales et des infections respiratoires.

La présence d'une activité antibactérienne sur des souches multi-résistantes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* laisse conclure que les fleurs de *C.arvensis* pourraient être exploitées comme une source de nouvelles substances antibactériennes. Parcontre, les differents extraits n'ont montré aucune activité antifongique.

L'évaluation des activités, cytotoxique, antidiabétique et anti-inflammatoires,

montre que ces extraits, plus particulièrement l'extrait méthanolique présentent des propriétés très intéressantes. Une corrélation positive entre ces activités et les composés polyphénoliques a été trouvée. L'activité de l'extrait hexanique pourtant très peu concentrée en polyphénols et flavonoïdes, peut être attribuée à d'autres substances (cires, acides gras, stérols, triterpènes, caroténoïdes, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines) qui peuvent agir indépendamment ou en synergie. L'ensemble des résultats obtenus constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel des fleurs de *C.arvensis* et confirme encore une fois la pertinence des remèdes traditionnels dans le traitement de nombreux maux.

Perspective

Par conséquent, il serait judicieux d'exploiter ces résultats sur plusieurs domaines:

- **Bioconservation :**

La bioconservation -ou biopréservation- vise à prolonger la durée de vie des aliments en maîtrisant la croissance des flores pathogènes ou d'altération par l'utilisation de flores protectrices.

- **Cosmétique:** Fabrication en crèmes, lotions, gels, laits et pommades, et fabrication des produits anti-déshydratation ou anti-âge.

- **Agroalimentaire comme conservateur et colorant.**

- **Tester l'activité antidiabétique (*in vivo*), cette activité biologique répond l'usage majeur de la plante selon les résultats de l'enquête ethnobotanique.**

- **Cette étude est en partie de l'usage traditionnel des plantes, mais aujourd'hui, avec la rapide dégradation de l'environnement suivie de la disparition de nombreuses espèces végétales, les études de pharmacognosie ne doivent plus se contenter uniquement des espèces qui font l'objet d'un usage traditionnel, mais de toutes les espèces disponibles au risque de laisser des composés qui resteront à jamais inconnus.**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbès Tanji, 1996.** Adventices du blé et de l'orge au Maroc : livre. pp .312.
2. **Abrassart JL. 1997.** Aromathérapie essentielle : huiles essentielles ; parfums pour le corps et l'âme. Editions Guy trédaniel. pp, 271.
3. **Abdalla.s. Abu-zergam., Afidif. 1988.** Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated. *Gem. Pharmacol* n°4, pp. 63.
4. **Abudunia A-M, et al. 2016.** Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *Journal De Mycologie Médicale.* pp.8 .
5. **Adjanohoum J.E, Aké Assi L., Floret J J., Guinko S., Koumaré M., Ahyi A. et Raynal J.,1979.** Contribution aux études ethnobotaniques et florestiques au Mali. *Médecine traditionnelle et Pharmacopée.* ACCT, Paris, pp. 291.
6. **Ahmed, A.A., Jakupovic, J., Mabry, T.J., 1993.** Sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *J. Nat. Prod.* 56, pp.1821–1824.
7. **Amin, A. H., Subbaiah, T. V., Abbasi, K. M. 1969.** Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 15, n° 9, pp. 1067-1076.
8. **AmirghofranZ. Azadbakht M. KarimiMH., 2000.** Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants.*J Ethnopharmacol.* pp.167-72.
9. **Anentangledbank. 2012.** Flower as star: *Calendula arvensis* (field marigold), and Kew Gardens. Last accessed April2016,pp.57.
10. **Alaoui K, Lagorge JF, Cherrah Y, Hassar M, Amarouch H and Roquebert J; 1998.** Activité analgésique et anti-inflammatoire des saponines *d'Argania. spinosa*. *Annale pharmaceutiques françaises* 56 pp. 220-228.
11. **Al-Achi A., 2005.** Herbs that affect blood glucose levels. *Women's Health in Primary Care.* 8(7):pp.325-330.
12. **AlFatimi Mohamed. Martina Wurster., Gudrun Schröder., Ulrike Lindequist., 2007.** Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of Ethno pharmacology*, pp.

- 657-666.
13. **Ali-Stayeh, M. S., Yaghmour, R. M., Faidi, Y. R., Salem, K. and Al-Nur, M. A., 1998.** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Platenian area. *J Ethnopharmacol.* PP.265-271.
 14. **Akter R, Uddin S , Grice ID, Tiralongo E. 2013,** Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *J Nat Med.* 2014 Jan;68(1):246-52. doi: 10.1007/s11418-013-0789-5.
 15. **Barkely, T. M., Brouillet, L., Strother, J. L, 2006.** Asteraceae. In: Flora of North America Editorial Committee. Flora of North America, North of Mexico. vol. 19. New York: Oxford University Press, pp. 3-69.
 16. **Barros, L., Cabrita, L., Boas, M. V., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. 2011.** Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry*, vol. 127, n° 4, pp. 1600-1608.
 17. **Barnes Peter J.1998.** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science*, 94. pp, 557-572.
 18. **Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D, 2005.** Drug discovery from medicinal plants. *life Sci* 78: pp.431-441.
 19. **bell(k.s.) ,Philp(j.c.),aw(d.w.j.) et christofi., 1998.** The genus *Rhodococcus*. *J. Appl. Microbiol.*, 85, pp.195-210.
 20. **Berche P., Gaillard J-L, Simonet M., 1989.** Bactériologie: bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion.
 21. **Betancur-Galvis LA, Saez J, Granados H, Salazar A, Ossa JE 1999.** Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 :pp. 531-535.
 22. **Billing, J., Sherman, P. W. 1998.** Antimicrobial Functions of Spices: Why some like it hot. *Quarterly Review of Biology*, vol. 73, n° 1, pp.3-49.
 23. **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *La Voisier TEC et DOC*, Paris. 5ème édition. pp.250-270.
 24. **Bruneton, J. 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 4 e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc , pp.1288.
 25. **Bohannon, R.A., Miller, D.G. & Diamond, H.D. 1963.** Vincristine in the

- treatment of lymphomas and leukemias. *Cancer Res.* 23, pp. 613-621.
- 26. Boubaker, J. 2012.** Isorhamnetin 3-O-robinobioside from *Nitraria retusa* leaves enhance antioxidant and antigenotoxic activity in human chronic myelogenous leukemia cell line K562. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12 art pp.135.
- 27. Canel, C., Moraes, R. M., Dayan, F. E., and Ferreira, D., 2000.** Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett.* pp. 252.
- 28. Cassady, John M. Douros, John D, 1980.** Anticancer agents based on natural product models. Academic, 111 Fifth Ave., New York, NY 10003. pp. 500.
- 29. Carmichael. James, DeGraff William G, Adi F. Gazdar.1987.** Evaluation of a Tetrazolium- based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing *Cancer* 47:pp.936-942.
- 30. Chalchat, J.C., Garry, R. Ph., Michet, A., 1991.** Chemical composition of essential oil of *Calendula officinalis* L. (Pot Marigold). *Flavour Fragr. J.* 6, pp. 189-192.
- 31. C'etkovic' GS, Djilas SM, C'anadanovic'-Brunet JM, Tumba VT. 2004.** Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Res Int* 37:pp.643-50.
- 32. Cowan, M.M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review.* 12(4): pp. 564-582.
- 33. Crunkhorn P, Meacock SC. 1971.** Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenan. *British Journal of Pharmacology.* 42:pp.392-402.
- 34. Couic-Marinier F., Lobstein A. 2013.** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*; 52 (525) : pp.18-21.
- 35. Chemli, R., Babadjamian, A., Faure, R., Boukef, K., Balansard, G., Vidal, E., 1987.** Structure of Arvensoside A and B, two new triterpenoids glycosides from *Calendula arvensis* L. *Phytochemistry* 26, pp.1785-1788.
- 36. Crabas, N., Marungiu, B., Piras, A., Pivetta, T., Porcedda, S., 2003.** Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *Calendula officinalis* L. and *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton by Supercritical CO₂. *J. Essent. Oil Res.* 15, pp.350-355.
- 37. Cordova C.A., Siqueira I.R., Netto C.A., Yunes R.A., Volpato A.M., Cechinel Filho V., Curi-Pedrosa R., Creczynski-Pasa T.B. 2002.** Protective properties

- of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger [archive]. *Redox Rep*; 7(2):pp.95-102
- 38. CJania YELJYYES., 2014.** Enquete ethnobotanique, caractérisation chimique et activites biologiques des volatils de deux plantes medicinales de l'ouest Algerien : *Calendula arvensis* L et *Carthamus sp* L, Mémoire Master en chimie Universite Abou bekr belkai de Tlemcen.
- 39. De Tommasi, N., Pizza, C., Conti, C., Orsi, N., Stein, M.L., 1990.** Structure and in vitro antiviral activity of sesquiterpene glycosides from *Calendula arvensis*. *J. Nat. Prod.* 53.pp. 830–835.
- 40. Dey lucey MD., Anoja S., Attele DDS., Chun-Su Yuan MD., 2002.** Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine Review.* 7(1):pp. 45-58.
- 41. Di Rosa M, Willoughby DA. 1971.** Screens for anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.*23:pp. 2978.
- 42. DOUKANI Koula , TABAK Souhila , DERRRICHE Asma and HACINI Zahira 2014.,** Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens. *Revue Ecologie-Environnement* (10) : 2014 ISSN: 1112-5888.
- 43. Ercetin T, Senol FS, Orhan IE, Tokerb G. 2012.** Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis*. *Ind Crop Prod*; pp. 203-8.
- 44. Freney J., Renaud F., Leclerc R., Riegel P., 2007.** Précis de bactériologie clinique. Ed. Alexandre lacassagne et ESKA, 2^{ème} édition, pp. 1121-1148.
- 45. Franchomme P., Pénoël D, Jollois R. 1990.** L'aromathérapie exactement- Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Editions Jollois, pp, 445.
- 46. Gazim, Z.C., Rezende, C.M., Fraga, S.R., Filho, B.P.D., Nakamura, C.V., Cortez, D.A.G., 2008.** Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Braz. J. Pharm. Sci.* 44, pp. 391–395.
- 47. Gibbons, S. 2008.** Phytochemicals for bacterial resistance - strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, vol. 74, n° 6, pp. 594-602.

48. **Guerci B., Bohme P., Kearney-Schwartz A., Zannad F., Drouin P., 2001.** Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 27:pp. 436-447.
49. **Guinoiseau, E.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat. Corse : Université de Corse-Pasquale Paoli, 2010.
50. **Guinoiseau Leguay, T., Desplat, V., Marit, G. & Mahon, F. 2005.** D276G mutation is associated with a poor prognosis in imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 19, pp. 2332-2333.
51. **Gülçin I., 2012.** Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol*; 86:pp. 345-91.
52. **Gordana S. Četkovi, Sonja M. Djilas, Jasna M. et Vesna T. Tumbas 2004,** Antioxidant properties of marigold extracts. *Barajas. Journal of food research international*; ppt: 643-650.
53. **Herold A., Cremer L., Calugaru A., Tamas V., Ionescu F., Manea S., Szegli 2003.** Hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. *Roum Arch Microbiol Immunol*; 62 (1-2):pp.117-29.
54. **Hashim, A., Khan, M.S., Khan, M.S., Baig, M.H., Ahmad, S., 2013.** Antioxidant and Alpha Amylase Inhibitory Property of *Phyllanthus virgatus* L.: An , In Vitro and Molecular Interaction Study. *Bio Med Research International* 2013, Article ID 729393 ; pp,12.
55. **Hamdi pacha., y-Benayach.s-Benazzouz., M 1993.** Caractérisation moléculaire et effets anti-antibactérien de quelques plantes Algériennes : *Inula viscosa et Centaurea pullabo.*
56. **Hamburger M., Adler S., Baumann D., Forg A., Weinreich., 2003.** Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold *Calendula officinalis* .*Fitoterapia*. pp.74.
57. **Hartwell. Leland, 1992.** Defects in a Cell Cycle Checkpoint May Be Responsible for the Genomic Instability of Cancer Cells. *Cell*, 71: 543-546.
58. **Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999.** Free radicals in biology and medicine. Third Edition, Oxford University Press, Oxford, ppt. 617-783.
59. **Heyn, C.C., Joel, A., 1983.** Reproductive relationships between annual species of *Calendula* (Compositae). *Pl. Syst. Evol.* 143, pp. 311–329.

60. **Heyn, C.C., 1988.** Investing in adaptations to rare events a reproductive strategy. *Lagascalia* 15, pp.29–36.
61. **Honma, Y., Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Hozumi, M. & Umezawa, K 1990.** Inhibition of abl oncogene tyrosine kinase induces erythroid differentiation of human myelogenous leukemia K562 cells. *Jpn. J. Cancer Res* 81. pp, 1132-1136.
62. **Huang, H. Y., Appel, L. J., Croft, K. D., Miller, E. R., Mori, T. A., Puddey, I. B. 2002.** Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 76, n° 3, pp. 549-555.
63. **Hostettmann, K., Wolfender, J.-L. 2004.** Applications of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolites. In: Tringali, C. *Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterization and biological properties.* Londres: Taylor and Francis e-Library, pp. 31-68.
64. **Jimenez-Medina E., Garcia-Lora AM., Paco L., Algarra I., Collado A, Garrido 2006.** A new extract of the plant calendula officinalis produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti- tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*.5; 6(1) pp. 119.
65. **Karmakar I, Dolai N, Saha P, Sarkar N, Bala A , Kanti P. 2011.** Scavenging activity of Curcuma caesia rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient Pharmacology Experimental medicine* 11:pp.221–228.
66. **KalvatchevZ, Walder R, Garzaro., 1997.** Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed Pharmacother P*; 51(4) pp.176-8.
67. **Kathrin-Maria Roy, 2000.** Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Sulfones and Sulfoxides, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. pp. 25_487.
68. **Khalid A, Khalida. 2010.** Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. *Scientia Horticulturae* , pp. 126(2).
69. **Kee, K. T., Koh, M., Oong, L. X., & Ng, K. 2013.** Screening culinary herbs for antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(9), pp. 1884-1891.
70. **Kilani-Jaziri S, Bhourri W, Skandrani I, Limem I, Chekir-Ghedira L,**

- Ghedira K. 2011.** Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. South African Journal of Botany 77:pp.767-776.
- 71. Kirmizibekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S., Pizza, C., Calis, I., 2006.** Triterpene saponins from *Calendula arvensis*. Z. Nat. Forsch. B 61, pp. 1170–1173.
- 72. Kaur, C., Kapoor, H.-C. 2002.** Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. International Journal of Food Science & Technology, vol. 37, n° 2, pp. 153-161.
- 73. Koleva II, Van Beek TA, Linsen JPH, de Groot A, Evstatieva LN 2002.** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis 13:pp. 8-17.
- 74. Lardry J-M, Haberkorn V. 2007.** L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither Rev; 61 : pp. 14-7.
- 75. Laouini., 2014.** Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de Phoenix dactylifera L dans la région du Sud d'Algérie la région d'Oued Souf. Thèse de Doctorat. Université de Mohamed Khider Biskra. pp. 131.
- 76. Leitao, C. 2011.** Etude de composés à intérêt technologique et fonctionnel dans la bière. Thèse de Doctorat. Strasbourg.
- 77. Leveque, D. and Jehl, F., 1996.** Clinical pharmacokinetics of vinorelbine. Clin Pharmacokinet 31 (3), 184 (1996); van Der Heijden, R. et al., and The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. Curr Med Chem 11 (5), pp. 607.
- 78. Lewis, K., Ausubel, F. M. 2006.** Prospects for plant-derived antibacterials. Nature Biotechnology, vol. 24, n° 12, pp. 1504-1507.
- 79. Leclerc H., Gaillard J-L., Simonet M., 1995.** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Edition doin éditeurs, Paris. pp. 124–134.
- 80. Liyana-Pathirana CM .2006.** Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. J Agric Food Chem. 22; 54(4):1256-64.
- 81. Lister E, Wilson P. 2001.** Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity (personal communication). Lincoln, New Zealand: Crop Research Institute. 18 Curr Sci, pp. 78 .

- 82. Linnaeus, Carl. 1763.** Species plantarum .pp.1303.
- 83. Linuma, M., Ito, T., Miyake, R., Tosa, H., Tanaka, T., Chelladurai, V. 1998 .**
A xanthone from *Garcinia cambogia*. *Phytochemistry*, vol. 47, n° 6, pp. 1169-1170.
- 84. Lorence, A. and Nessler, C. L., Camptothecin, 2004.** Over four decades of surprising findings. *Phytochemistry* 65 (20), 2735; Sirikantaramas, S. et al., Camptothecin: therapeutic potential and biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol* 8 (4) . pp, 196.
- 85. Marles R.J., Farnsworth N.R., 1994.** Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ Med Plant Res.* 1994; 6:149-187
- 86. Marczal, G., Cserjesi, Z., Hethelyi, E., Petri, G., 1987.** Data on the essential oil content and composition of *Calendula officinalis L.* *Herba Hung* 26, pp. 179-189.
- 87. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes,
- 88. Marmouzi I et al., 2015.** Proximate analysis, fatty acids and mineral composition of processed Moroccan *Chenopodium quinoa Willd* and antioxidant properties according to the polarity. *Phytothérapie* 13: pp.110-117.
- 89. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.
- 90. Marzouk, M.S.; Moharram, F.A.; El-Dib, R.A.; El-Shenawy, S.M.; Tawfike, A.F., 2009.** Polyphenolic profile and bioactivity study of *Oenothera speciosa* Nutt. aerial parts. *Molecules*, 14: pp. 1456-1467.
- 91. Meo AA, Khan MA., 2006.** Palynological observations on the genus *Calendula* (*Calenduleae-compositae*) from Pakistan. *Pak J Bot* 38: pp.511-20.
- 92. Melo, E.E.C., Costa, E.T.S., Guilherme, L.R.G., Faquin, V., Nascimento, C.W.A., 2009.** Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an arsenic-enriched nutrient solution. *J. Hazard. Mater.* 168 (1), pp. 479-483.

- 93. Mohammedi Zohra ., 2012 .** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université de Tlemcen.
- 94. Morel S., 2011.** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea Benth.* (Fabaceae). Thèse de doctorat: Université d'Angers, N° 1031.
- 95. Mosmann. T., 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays journal of immunological methods 65: pp. 53-63.
- 96. Mosa'd Ali., 2012.** Valorisation pharmacologique d'aloë perryi baker et jatropha unicostata balf, plantes endemiques du yemen: toxicite, potentiel anti inflammatoire et analgesique. These de Doctorat. Université Mohammed V- Souiss.FMPR, pp. 4.
- 97. Nogaret-Ehrhart A-S., 2008.** La phytothérapie : se soigner par les plantes. Ed. Eyrolles, Paris. hyto Pratique pp. 26-09-
- 98. Quezel P, Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques meridionales, Editions du centre national de la recherche scientifique, pp.557.
- 99. OMS., 2012.** Rapport sur la Santé du Monde, <http://www.who.int/whr.2012.fr>.
- 100. Oyaizu, M. 1986.** Studies on products of the browning reaction: antioxidative activities of products of browning prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, vol. 44, pp. 307-316.
- 101. Oyekunle A.O., Idowu A.O., 2012.** Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Cnidioscolous aconitifolius* leaves in laboratory rodents. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences; 2(2) .pp. 770-774.
- 102. Okoh, O.O., Sadimenko, A.A., Asekun, O.T., Afolayan, A.J., 2008.** The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. Afr. J. Biotechnol. 7, pp. 1500–1502.
- 103. Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne JO., 1999.** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Coeur, Poumons. 4 (5): pp. 12-23.
- 104. Pizza, C., De Tommasi, N., 1987.** Plants metabolites: A new sesquiterpene glycoside from *Calendula arvensis* L. J. Nat. Prod. 50, pp. 784–787.

105. **Punitha ISR., Rajendran K., Shirwaikar A., Shirwaikar A., 2005.** Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocinnicotinamide induced diabetic rats. *E CAM.* 2(3): pp . 375-381.
106. **Pieri F., Kirkiacharian S., 1992.** *Pharmacologie et Thérapeutique*, 2^{ème} édition Marketing. Paris. 443 p. Philippon A. (1995) Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. *Lett. Infectiol.* 10: pp. 619-630.
107. **Pizza C, Tommasi D.,1987.** A new sesquiterpene glycoside from *Calendula arvensis* L. *J Nat Prod*; 50:pp. 784-7.
108. **Pawar CR, Mutha RE., 2009.** Antioxidant and cytotoxic activities of *Caesalpinia pulcherrima* wood Indian. *J Biochem Biophys*; pp.198-200.
109. **Potterat, O.; Hamburger, M., 2008.** Drug discovery and development with plant derived compounds. *Prog. Drug Res.* 65, pp. 47–118.
110. **Racah D., 2004.** Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *EMC-Endocrinologie.* 1(1): pp. 29-42.
111. **Radulescu, V., Doneanu, C., Loloiu, T., 2000.** Investigation of chemical composition of *Calendula officinalis*. *Rev. Roum. Chim.* 45, pp. 271–275.
112. **Riesterer L, Jaques R., 1970.** The influence of anti-inflammatory drugs on the development of an experimental traumatic paw oedema in the rat. *Pharmacology* 3. pp. 243.
113. **Ribéreau-Gayon P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris . pp .254.
114. **Ribes G., Sauvaire Y., Baccou JC., 1984.** Effects of fenugreek seeds on endocrine pancreatic secretions in dogs. *Ann Nutr Metab.* 1984; pp. 37-43.
115. **Rignanese I.,1763.** *Calendula arvensis* Plant profile in Schede di botanica.Wikipedia/www.com.
116. **R. j. Marlesa and n. r.Farnsworth., 1995.** Antidiabetic plants and their active constituents; *Phytomedicine* Vol. 2 (2), pp. 137-189.
117. **Rüegg, T., Calderón, A. I., Queiroz, E. F., Solís, P. N., Marston, A., Rivas, F., Ortega-Barría, E., Hostettmann, K., Gupta, M. P., 2006.** 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti-*Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103, n° 3, pp.461- 467.

- 118. Rimbach, G.; Melchin, M.; Moehring, J.; Wagner, A.E., 2009.** Polyphenols from cocoa and vascular health a critical review. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, pp. 4290–4309.
- 119. Roulier G., 1990.** Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Editions Dangles,
- 120. Scimeca, D. 2006.** Les plantes du bonheur : Retrouvez naturellement bien être et plaisir de vivre. Monaco: Alpen.
- 121. Sofowora, A. 2010.** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Académie suisse des sciences naturelles: Karthala.
- 122. Snyderl., Kirkl.j 1979.** Introduction to modern liquid chromatography. Ed. Wiley New York .pp. 81.
- 123. Schempp, C. M., Pelz, K., Wittmer, A., Schöpf, E., Simon, J. C. 1999.** Antibacterial activity from St John's wort against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *The Lancet*, vol. 353, n° 9170, pp. 2129.
- 124. Stermitz, F. R., Lorenz, Guinoiseau P., Tawara, J. N., Lauren, A., Zenewicz, L., Lewis, K. 2000.** Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 97, n° 4, pp. 1433-1437.
- 125. Srivastava Y., Venkatakrishna-Bhatt H., Verma Y., 1993.** Antidiabetic and adaptogenic properties of *Momorica charantia* extract. An experimental and clinical evaluation. *Phytother Res.*; 7: pp. 285-289.
- 126. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. 2004** *Farmacognosia da Plantaao Medicamento*, 5th ed.; Editora da UFRGS: Porto Alegre, Brasil;; pp. 424.
- 127. Sousa, O.V.; Vieira, G.D.V.; Pinho, J.D.R.G.; Yamamoto, C.H.; Alves, M.S. 2010.** Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annonamuricata* L. leaves in animal models. *Int. J. Mol. Sci.*, 11, pp. 2067–2078.
- 128. Vansant., 2004.** Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Ed Institut Danone,

129. **Vaishampayan, U., Parchment, R. E., Jasti, B. R., and Hussain, M., Taxanes., 1999.** an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Urology* 54,pp. 22.
130. **Verpoorte R 2002,** Cotin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*;1 (1):13-25
131. **Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, vol. 104, n° 4, pp. 1372-1378.
132. **Tétau, M. 2005.** *Articulations : Votre ordonnance naturelle.* Monaco : Alpen.
133. **Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., Lewis, K., 2002.** Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46, n° 10, pp. 3133-3141.
134. **Tuberoso CIG, Rosa A, Bifulco E, Melis MP, Atzeri A, Pirisi FM, Dessì MA, 2010.** Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chem*; pp. 42–50.
135. **Winter C, Risley EA, Nus GV., 1962.** Carrageenan-induced edema in hind paws of the rats as an assay for anti-inflammatory drug. *Proc Soc Exp Biol Med* 111:pp. 544.
136. **Yang, J., Guo, J., Yuan, J., 2008.** In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 41, n° 6, pp. 1060-1066.
137. **Yanishlieva, N. VI., Marinova, E. M., 1995.** Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, vol. 54, n° 4, pp. 337-382.
138. **Yangthong, M., N. Hutadilok-Towatana and W. Phromkunthong., 2009.,** Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. *Plant Foods Human Nutr.*, 64: pp. 218–223.
139. **Zitterl-Eglseer K., Sosa S., Jurenitsch J., Schubert-Zsilavec M., Della Loggia R., Tubaro A., Bertoldi M., Franz C., 1997.** Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharmacol.* Jul; 57(2):pp.139-44.
140. **Zhou, M. L., Shao, J. R., and Tang, Y. X., 2009.** Production and metabolic

engineering of terpenoid indole alkaloids in cell cultures of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar periwinkle). *Biotechnol Appl Biochem* 52 (Pt 4), pp. 313.

ANNEXES

Annex 1. Réactifs utilisés pour la révélation des composés recherchés

| Composés recherchés | Procédure |
|-----------------------|---|
| Alcaloïdes | <p>1 g du matériel végétal est mélangé avec 5 mL d'une solution de H₂SO₄ à 10%. Le mélange obtenu est mis sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Ce mélange est ensuite filtré et le volume complété avec de l'eau distillée à 5 mL.</p> <p>1 mL du filtrat obtenu est mis dans deux tubes différents, puis 5 gouttes du réactif de Dragendorff sont ajoutées dans l'un des tubes et 5 gouttes de réactif de Mayer dans l'autre. L'apparition d'un précipité rouge orangé et blanc jaunâtre, respectivement, dans les tubes témoigne la présence des alcaloïdes.</p> |
| Flavonoïdes | <p>On a procédé à un mélange, à volume égal, de 5 mL d'infusé et d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95°, eau distillée, acide chlorhydrique concentré (v/v/v)) dans un tube à essai. On a ajouté au mélange 1 mL d'alcool isoamylique et quelques copeaux de magnésium. La présence de coloration rose-orangée (flavones), rose-violacée (flavonones) ou rouge cerise (flavonols) dans la couche surnageante du mélange indique la présence d'un flavonoïde libre (génine).</p> <p>On a ensuite effectué la réaction à la cyanidine sans ajouter les copeaux de magnésium puis on a chauffé le mélange au bain-marie pendant 15 minutes. Le développement d'une coloration rouge cerise ou violacée et d'une teinte brune rouge indique respectivement la présence de leucoanthocyane et de catéchols.</p> |
| Tanins | <p>Dans un tube à essai, on a introduit 1 mL d'infusé à 5 % et 200 µL de solution aqueuse de FeCl₃ à 1%. La présence des tanins galliques ou catéchiques se traduit par le développement d'une coloration verdâtre ou bleue noirâtre, respectivement.</p> |
| Anthraquinones | <p>Dans un tube à essai, introduire 1 ml de l'extrait et 1 mL de NH₄OH dilué au demi. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.</p> |

| Composés recherchés | Procédure |
|-----------------------------------|---|
| Stérols et des triterpènes | <p>0.5 g de poudre végétale est mises en agitation avec 10 mL d'éther éthylique pendant 24 heures. Le mélange est ensuite filtré et ajusté à 10 mL.</p> <p>La mise en évidence des substances stéroliques est effectuée par la réaction de Liebermann Büchard.</p> <p>1 mL de la solution étherique est évaporé à sec. Le résidu obtenu est repris par un mélange de 0.1 mL d'anhydride acétique et 0.1 mL de chloroforme. Cette solution est partagée entre deux tubes à essai ; le premier servira de référence alors que dans le 2ème tube on a introduit (dans le fond du tube) 0.1 mL de H₂SO₄ concentré. La formation d'un anneau rouge-brunâtre ou violet dans la zone de contact des deux phases et d'une coloration verte ou violette de la couche surnageante indique la présence des stérols et des triterpènes.</p> |
| Saponosides | <p>Le principe consiste à déterminer l'indice de mousse persistante pendant 20 min d'une décoction aqueuse à 5%. Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire successivement 1, 2, 3,...,10 ml de décocté. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube est agité horizontalement pendant 15 secondes puis laissé reposé pendant 15 min. On relève ensuite la hauteur de la mousse persistante en cm. Si celle-ci est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est moins de 100. La dilution dans le tube où la hauteur de la mousse est égale à 1 cm représente l'indice recherché.</p> <p>Si elle est proche de 1 cm dans le Xème tube, on calcule l'indice de mousse par la formule suivante :</p> <p>I = hauteur de mousse (en cm) dans le Xème tube x 5 / 0,0x</p> <p>La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100.</p> |

Annex 2. Relation classe chimique / Solvants (D'après Snyder 1979)

| Solvants | Classe chimique |
|---|---|
| Solvants polaires - Eau - Méthanol - Ethanol | Substances très polaires - Alcaloïdes, sels - Oses et osides - Hétérosides - Flavonoïdes Hétérosides |
| Solvants moyennement Polaires - Isopropanol - Acétonitril - Dichloromethane - Chloroforme - Acetate d'éthyle | Substances moyennement polaires - Flavonoïdes aglucones - Saponines aglucones - Alcaloïdes bases - Huiles essentielles - Hydrocarbures |
| Solvants apolaires - Ether éthylique - Hexane - Ether de pétrole | Substances apolaires - Quinones - Carotenoïdes - Stérols - Acides gras |

Annex 3 : Préparation des milieux de culture antimicrobienne

| Milieu de culture | Composition | Préparation |
|---|---|---|
| Mueller Hinton. (MH) | Macération de viande de bœuf : 300 ml Hydrolysate : 17,5 g Amidon : 1,5 g Agar : 17 g | Pour préparer ce milieu, il faut peser 38 g de poudre et la mélanger avec 1L d'eau. Il faut par la suite homogénéiser le mélange en le chauffant dans un bain marie pendant quelques minutes. Enfin, il faut stériliser la gélose à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Répartir le milieu dans des boîtes de Pétri. |
| Cystine Lactose Electrolyt Deficient. (CLED) | Peptone:4g Extrait de viande : 3g Peptone pepsique de viande : 4 g L-cystine : 0,128 g lactose : 10 g bleu de bromothymol 0,02 g agar : 13 g | 33 g de CLED sont dissous dans 1L d'eau distillée. Chauffés et homogénéisés quelques minutes dans un bain-marie Stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Répartir le milieu dans des boîtes de pétri. |
| Brain Heart Infusion broth. (BHI) | Infusion de cervelle de veau : 12,5 g/L Infusion de cœur de bœuf : 5g/L Protéase-peptone 10g/L Glucose : 2 g/L Chlorure de sodium : 5g/L Phosphate disodique : 2,5g/L. | 37 g de BHI sont dissous dans 1L d'eau distillée. Chauffés et homogénéisés quelques minutes dans un bain-marie Stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Répartir le milieu dans des tubes ou des flacons. |
| Milieu Sabouraud | Peptone : 10 g Glucose massé : 20 g Agar-agar:15 g Eau distillée (qsp) : 1000 ml vitamines | 15 g de poudre de Sabouraud gélose sont dissous dans 1litre d'eau distillée. Il faut par la suite homogénéiser le mélange en le chauffant dans un bain marie pendant quelques minutes. Enfin, il faut stériliser la gélose à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Répartir le milieu dans des boîtes de pétri. |



Evaluation of essential oils for antimicrobial activity from some Moroccan aromatic plants medicinal

A.M. Abudunia¹, H. Hafidi², M. Algabr³, J. Akachar⁴, H. Almahbashi⁵,
Y. Ramli⁶, M. Ansar⁷, A. Ibrahim⁸, K. Khedid⁹

^{1,4,8}Department of Biotechnology Laboratory (Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, Morocco.

³Department of Chemistry Laboratory, Faculty of Applied Sciences, University Hajjah, Yemen.

⁵Department of Forensic medicine and clinical toxicology, Faculty of Pharmacy, University Sana'a, Yemen.

^{6,7}Department of Medicinal Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University Rabat, Morocco.

^{2,9}Department of Bacteriology, Institute National of Health, PB 769, Avenue Ibn Batouta, Rabat, Morocco.

Received 20 Augst 2016,
Revised 27 July 2017,
Accepted 30 July 2017

Keywords

- ✓ Moroccan medicinal plants.
- ✓ Antimicrobial activity,
- ✓ MIC,
- ✓ MBC

Corresponding authors:

abdemalek.dunia@um5s.net.ma
Phone:
00212621 323880. Mohammed.EI.MORHIT
morhit_med@yahoo.fr

Abstract

Biological properties associated to many medicinal and aromatic plants have recently gained a great popularity and scientific interest. The plants have been reported to have antimicrobial, antiviral, antiparasitic and antidermatophytic properties. The present study aims to evaluate the antimicrobial activity of four distilling essential oils from four Moroccan medicinal and aromatic plants (*S. aromaticum*, *E. rossi*, *R. officinalis* and *T. vulgaris*). Antimicrobial activity screening was conducted by the well diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines using 7 gram positive, 14 gram negative bacteria and 6 species of *Candida spp.* The results indicated that essential oils of *R. officinalis* and of *T. vulgaris* showed high inhibitory activity against all the investigated bacterial strains except essential oil of *Thymus vulgaris* was inactive for *P. mirabilis*. Also essential oil of *E. rossi* was active against 14 strains among 21 strains tested, while essential oil of *S. aromaticum* was inactive for most the investigated bacterial strains. MIC values of *S. aromaticum*, *R. officinalis* and *T. vulgaris* were between 6.25-12.5-25µg/ml and were bactericidal for most bacterial strains. While, MIC values of *E. rossi* were between 12.5-25µg/ml and bactericidal for all investigated bacterial strains. All essential oils showed that have the maximum antimycotic activity against all types of investigated candida strain. In conclusion, our results confirm that these oils plants which can be used to cure infections and can also have pharmaceutical and preservatives properties.

1. Introduction

Medicinal and aromatic plants have a great promising for producing new drugs of great benefit to humanity. There are many approaches to the search for new biologically active principles in higher plants [1]. Many efforts have been done to discover new antimicrobial compounds from various kinds of sources such as soil, microorganisms, animals and plants. One of such resources is folk medicine and systematic screening of them may result in the discovery of novel effective compounds [2]. Further, scientific investigation and information of the therapeutic potential of the plant material is limited. Despite the existence of potent antibiotic and antifungal agents, resistant or multi-resistant strains are continuously appearing, imposing the need for a permanent search and development of new drugs [3]. Microorganisms have developed resistance to many antibiotics and as a result, immense clinical problem in the treatment of infectious diseases has been created [4]. This situation forced the researchers to search for new antimicrobial substance from various sources including medicinal and aromatic plants [5]. In traditional medicine, medicinal herbs and plant products were used in treating a wide spectrum of infections and other diseases. Today, a great number of different medicinal tea and other plant products are available in market (including cosmetics and pharmaceuticals), which contains biologically active substances.

In recent years, there has been a gradual revival of interest in the use of medicinal and aromatic plants in developed as well as in developing countries because plant-derived drugs have been reported to be safe and without side-effects. A survey of literature reveals that there are many essential oils which possess antimicrobial activity [6].

In general, essential oils plant-derived are considered as non-phytotoxic compounds and potentially effective against several microorganisms including many bacterial and fungal pathogens [7,8]. The aim of this study was to determine the efficacy of essential oils extracted from aromatic plants medicinal growing in Morocco against 21 bacterial strain and 6 fungal strain

2. Material and Methods

2.1. Preparation of essential oils

The dried aerial plant of *S. aromaticum*, leaves and flowers of *R. officinalis*, *T. vulgaris* and only leaves of *E. rossi* were collected based on ethno pharmacological information from the villages around the Errachidia region located on the south east of Morocco.

These oils were hydro distilled in a Clevenger apparatus (Sigma Chemical Company) for 5 hours accordance with the British Pharmacopoeia [9]. The obtained essential oils were dried and, after filtration were stored in a sealed glass vial in a refrigerator at 4 °C until required. These all oils of above plants were screened for their antimicrobial activity.

2.2. Microorganisms used

The test organisms used included: 7 gram positive and 14 gram negative bacteria strains namely : *R. equi*, *S. aureus*, *S. aureus MDR*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *Listeria spp*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa 1*, *P. cepacia*, *P. Aeruginosa ATCC27853*, *A. baumannii*, *S. blockley*, *S. aequatoria*, *S. braenderup*, *P. rettgeri MDR*, *P. mirabilis*, *M. morgani*, *E. coli enteropathogenes*, *E. coli 1*, *E. coli 2*, *E. coli MDR* and 6 yeast strains (*C. tropicalis 2*, *C. famata 2* and *C. glabrata 2*).

These strains were obtained from three different sources; the American Type Culture Collection (ATCC, USA), Bacteriology Laboratory of the National Institute of Hygiene (Morocco) and Institute of Agronomy and Veterinary (Morocco). All media used were manufactured by Oxoid Basingstoke, Hampshire, England. All bacteria and fungi were stored in BHI (Brain and Heart Infusion broth) containing 30 % (v/v) glycerol (Sigma-Aldrich) at -20°C. Prior to use bacterial strains were first grown in Muller Hinton agar (MHA) at 37°C for 24 hours.

2.3. Culture Media and Antimicrobial Assay

Mueller-Hinton agar (MH) and Sabouraud Dextrose agar (SD) medium (Hi-Media, Bombay, India) were respectively used for bacteria and yeasts growth at 37 and 30°C were appropriately diluted in sterile normal saline solution to obtain the cell suspension at 10⁵ CFU/mL.

To evaluate antimicrobial activity, an agar well diffusion method was used as described by Nongpanga et al., [10]. The organisms were spread on MH and SD agar plates by cotton swab. Wells of 6 mm diameter were punched into the agar medium and filled with 50 µL/mL of plants oils. The plates were incubated for 24 h at 37°C for bacteria and 48 h at 30°C for yeast. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition zone diameter against the test organism.

3. Results and discussion

The four aromatic medicinal plants investigated in present work (*S. aromaticum*, *R. officinalis*, *T. vulgaris*, *E. rossi*) have wide use in Moroccan traditional medicine, for treatment of gastric disease, pharyngitis, cough and other problem health.

The results of antimicrobial activity of four essential oils are presented in Table 1, have showed that the *R. officinalis* and of *T. vulgaris* oils has a good activity against all investigated bacteria strains (gram positive and

gram negative bacteria) except essential oil of *T. vulgaris* was inactive for *Proteus mirabilis* and the diameters of zone inhibition of these oils were between 8–26mm, with MDI (The mean diameter of inhibition) are 18.14 mm for gram positive and 15.14 mm for gram negative bacteria respectively, it was found to have maximum zone of inhibition against *R. equi* (26 mm) while the minimum zone of inhibition was against *E. coli 2* (8mm).

Table 1: Antibacterial activity of essential oils of some Moroccan plants medicinal (Diameters of zone inhibition (mm))

| Bacterial | Bacterial strains tested (N=21) | ESA | EER | ERO | ETV |
|-----------------------------|---|------------|-----------|-----------|-----------|
| Gram + | <i>Rhodococcus equi</i> | 24 | 22 | 26 | 16 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 0 | 10 | 12 | 15 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> MDR | 0 | 20 | 18 | 15 |
| | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 0 | 0 | 12 | 10 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 15 | 12 | 16 | 10 |
| | <i>Listeria spp</i> | 10 | 18 | 20 | 20 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 8 | 0 | 20 | 12 |
| | MDI (%) | 8.2 | 12 | 18 | 14 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosal</i> | 0 | 0 | 10 | 12 |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 10 | 18 | 18 | 16 |
| Gram - | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 | 0 | 0 | 15 | 10 |
| | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0 | 17 | 10 | 20 |
| | <i>Salmonella blockley</i> | 0 | 18 | 16 | 20 |
| | <i>Salmonella aequatoria</i> | 0 | 20 | 22 | 22 |
| | <i>Salmonella braenderup</i> | 0 | 10 | 12 | 15 |
| | <i>Proteus rettgeri</i> MDR | 9 | 0 | 17 | 12 |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 0 | 0 | 18 | 0 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 0 | 20 | 18 | 16 |
| | <i>E. coli enteropathogenes</i> | 0 | 0 | 16 | 12 |
| | <i>Escherichia coli 1</i> | 0 | 0 | 15 | 10 |
| | <i>Escherichia coli 2</i> | 10 | 8 | 8 | 12 |
| <i>Escherichia coli</i> MDR | 10 | 15 | 15 | 18 | |
| MDI (%) | 3 | 9 | 15 | 14 | |

ESA: Essential oil of *S. aromaticum*, EER: Essential oil of *Eucalyptus rossi*, ERO: Essential oil of *R. officinalis*, ETV: Essential oil of *T. vulgaris*, MDI: Mean Diameter of Inhibition.

Essential oil of *E. rossi* was active against 14 strains from 21 strains tested except *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosal*, *P. aeruginosa* ATCC27853, *P. rettgeri* MDR, *Proteus mirabilis*, *E. coli* *Enteropathogenes*, *E. coli*. While essential oil of *S. aromaticum* was active against 8 from 21 investigated bacterial strains tested with MDI (The mean diameter of inhibition) 8.2mm for Gram positive and 3mm for Gram negative. It was found to have maximum zone of inhibition against *R. equi* (24mm) while the minimum zone of inhibition was against *L. monocytogenes* (8mm).

In our research of *T. vulgaris*, those results are in accordance with the strong toxic properties of ETV and its active compounds, such as thymol and carvacrol, against a large number of microorganisms described by Soliman et al., [11]. Also oils of *S. aromaticum*, the major compound were *eugenol*. Eugenol is phenol and it is one of the aromatic compounds containing many free phenol groups and the antimicrobial activity increased by increasing these groups, this finding is in agreement with Al-Zubaydi and Al-Hmdany [12] who had found that the biological effects of the essential oils depends on the type and quantity of active compounds.

The chemical compositions of the leaf oils of various *Eucalyptus* species had been reported with Singh et al, [13]. The major component was 1,8-cineole, but a main contributor for the bioactivity was assumed to be α -terpineol, which showed eight-fold higher activity than 1,8-cineole against *S. aureus* 1, 8-Cineole had not been reported as an active principle in other eucalyptus oils (Inouye et al., [14]. Our results are in accordance with other studies who had found that antibacterial activity of leaf essential oils of *E. globulus* and *E. camaldulensis* [15].

The major compounds in the essential oil were α -pinene, borneol, camphene, camphor, and verbenone and bornylacetate. An inhibitory effect on fungal growth, especially toward *F. graminearum*, was observed. Essential oils of *rosemary* exhibited an intermediate antifungal activity (MIC=1.10 mg/mL) against *C. albicans* [16].

MIC and MBC values of *S. aromaticum*, *R. officinalis* and *T. vulgaris* were between 6.25-12.5-25 μ g/ml and were bactericidal except *E. faecalis*, *L. monocytogenes* and *S. aureus* MDR (Tables 2, 3, 4 and 5). It is bacteriostatic, and while MIC values of *E. rossi* were between 12.5-25 μ g/ml and were bactericidal for all investigated bacterial strains except *S. aureus*. It is bacteriostatic, confirming our previously published results [17].

Table 2: Determination of MIC and MBC of essential oil of *S. aromaticum*

| Bacterial strains | Bacterial strains tested | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) |
|-------------------|-------------------------------|-------------|-------------|
| Gram+ | <i>Rhodococcus equi</i> | 6.25 | 6.25 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 12.5 | ND |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 12.5 | ND |
| | <i>Listeria spp</i> | 25 | 25 |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 25 | 25 |
| Gram- | <i>Proteus rettgeri</i> MDR | 25 | 25 |
| | <i>Escherichia coli</i> 1 | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Escherichia coli</i> 2 | 25 | 25 |
| | <i>Escherichia coli</i> MDR | 25 | 25 |

MIC = Minimum Inhibition Concentration, MBC = Minimum Bactericidal Concentration, ND = No Detected

Table 3: Determination of MIC and MBC of essential oil of *E. rossi*

| Bacterial strains | Bacterial strains tested | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) |
|-------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|
| Gram+ | <i>Rhodococcus equi</i> | 25 | 25 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> SARM | 12.5 | - |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 25 | 25 |
| | <i>Listeria spp</i> | 25 | 25 |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 25 | 25 |
| Gram- | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 25 | 25 |
| | <i>Salmonella aequatoria</i> | 25 | 25 |
| | <i>Salmonella braenderup</i> | 25 | 25 |
| | <i>Salmonella blockley</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Escherichia coli</i> 1 | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Escherichia coli</i> MDR | 25 | 25 |

Table 4: Determination of MIC and MBC of essential oil of *R. officinalis*

| Bacterial strains | Bacterial strains tested | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) |
|-------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|
| Gram+ | <i>Rhodococcus equi</i> | 25 | 25 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> MDR. | 25 | 25 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 25 | 25 |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 25 | 25 |
| | <i>Listeria spp</i> | 25 | 25 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1 | 25 | 25 |
| Gram- | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 25 | 25 |
| | <i>Salmonella braenderup</i> | 25 | 25 |
| | <i>Salmonella aequatoria</i> | 6.25 | 6.25 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 12.5 | 12.5 |

Table 5: Determination of MIC and MBC of essential oil of *T. vulgaris*

| Bacterial strains | Bacterial strains tested | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) |
|-------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|
| Gram+ | <i>Rhodococcus equi</i> | 6.25 | 6.25 |
| | <i>Staphylococcus aureus MDR.</i> | 25 | 25 |
| | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 25 | 25 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 25 | 25 |
| | <i>Listeria spp</i> | 12.5 | 12.5 |
| Gram- | <i>Pseudomonas aeruginosal</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Pseudomonas cepacia</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Acinetobacterbaumanii</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Salmonella blockley</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Salmonella braenderup</i> | 25 | 25 |
| | <i>Salmonella aequatoria</i> | 12.5 | 12.5 |
| | <i>Morganella morganii</i> | 25 | 25 |
| | <i>Escherichia coli1</i> | 25 | 25 |
| | <i>Escherichia coli2</i> | 12.5 | 12.5 |

Our results as antimycotic activity showed that all investigated essential oils of *T. vulgaris*, *S. aromaticum*, *R. officinalis* and *E. rossi* had antifungal activity against all tested fungi (table 6).

The highest degree of antifungal activity showed by essential oil of *T. vulgaris* followed by essential oil of *S. aromaticum*, *R. officinalis* and *E.rossi*, with a mean of inhibition zone are 32 mm, 30 mm, 29mm and 27 mm respectively. These results are in accordance with reports on the antifungal activity of medicinal species belonging to the Myrtaceae family include the herbal food clove *S. Aromaticum* (Merrand Perry) [18] and extracts of *E. globules Labill.* This significantly inhibited the growth of the fungus *T.mentagrophytes* [19] and Lamiaceae family include *R. officinalis* and *T. vulgaris* [20].

Table 6: Antifungal activity of essential oils of some Moroccan plants medicinal. Diameters of zone inhibition (mm) of EO of (MAP)

| Fungal strains | Fungal strains tested | ESA | EER | ERO | ETV |
|-------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|
| 1 | CT1 | 28 | 24 | 24 | 34 |
| 2 | CT2 | 32 | 30 | 30 | 30 |
| 3 | CF1 | 30 | 30 | 24 | 30 |
| 4 | CF2 | 30 | 24 | 35 | 35 |
| 5 | CG1 | 30 | 30 | 35 | 30 |
| 6 | CG2 | 30 | 22 | 24 | 30 |
| Total of inhibition (%) | | 180 | 160 | 172 | 189 |
| MDI (%) | | 30 | 27 | 29 | 32 |

CT1 *C. tropicalis*1, CT2 *C. tropicalis*2, CF1 *C. fumigati*1, CF2 *C. fumigati*2, CG1 *C. glabrata*1, CG2 *C. glabrata*2, ESA: Essential oil of *S. aromaticum*, EER: Essential oil of *E. rossi*, ERO: Essential oil of *R. officinalis*, ETV: Essential oil of *T. vulgaris*, MAP: Medicinal and Aromatic Plants.

Conclusion

In recent years a large number of essential oils and their constituents have been investigated for their antimicrobial properties against bacteria and fungi. There is vast diversity among aromatic and medicinal plants. In our study demonstrates that the essential oils which has shown the best antimicrobial activity in well diffusion methods were attributed to *R. officinalis* and *T. vulgaris* and according to the results mentioned, it is confirm that these oils plants can be used to cure infections and can also have pharmaceutical and preservatives properties.

Author contribution

Mohammed EL MORHIT carried out the data analysis and drafted the manuscript and provided the conceptual guidance and polished the manuscript. This author read and approved the final manuscript.

Acknowledgement—The authors thank colleagues, technicians for their helpfulness and assistance during the experiments. This study was partly supported by Department of Bacteriology of the National Institute of Health, Rabat, Morocco.

References

1. Farnsworth N.R., Loub W., Washington D.C., *COTA178* (2002) 195 page.
2. Janovska D., Kubikova K., Kokoska L., *J. F. Sci.* 21(2014) 107–111.
3. Silver L.L., *AAg. Chemother.* 37(1993) 377–383.
4. Davies J., *Science.* 264 (1994) 375–382.
5. Bauer AW., Kirby WM., Sherris JC., Turk M., *J. Clin. Pathol.* 44 (2000) 493–496.
6. Bansod S., Rai M. W., *J.M Sciences* 3 (2) (2008) 81–88.
7. Pandey DK., Tripathi NN., Tripathi RD., Dixit SN., *Angew Bot.* 56(2007) 259–267.
8. Chuang PH., Lee CW., Chou JY., Murugan M., Shieh BJ., Chen HM., *Biores Tech.* 98 (2016) 232–236.
9. British Pharmacopoeia, H.M.S. Office., London. 2 (1980) 109–110.
10. Nongpanga K., Aporn W., Duangtip M., Sukon T., *Kmitl Sci. Tech. J.*, 1 (2008) 8–17.
11. Soliman K.M., Badea R.L., *J. Food. Chem. Toxic* 40 (2002) 1669–1675.
12. Al-Zubaydi S.R., Al-Hmdany M.A. and Raesan S.J., *J. D. University*, 12(1)(2011) 244–249.
13. Singh N., *Clinical Infect Diseases*, 33(10) (2001) 1692–1696.
14. Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H., *J. Antimicrob. Chemother.* 47 (2001): 565–73.
15. RahoGhalem B., Benali M., *A J.P.P.* (2008): 211–215.
16. Dalleau S., Cateau E., Berges T., Berjeaud J. and Limbert C., *Int. J. A. Agents.* (2) 29 (2008) 572–6.
17. Abudunia A.M., Ansar M., Taoufik J., Ramli Y., Essassi EM., Ibrahimi A., Khedid K., *J CPR* 6 (8) (2014) 156–161.
18. Taguchi Y., Ishibashi H., Takizawa T., Inoue S., Yamaguchi H., Abe S., *Nihon Ishiikin Gakkai Zasshi* 46 (2010) 13–21.
19. Takahashi T., Kokubo R., Sakaino Lett M., *J. Appl. Microbiol.* 39 (2004) 60–4.
20. Giordani R., Regli P., Kaloustian J., Mikail C., Abou L., Portugal H., *J. Phytother. Res.* 18 (2004) 990–5.

(2017) ; <http://www.jmaterenvirosci.com>

Screening of Yemeni medicinal plant for antibacterial and Antifungal activates

¹Methaq Algabr, ²Nabil Al-Hajj, ³Abdul-malik Abu Dunia, ⁴Abderrahmane Romane and ¹Hussein Al-Wadhaf

¹Department of Chemistry, Laboratory of Chemistry, Faculty of Applied Sciences, University of Hajjah, P.O. Box 80004, Hajjah, Yemen.

²Department of Chemistry, Marine Science and Biological Research Authority, Aden, P.O. Box 1231, Aden, Yemen.

³Department of Biotechnology, Laboratory(Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed VUniversity Rabat, Morocco.

⁴Department of Chemistry, Faculty of Sciences Semlalia, University of Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco.

Received 25 April 2016; Accepted 28 May 2016; Available 2 June 2016

Address For Correspondence:

Methaq Algabr, Department of Chemistry, Laboratory of Chemistry, Faculty of Applied Sciences, University of Hajjah, P.O. Box 80004, Hajjah, Yemen.
E-mail methag511@gmail.com Tel : +967 777490890

Copyright © 2016 by authors and American-Eurasian Network for Scientific Information (AENSI Publication).

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

ABSTRACT

Background:The genus *Pulicaria*, which belongs to the family Asteraceae (tribe Inuleae), contains more than 77 species that occur throughout the world. *Pulicariajaubertiis* one of the valuable medicinal plants used in Yemen's folk medicine, locally known as AnssiF. The aerial parts of the plant are used as antibacterial, anti-diarrhoeal and antispasmodic agent. **Objective:** to evaluate antibacterial and antifungal activities of aqueous extracts from *Pulicariajaubertii* and their application on pathogenic bacteria. **Results:** The ethylacetate (C₆H₁₂O₃), chloroform (CHCl₃) and *n*-butanol (C₄H₁₀O) extracts of *Pulicariajaubertii* aerial parts were tested for their antibacterial activity using the disc-diffusion assay technique. The C₆H₁₂O₃ extract was found to be the most effective extract against three tested bacteria. **Conclusion:** *P.jaubertii* leaves possess significant antimicrobial and antifungal activities.

KEYWORDS: *Pulicariajaubertii*, Antifungal, antibacterial, medicinal plant.

INTRODUCTION

Medicinal plants used in traditional medicine and healing are among natural antioxidant sources. Plants are rich sources of phenolic compounds such as flavonoids, tannins and anthocyanin's, which are the most important natural antioxidants [1]. Plants provide flavors, fragrances and traditional medicines as part of everyday life. Approximately 3000 plant species contain therapeutic activities, of which only 300 are commercially important [2]. The genus *Pulicaria*, which belongs to the family Asteraceae (tribe Inuleae), contains more than 77 species that occur throughout the world. Chemical analysis of the genus has shown the occurrence of molecules such as monoterpenes, diterpenes, sesquiterpene lactones and caryophyllane derivatives [3], [4]. *Pulicaria* species display various activities, including antibacterial and antifungal activities [5]. However, to the best of our knowledge, there are not studies of the detailed antibacterial and antifungal activity evaluation of *Pulicariajaubertii* via chemical solvents. *P. jaubertiis* is an aromatic, endemic plant growing wild in northwest Yemen. It is an herbaceous, branched, creeping, woolly rooted perennial. Its leaves are narrow, ovate lanceolate in shape, and endowed with a very strong odor. The flowers are yellow when they bloom in March-May. The plant is common in woodlands, in rockeries on dry rocky pastures, and on plain and low mountains up to 1500 m. This Yemeni medicinal plant, known locally as "AnssiF", is used for the treatment of various inflammatory disorders and also as an herbal tea [6]. Various biological activities have been reported for some species of *Pulicaria*, such as

To Cite This Article: Methaq Algabr, Nabil Al-Hajj, Abdul-malik Abu Dunia, Abderrahmane Romane and Hussein Al-Wadhaf., Screening of Yemeni medicinal plant for antibacterial and Antifungal activates. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 10(8); Pages: 28-32

cytotoxic activity of *P. crisper* and *P. orientalis*[7]. Antibacterial activity of *P. undulate*, *P. odora* and *P. dysenterica* [8],[9], antispasmodic activity of *P. glutinosa*[10],and antihistaminic effect of *P. dysenterica*[11]. Also different species of *Pulicaria* has been traditionally used to reduce the symptoms of flu and common cold [12], treat back-pain, intestinal disorders [13], treat inflammation and also as an insect repellent [14].

This study was undertaken to investigate the in vitro inhibitory effects of a number of organic solvents, differing in chemical composition, against antibacterial and antifungal.

MATERIALS AND METHODS

Plant material:

The aerial parts of the *P. jaubertii* were collected during the flowering season (August–September 2015) from Aljar (a mountainous region) in Hajjah city located in the northwest Highlands of Yemen at geographic coordinates: Latitude (15°41'39" N) and Longitude (43°36'20" E) [15]. Botanical identification was made by Dr. Abdellah Amine (Sana'a University Department of Biology in the College of Agriculture at Sana'a University), according to "A handbook of the Yemen flora" [16]. The aerial parts of the *P. jaubertii* were dried for 10 days at room temperature (23–25°C) in a shaded place and milled using an electrical mill. Moisture contents (%) of the *P. jaubertii* powder were measured in triplicate according to the American Association of Cereal Chemists (AACC) method[17], using a laboratory oven at 105 °C until constant weight was achieved (6.8%, w/w). The powdered samples were kept in a dry, cool and dark place.

Preparation of crude plant extract:

Forty grams leaves from *P. jaubertii* was individually extracted with 600 ml of 90% Ethyl acetate ($C_6H_{12}O_3$), Chloroform ($CHCl_3$) and *n*-Butanol ($C_4H_{10}O$) (separately) in an ultrasonic device at room temperature, The extracts were filtered and the residues were re-percolated for three times and was eliminated from the solvent using a rotary evaporator and sample was preserved at 4 °C until used.

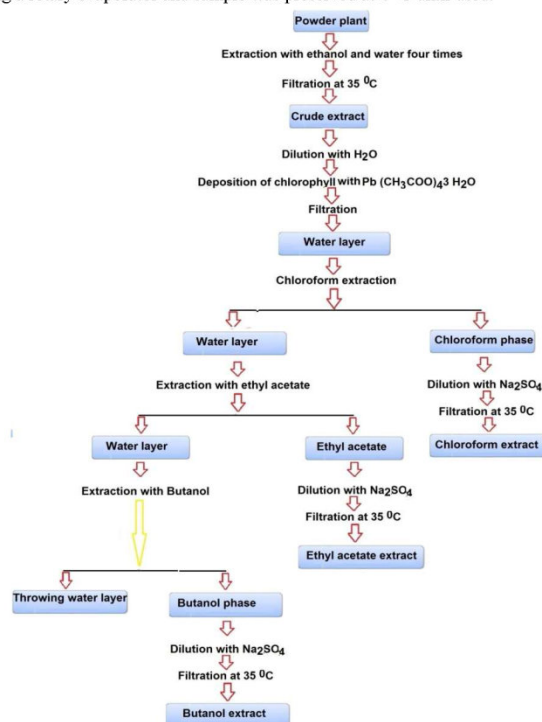


Fig. 1: Shows various steps that have been followed in extraction process

*Evaluation of antibacterial activity:**Bacterial Strains:*

The antibacterial activity of the *P. jaubertii* crude extracts was investigated against a representative range of Gram-negative: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), in addition the one fungal strain *Candida albicans* (ATCC 90028). These clinical bacterial strains were supplied by the laboratory of Microbiology, national center, Sana'a-Yemen. All bacterial strains were first identified and sub cultured in sterile bottles containing nutrient broth, and incubated for 24 h at 35°C [18]. Bacterial suspensions were made in sterile deionized distilled water with a density of McFarland standards (0.5) in order to obtain a bacterial concentration about 1.5×10^8 colony forming units (CFU)/ml. The antibacterial effect was evaluated using the disk diffusion halo test as described by Othman et al. [19]. Ceftriaxone, ampicillin and amphotericinB were used as positive references (5 µg/mL).

Agar well diffusion method:

The nutrient agar was prepared according to SCR manufacturer's specification, and then autoclaved at 121°C, with a pressure of 15 lbs for 20 min. The sterile medium was allowed to cool for a few minutes before pouring into sterilized petri dishes. After medium became solid, wells (6 mm in diameter) were made. The cultured bacteria were swabbed onto agar medium. Each extract was reconstituted in the extracting solvent and the concentrations of 512, 265, 128, 64 and 32 µg/ml were made of each sample. The plates were then incubated at 37 °C for 24 h (bacteria) or at 32 °C for 72 h (yeast). Penicillin, Ceftriaxone and amphotericinB (10 µg/mL) were used as control. After an incubation time, the inhibition zone was measured.

Statistical analysis:

The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements. The Duncan's multiple range tests was used to determine differences at each point. Differences at each point were considered significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The antimicrobial activities of *P. jaubertii* were evaluated using the agar diffusion method against 3 test microorganisms, including 2 bacteria (1 Gram-positive and 1 Gram-negative) and 1 fungi. The results obtained were almost the same observed for antibiotic Ampicillin, Ceftriaxone and AmphotericinB used as a positive probe Table 1. The results of antibacterial activity presented in Table 2. With regard to the *P. jaubertii* treatments in the current study, there was a positive relationship between the inhibition zone (mm) and the increase of concentration. The $C_6H_{12}O_3$ showed the higher effect than $CHCl_3$ and $C_4H_{10}O$ on both Gram-negative, Gram-positive and Fungi strains at all concentrations, as shown in Table 2. Different extracts (ethyl acetate, chloroform and *n*-Butanol) of *P. jaubertii*, used in traditional Yemeni folk medicine, were screened for its antibacterial activity against two bacterial and one fungi strains. The results are presented in Table 2. No antibacterial activity could be found in our study for the *n*-Butanol extracts. The ethyl acetate extracts showed antibacterial activity against *S. aureus* (Table 1). Data of *P. jaubertii* obtained in our study were in accordance with previous reports [6], [20]. The halo that gave a diameter less than 9 mm was ignored. According to the literature, the sensitivity of the Gram-positive bacteria compared to Gram-negative bacteria can be attributed to the cell membrane constituents, where the Gram-positive bacteria contains an outer peptidoglycan layer, which was an ineffective permeability barrier [21], whereas Gram-negative bacteria contains lipopolysaccharides in their outer membrane [22]. For this reason, the Gram negative strains (*Pseudomonas aeruginosa*) was more resistance than Gram positive strains (*Staphylococcus aureus*). Based on this study, results of Table 2.

Table 1: Percentage inhibition of standard drugs (5 µg/mL) against different microorganisms

| | Percentage inhibition ^a | | |
|-------------------------------|--|---|--|
| | Ampicillin | Ceftriaxone | amphotericinB |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | C ₆ H ₁₂ O ₃ : 21±1.1 CHCl ₃ : 23±1.8 C ₄ H ₁₀ O : mm> | C ₆ H ₁₂ O ₃ : mm> | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | CHCl ₃ : mm> C ₄ H ₁₀ O : mm> | - |
| <i>Candida albicans</i> | - | - | C ₆ H ₁₂ O ₃ : 22±1.3 CHCl ₃ : 18±1.1 C ₄ H ₁₀ O : mm> |

Percentage inhibition^a: Inhibition zone in diameter (mm) of Ampicillin, Ceftriaxone and AmphotericinB (10 µg /disc) were used as positive reference standards antibiotic discs.

Table 2: Antibacterial activity of *P. jaubertii* aerial parts

| Concentrations | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Candida albicans</i> |
|---|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| zone of inhibition (mm) ^a | | | |
| C₆H₁₂O₃ | | | |
| 512 | 30±0.5 | 40±0.1 | 13±0.5 |
| 256 | 24±0.4 | 28±0.4 | 20±0.5 |
| 128 | 22±0.3 | 33±0.2 | 21±0.4 |
| 64 | 29±0.3 | 32±0.1 | 19±0.3 |
| 32 | 19±0.3 | 30±0.6 | NT |
| CHCl₃ | | | |
| 512 | 35±0.4 | mm> | 30±0.2 |
| 256 | 32±0.3 | mm> | 30±0.6 |
| 128 | 33±0.5 | mm> | 25±0.7 |
| 64 | 32±0.2 | mm> | 16±0.1 |
| 32 | 30±0.5 | mm> | 21±0.5 |
| C₄H₁₀O | | | |
| 512 | mm> | mm> | 11±0.6 |
| 256 | mm> | mm> | 9±0.6 |
| 128 | mm> | mm> | NT |
| 64 | mm> | mm> | NT |
| 32 | mm> | mm> | NT |

^a Inhibition zone (mm) including disk diameter (6 mm)

NT = not activity

< 9 mm no active

Conclusions:

The data presented in Table 1 indicate that the extracts from *P. jaubertii* herb inhibit the growth of some of the tested micro-organisms to various degrees. The C₆H₁₂O₃ extract was found to be the most effective antimicrobial agent. It showed activity against three of the tested bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*) appeared to be the most sensitive bacteria and all of the extracts were active against it. These results may justify some of the reported uses of the plant in traditional medicine. The strong antibacterial activity of *P. jaubertii* extract suggests its potential as a food additive and candidate for clinical development as a new broad-spectrum bioactive compound. However further studies aimed at determining the anticancer and diabetes properties of the other major constituents of *P. jaubertii* leaf essential oil, as well as identifying the oil's unknown compounds, are necessary to fully understand its bioactivity. *P. jaubertii* could be prepared and added to the commercial vegetable oils as natural antioxidant and suitable alternative for synthetic antioxidants such as BHT.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr Abdulla Amin (Department of Biology in the College of Agriculture, Sana'a University, Yemen) for identification of the plant. Special thanks and greets to Mr. SharafAlkulanifor his support research scientific.

REFERENCES

- Shariatifar, N., A. Kamkar, Shams, M. Ardekani, A. Misaghi, A.H.G. Jamshidi, JahedKhaniki, 2012. Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant *Pulicariagnaphalodes*. *Ofogh-e Danesh.*, 18: 35-41.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Hanbali, F.E., M. Akssira, A. Ezoubeiri, F. Mellouki, A. Benherraif, A.M. Blazquez and H. Boira, 2005. [Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicariaodora* L.](#) *Journal of ethnopharmacology*, 99(3): 399-401.
- Al-Hajj, N.Q.M., H.X. Wang, C. Ma, Z. Lou, M. Bashari and R. Thabit, 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of some aromatic medicinal plants (*Pulicariainuloides*-Asteraceae and *ocimumforskolei*-Lamiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(8): 1287-1293.
- El-Kamali, H.H. and S.A.T. Mahjoub, 2009. Antibacterial activity of *Francoeuriacrispa*, *Pulicariaundulata*, *Ziziphusspina-christi* and *Cucurbitapepo* against seven standard pathogenic bacteria. *Ethnobotanical Leaflets*, (6): 6.
- Al-Hajj, Nabil, Qaid, M. Chaoyang, Ma., Riyadh. Ammar. Thabit, A.A. Mohammed. Al-alfarga, Abubakr, Gasmalla, Musa, Waleed, Aboshora and Hongxin, Wang, 2014. Chemical composition of essential oil and mineral contents of *Pulicariainuloides*. *J. Acad. Indust. Res.*, 2: 675-678.
- Ali, N.A., W.D. Jülich, C. Kusnick and U. Lindequist, 2001. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2): 173-179.

8. El-Kamali, H.H., A.H. Ahmed, A.S. Mohammed, A.A.M. Yahia, I.H. El-Tayeb and A.A. Ali, 1998. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. *Fitoterapia*, 69(1): 77-78.
9. Ali, N.A., F.S. Sharopov, M. Alhaj, G.M. Hill, A. Porzel, N. Arnold and L. Wessjohann, 2012. Chemical composition and biological activity of essential oil from *Pulicaria undulata* from Yemen. *Natural product communications*, 7(2): 257-260.
10. Tanira, M.O.M., B.H. Ali, A.K. Bashir, I.A. Wasfi and I. Chandranath, 1996. Evaluation of the relaxant activity of some United Arab Emirates plants on intestinal smooth muscle. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 48(5): 545-550.
11. Mahfouz, M., A. Ghazal, M. El-Dakhkhny and M.T. Ghoneim., 1973. Pharmacological studies on the active principle isolated from *Pulicaria dysenterica*. *Journal of Drug Research*, 5(2): 151-172.
12. Huang, S.Z., L.B. Li, S.P. Jiang, X.L. Chen and H.J. Zhu, 2010. A Rarely Reported Trinorsesquiterpene - Type Structure in an Isolate from *Pulicaria insignis*. *Helvetica Chimica Acta*, 93(9): 1808-1811.
13. Ezubeiri, A., C.A. Gadhi, N. Fdil, A. Benharref, M. Jana and M. Vanhaelen, 2005. Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odorata* L. *Journal of ethnopharmacology*, 99(2): 287-292.
14. Stavri, M., K.T. Mathew, A. Gordon, S.D. Shnyder, R.A. Falconer and S. Gibbons, 2008. Guaianolides sesquiterpenes from *Pulicaria crispata* (Forssk.) Oliv. *Phytochemistry*, 69(9): 1915-1918.
15. Geographic coordinates of Ta'izz, Yemen. Available from: <http://dateandtime.info/citycoordinates.php?id=75337> [14 March 2015].
16. Wood, J.R.I., 1997. *A Handbook of the Yemen Flora*, Kew, Royal Botanic Gardens., p: 252.
17. AACC, 1983. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. AACC Method 44-19, eighth ed., AACC, St Paul, MN, USA.
18. Li, L., X. Feng, M. Tang, W. Hao, Y. Han, G. Zhang, S. Wan, 2014. Antibacterial activity of Lansiumamide B to tobacco bacterial wilt (*Ralstoniasolanacearum*). *Microbiol. Res.*, 169: 522-526.
19. Othman, M., H.S. Loh, C. Wiant, T.J. Khoo, K.H. Lim, K.N. Ting, 2011. Optimal method for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *J. Microbiol. Methods.*, 84: 161-166.
20. Mossa, J.S., M. Tariq, A. Mohsin, A.M. Ageel, M.A. al-Yahya, M.S. Al-Said, S. Rafatullah, 1991. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. *American Journal of Chinese Medicine.*, 19: 223-231.
21. Baba, S.A. and S.A. Malik, 2014. Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of methanolic extracts of *Gentiana kurroo* royle, *Saudi J. Biol. Sci.*, 21: 493-498.
22. Alzoreky, N.S. and K. Nakahara, 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, *Int. J. Food Microbiol.*, 80: 223-230.

Available online at www.derpharmachemica.com



Scholars Research Library

Der Pharma Chemica, 2015, 7(11):193-196
(<http://derpharmachemica.com/archive.html>)



ISSN 0975-413X
CODEN (USA): PCHHAX

Flavonoids glycosides from leaves of *Catha edulis* (Celastraceae)

^{1,3}Methaq Algabr*, ²Abdul-malik Abu Dunia, ¹Hanane Aissaoui, ¹Leila Hammoud, ¹Ratiba Mekkiou, ¹Samir Benayache and ¹Fadila Benayache

¹Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physico-chimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université des frères Mentouri Constantine, Algérie

²Department of Biotechnology, Laboratory (Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University Rabat, Morocco

³Laboratory of Chemistry, Faculty of Applied Sciences, University of Hajjah, Yemen

ABSTRACT

Five flavonoid glycosides having kaempferol³, quercetin⁴ and myricetin², ⁵ and ⁶ skeleton were isolated from leaves of *Catha edulis* species together with quercetin. The structure of **ampelopsin**(²), was assigned by combination on 1D and 2D NMR spectroscopy for the first time as well as MSES. While the structures of **kaempferol 3-O-β-Glucopyranoside** (³), **Quercetin 3-O-β-Galactopyranoside**(⁴), **Myricetin 3-O-β-Glucopyranoside** (⁵) and **Myricetin 3-O-β-Xylofuranoside**(⁶) were identified by ¹H and ¹³C NMR, as well as UV spectroscopy and also confirmed by the spectral data of aglycones and TLC of the sugars obtained after acid hydrolysis. Compounds ³, ⁵ and ⁶ were reported for the first time from this plant.

Key words: Celastraceae, *Catha edulis*, flavonoid glycosides.

INTRODUCTION

Khat belongs to natural drugs known as *Catha edulis* Forsk and has other names related to its growing regions [1]. It is a tree always green, growing in the highest hill expanding from East to South Africa, Afganistan and Yemen [2]. It is customarily chewed in these areas to attain a state of euphoria and stimulation. The World Health Organization (WHO) has also classified Khat as a drug of abuse which can produce mild to moderate psychic dependence [3].

Several phytochemical studies showed that the chemical constituents of *Catha edulis* leaves include (-) cathinone, (+)-norpseudoephedrine, ethereal oils, sterols, triterpenes, tannins, ascorbic acid, etc... [4-8]. Flavonoids and their biological activities have been widely studied in earlier years and many flavonoids and flavonoids glycosides have been reported from *Catha edulis* [9-10]. In continuation of our study on this species [11-12], and in the aim to find other secondary metabolites not described until now, we report here the isolation and the structure elucidation of flavonoid glycosides from EtOAc and n-butanol fractions of the soluble parts of the aqueous EtOH extract of the leaves of this species. The structures of the isolated compounds were identified on the basis of spectroscopic studies, acid hydrolysis and comparison with literature data.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The leaves of *Catha edulis* have been collected from Hajjah region in the north-west of sana'a in mid-September 2008. A voucher specimen of the plant material has been deposited in the department of biology (Sana'a University).

193

www.scholarsresearchlibrary.com

Extraction

Leaves of *Catha edulis* were air-dried and macerated with EtOH/H₂O (7/3; v/v) for 24 hours four times. The crude extract was concentrated at room temp. and diluted with distillate water. After precipitation of chlorophyll with Pb(OAc)₂ and filtration, the remaining aqueous solution was extracted successively with CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH. The organic layers were dried with Na₂SO₄ giving after removal of solvents under red. pressure, CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH extracts respectively.

Separation and isolation

A part of the EtOAc extract (3g) was fractionated by CC on silica gel using chloroform with increasing percentages of methanol to yield 10 fractions (1–10) obtained by combining the eluates on the basis of TLC analysis. Fraction 5 which contained a major component was resubmitted to preparative TLC (CHCl₃/MeOH; 9:1) to afford compound **1**. The fraction 7 was subjected to preparative TLC (CHCl₃/MeOH; 9:1) to afford 4 subfractions (7-1; 7-4). The subfraction 7-3 contained a pure compound **2**.

The *n*-BuOH extract (15 g) was subjected to a silica gel column chromatography being eluted with a gradient system of CHCl₃/MeOH with increasing polarity to afford 21 fractions. Three main fractions (7, 17 and 21) were collected. Fraction 7 was further resubmitted to preparative TLC (CHCl₃/MeOH; 8.5:1.5) to afford 7 subfractions. The subfraction 7-6 contained an impure compound which was purified on Sephadex LH-20 column eluting with MeOH to give compound **3**. Fraction 17 was subjected to preparative TLC (CHCl₃/MeOH; 8.5:1.5) to afford 4 subfractions. The subfraction 17-3 was purified over silica gel column using CHCl₃/MeOH; 8.5:1.5 and afforded pure compound **4**. The fractionation of the important fraction 21 was carried out on Whatman N°3 paper with the system AcOH 15% to lead 4 subfractions. The subfractions 21-1 and 21-3 were purified on Sephadex LH-20 column eluting with MeOH to give pure compounds **5** and **6** respectively.

Acid hydrolysis

Solutions of compounds **3**, **4**, **5** and **6** in 2 ml (HCl 4N) were heated for 2 h and left to cool. The mixture was extracted with EtOAc and the EtOAc fractions were used for detection of the aglycone. The aqueous fractions were concentrated and used for identification of sugars. The sugars were identified by TLC using solvent system (acetone–water; 90:10) by comparison with authentic samples.

RESULTS AND DISCUSSION

From the EtOAc and *n*-butanol extracts obtained from the hydroalcoholic solution of *Catha edulis* leaves, six flavonoid compounds (**1-6**) (figure 1), were obtained by different chromatographic methods. The compounds were identified on the basis of their spectral data and of consistency with literature data for similar structures. Among the earlier flavonoid compounds **3**, **5** and **6** were isolated for the first time from the leaves of this plant.

Compound 1 : yellow powder soluble in methanol, UV λ_{max} (nm); MeOH: 257, 371; + NaOH: 246, 416, 329; + AlCl₃: 269, 439; + AlCl₃/HCl: 269, 430; + NaOAc: 259, 397; + NaOAc/H₃BO₃: 259nm, 386nm. ¹H NMR (MeOH-d₄, 250MHz, δ, ppm, J-Hz): 7.76 (1H, *d*, *J*=2.1, H-2), 7.65 (1H, *dd*, *J*=8.5; 2.1, H-6'), 6.90 (1H, *d*, *J*=8.5, H-5'), 6.41 (1H, *d*, *J*=2.1, H-8), 6.20 (1H, *d*, *J*=2.1, H-6). ¹³C NMR (MeOH-d₄, 62.9MHz, δ, ppm) 146.5 (C-2), 155.8 (C-3), 175.9 (C-4), 161.5 (C-5), 97.8 (C-6), 164.2 (C-7), 92.9 (C-8), 156.7 (C-9), 103.5 (C-10), 122.7 (C-1'), 114.5 (C-2'), 144.8 (C-3'), 147.3 (C-4'), 114.8 (C-5'), 120.2 (C-6'). This compound was identified as quercetin [13].

Compound 2: white crystals soluble in methanol, The molecular formula of this compound, was determined as [M+2H+Na] corresponding to C₂₁H₂₄O₁₂Na on the basis of TOF MS ES+ spectrum at *m/z* 491.1156 (100%) according to the C₂₁H₂₂O₁₂ (calculated 491.1156) indicating a compound containing 11 unsaturations. Its ¹H NMR spectrum of this compound exhibited a typical AX system due to H-2 and H-3 of a dihydroflavonol [14] at 5.00 (*d*, *J* 10.6 Hz) and δ H 4.55 (*d*, *J* 10.6 Hz) respectively. These assignments were confirmed by the ¹³C NMR, HSQC and HMBC spectra which showed three C-ring carbon signals at δC 86.6 (C-2), 81.0 (C-3) and 198.5 (C-4) [15]. The trans-configuration of the upper dihydroflavonol unit could be deduced from the coupling constant between H2 and H3 (³*J*_{H2-H3}=10.6 Hz) in the ¹H NMR spectrum. Besides, the ¹H NMR (MeOH-d₄, 400MHz, δ, ppm, J-Hz) exhibited : 6.54 (2H, *s*, H-2' & H-6'), 5.93 (1H, *d*, *J*=1.9, H-8), 5.91 (1H, *d*, *J*=1.9, H-6), 4.12 (1H, *brs*, H-1" Rhamnose), 3.62 (1H, *brd*, *J*=3.2, H-2"), 3.70 (1H, *dd*, *J*=9.5; 3.2, H-3"), 3.33 (H-4" obscured by the signal of the water of the solvent), 4.27 (1H, *dq*, *J*=9.5; 6.2, H-5") all these signals were deduced from COSY and finally at δ1.21 (3H, *d*, *J*=6.2, -CH₃ of rhamnose). ¹³C NMR (CD₃OD, 100MHz, δ, ppm): 198.5 (C-4), 171.1 (C-7), 168.0 (C-5), 166.6 (C-9, deduced from HMBC spectrum), 149.6 (C-4'), 137.5 (C-3' & C-5'), 130.8 (C-1'), 110.2 (C-6', deduced from HSQC spectrum), 110.1 (C-2', deduced from HSQC spectrum), 105.0 (C-10, deduced from HMBC spectrum), 99.9 (C-6), 98.8 (C-8), 104.6 (C-1"), 74.3 (C-2"), 74.7 (C-3"), 76.3 (C-4"), 73.0 (C-5"), 20.4 (C-6"). On the basis of all these results, this compound was characterized as Dihydromyricetin 3-O-α-rhamnopyranoside, named Ampelopsin. This compound

194

www.scholarsresearchlibrary.com

has been isolated from this plant in 1981 [16], while this study has permitted the establishment of structure on the basis of combining all spectral data (^1H , ^{13}C NMR, DEPT 135, HSQC, HMBC as well as MS-ESI).

Compound 3: yellow powder soluble in methanol, UV λ_{max} (nm): MeOH: 263, 351; + NaOH: 269, 391, 331. ^1H NMR (MeOH- d_4 , 250 MHz, δ : ppm, J : Hz): 8.12 (2H, d , $J = 8.24$, H-2'&H-6'), 6.87 (2H, d , $J = 8.24$, H-3'&H-5'), 6.26 (1H, brs, H-8), 6.11 (1H, brs, H-6), (3.5- 4.2 sugar protons). Acid hydrolysis of compound 3 produced Kaempferol and Glucose. This compound was characterized as Kaempferol-3- O - β -glucopyranoside, named Astragalol [17].

Compound 4: yellow powder soluble in methanol, UV λ_{max} (nm): MeOH: 257, 356; + NaOH: 269, 403, 329; + AlCl_3 : 269, 431; + AlCl_3/HCl : 269, 403; + NaOAc: 273, 381, 323; + NaOAc/ H_3BO_3 : 263, 381. ^1H NMR (MeOH- d_4 , 250 MHz, δ : ppm, J : Hz): 7.88 (1H, d , $J = 2.1$, H-2'), 7.61 (1H, dd , $J = 8.5, 2.1$, H-6'), 6.82 (1H, d , $J = 8.5$, H-5'), 6.42 (1H, d , $J = 1.9$, H-8), 6.22 (1H, d , $J = 1.9$, H-6), 5.20 (1H, d , $J = 7.7$, H-1" Galactose), (3.40- 4.00 sugar protons). Acid hydrolysis of compound 4 produced Quercetin and Galactose while the configuration of anomeric sugar was deduced by its

$J_{\text{H-H}}$ coupling constant. This compound was characterized as Quercetin-3- O - β -galactopyranoside [18].

Compound 5: pale yellow powder soluble in methanol, UV λ_{max} (nm): MeOH: 257, 306, 307; + NaOH: 268, 393, 328; + AlCl_3 : 265, 432, 302; + AlCl_3/HCl : 270, 406, 371, 309; + NaOAc: 274, 386, 323; + NaOAc/ H_3BO_3 : 261, 389. ^1H NMR (MeOH- d_4 , 250 MHz, δ : ppm, J : Hz): 7.31 (2H, s, H-6'&H-2'), 6.37 (1H, d , $J = 2.1$, H-8), 6.18 (1H, d , $J = 2.1$, H-6), 5.18 (1H, d , $J = 6.8$, H-1" Glucose), (3.50- 4.00 sugar protons). Acid hydrolysis of compound 5 produced Myricetin and Glucose while the configuration of anomeric sugar was deduced by its $J_{\text{H-H}}$ coupling constant. This compound was characterized as Myricetin-3- O - β -glucopyranoside, named isomyricetin [19].

Compound 6: yellow powder soluble in methanol, UV λ_{max} (nm): MeOH: 275, 364; + NaOH: 268, 386; + AlCl_3 : 269, 440; + AlCl_3/HCl : 271, 412, 309; + NaOAc: 274, 381, 325; + NaOAc/ H_3BO_3 : 261, 386. ^1H NMR (MeOH- d_4 , 250 MHz, δ : ppm, J : Hz): 7.31 (2H, s, H-6'&H-2'), 6.37 (1H, d , $J = 2.1$, H-6), 6.18 (1H, d , $J = 2.1$, H-8), 5.18 (1H, d , $J = 6.5$, H-1" Xylose), (3.30- 3.80 sugar protons). ^{13}C NMR + JMOD (MeOH- d_4 , 62.9 MHz, δ : ppm): 156.9 (C-2), 134.3 (C-3), 177.9 (C-4), 161.5 (C-5), 98.4 (C-6), 164.7 (C-7), 93.2 (C-8), 157.2 (C-9), 104.1 (C-10), 120.2 (C-1'), 108.3 (C-2'), 145.0 (C-3'), 136.6 (C-4'), 145.0 (C-5'), 108.3 (C-6'), 103.7 (C-1"), 71.53 (C-2"), 67.86 (C-3"), 72.80 (C-4"), 65.78 (C-5"). Acid hydrolysis of compound 6 produced Myricetin and Xylose while the configuration of anomeric sugar was deduced by its $J_{\text{H-H}}$ coupling constant. This compound was characterized as Myricetin-3- O - β -Xylofuranoside [20].

The structures of these two flavonoids were elucidated by extensive UV analyses and NMR spectroscopic analyses as well as by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature [21-23].

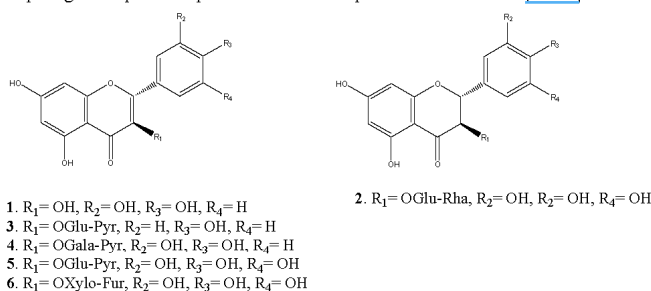


Figure 1. Structures of Compounds 1- 6

The present study allowed the isolation and structural determination of five flavonoid glycosides together with one flavonol named: Quercetin 1, (2R, 3R) Dihyromyricetin-3- O - α -rhamnoside (Ampelopsin) 2, Kaempferol-3- O - β -glucopyranoside 3, Quercetin-3- O - β -galactopyranoside 4, Myricetin-3- O - β -glucopyranoside 5 and Myricetin-3- O - β -

Xylofuranoside⁶. In our Knowledge, this is the first report describing the isolation of compounds^{3, 5} and ⁶from *Catha edulis*.

Acknowledgements

The authors are grateful to Hajjah University presented by it is president and Faculty of Applied Sciences, and to Dr. Omar Alshoja'a for the great efforts and scientific co-operations.

REFERENCES

- [1] J.G.Kennedy, *The Flower of Paradise –The Institutionalized Use of the Drug Qat In North Yemen* D. Reidel:Dordrecht, **1987a**, 176 –188.
- [2] A.D. Kikorian, and A. Getahun, *Economic Botany*, **1973**, 27, 378-389.
- [3] I. Khan, and P.KALIX, *Khat, plant with amphetamine effects*, *TIPS*, **1984**, 5, 326-328.
- [4] K. Szendrei, the chemistry of khat *Bull Narc.*, **1980**, 32, 5-35.
- [5] X. Schorno, and E. Steinegger, CNC-Active phenylpropylamines of *Catha edulis* (celastraceae) of Kenyan origin, *Experientia*, **1979**, 35, 572-574.
- [6] R. Brenneisen, and S. Geissshusler, *Pharm. Acta Helv.* **1985**, 60, 290-301.
- [7] R. Brenneisen, H. U. Fisch, U. Koelbing, S. Geissshusler, and P. Kalix, *Br. J. clin. pharmacy*. **1990**, 30, 825-828.
- [8] S. Qedan, *Catha edulis*, Eine Wenig Bekannte Rauch- und Genussdroge, *Planta Medica*, **1972**, 21, 410-415.
- [9] I. A. Al-Meshal, M. S. Hifnawy, M. Nasir, *Journal of Natural Products*, **1986**, 49, 172-174.
- [10] M. Gellert, K. Szendrei, J. Reisch, *Phytochemistry*, **1981**, 20, 1759-1760.
- [11] M. N. Algabr, S. Ameddah, A. Menad, R. Mekkiou, S. Benayache, F. Benayache, *Advances in Environmental Biology*, **2013**, 7(9), 2375-2379.
- [12] M. N. Algabr, H. A. Al-Wadhaf, S. Ameddah, A. Menad, R. Mekkiou, J. C. Chalchat, S. Benayache, F. Benayache, *International Journal of Applied Research in Natural Products*, **2014**, 7 (2), 21-24.
- [13] H. I. El Sissi, and M. F. AbdAlla, *Planta Medica*, **1966**, 14, 76-83.
- [14] Z. H. Mbawambo, M. C. Kapingu, M. J. Moshi, F. Machumi, S. Apers, P. Cors, D. Ferreira, J. P. J. Marais, D. VandenBerghe, L. Maes, A. Vlietinck, L. Pieters, *J. Nat. Prod* **2006**, 69, 369.
- [15] K. R. Markham, and V. M. Chari "13-Carbon NMR spectroscopy of flavonoids" In J. B. Harborne, and T. J. Mabry, (Eds.) *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, **1982** London.
- [16] M. Gellert, K. Szendrei, and J. Reisch, *Phytochemistry*, **1981**, 20, 175.
- [17] Samuel. Saito. Givaldo. Silva., Regineide. Xavier. Santos., Grace Gosmann., Cristina Pungartnik., and Martin Brendel., *Int. J. Mol. Sci*, **2012**, 13, 2846-2862.
- [18] L. salviifolius, Perihan. Gürbüz, Lütfiye. Ömür Demirezer, Zühal. Güvenalp, Ayşe Kuruüzüm-Uz., Cavit. Kazaz, Pratima. Tatke, Sonal. Desai, and S. Y. Gabhe, *Nat. Prod*. **2015**, 9(2), 175-183
- [19] M. T. Ikramov, F. A. Mavasheva, K. h. É. Batirov, V. M. Malikov, *Chemistry of Natural Compounds*. 26, 2, 226-227
- [20] R. N. Liu, W. Wang, Y. Ding, W. D. Xie, C. Ma and L. J. Du, *Journal of Asian Natural Products Research*, **2007**, 9(4), 333-338.
- [21] T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids* Springer-Verlag, **1970**, New York, USA.
- [22] P. K. Agrawal, and M. C. Bansai, *Flavonoid glycosides*, **1989**, 283– 355. In: P. K. Agrawal (ed.). *Carbon-13 NMR of flavonoids*, Elsevier, New York.
- [23] K. M. Markham, *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, **1982**, New York.

Research in Pharmacy and Health Sciences

Research Article

Synthesis and antimalarial activity of new quinazolinone-4 derivatives

Ali Gamal Al-kaf^{1*}, Anas Ahmad Almahbashi², M'Hammed Ansar⁴, Azeddine Ibrahim³, Abdul-Malik Abudunia³

¹Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Sana'a University, Yemen

²Department of Biology, Division of microbiology, Faculty of Science-Sana'a University Yemen

³Department of Biotechnology Laboratory (Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University Rabat, Morocco

⁴Department of Medicinal Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University-Rabat, Morocco

| ABSTRACT | |
|---|--|
| <p>In this study, we have two new compounds of quinazolinone-4 derivatives were synthesized and evaluated for some of their pharmacological activities that were predicted by computer program (PASS), and also testified for their yield obtained by using some of strong polar aprotic solvents.</p> <p>The new compounds were synthesized in the lab by allowing interaction of 2-phenylbenzoxazinones-4 with p-aminobenzenesulfonamides in a medium of acid catalyst and strong polar aprotic solvents DMSO. In the pharmacological studies, the synthesized compounds have been investigated in vitro for their toxicity and antimalarial activity according to WHO method.</p> <p>The pharmacological studies approved that the new compounds have low toxicity, since compound A gave class VI (harmless) and compound B gave class V (practically non toxic) according to Sidorov's classification. For the antimalarial activity, the investigated compounds (A&B) inhibit the maturation of ring form of plasmodium falciparum to schizont form.</p> <p>We concluded from our study that the new synthesized quinazolinone-4 derivatives were preferably obtained with usage of strong polar aprotic solvents especially DMSO. In addition, the pharmacological investigations have confirmed the prediction of PASS that testifies the high reliability of the obtained results.</p> | <p>Received: 29-07- 2016</p> <p>Revised: 30-08-2016</p> <p>Accepted: 18-09-2016</p> <p>*Correspondence to: Dr. Ali Gamal Al-kaf Email: alalkaf21@gmail.com Funding: Nil</p> <p>Competing Interests: Nil</p> |
| <p>Keywords: New quinazolinone-4 derivatives, PASS, DMSO, Antimalarial activity, Plasmodium Falciparum.</p> | |

INTRODUCTION:

One of the actual problems of the modern public health is target searching for new high effective medicinal preparation. Amongst those medicinal preparations are the natural and synthetic origins of quinazolinone-4 derivatives. Quinazoline derivatives were reported to be physiologically and pharmacologically active [1]. They also exhibit a wide range of activities such as anticonvulsant, anti-inflammatory, antifungal, antimalarial and sedative [2-6]. Some of these compounds are identified as drugs used as diuretics, vasodilators and antihypertensive agents [7]. Moreover, sulfonamide derivatives have been widely used as bacteriostatic agents [8, 9]. Prompted by the above

mentioned facts and in conjunction with our ongoing program on the utility of readily obtainable starting material for the synthesis of heterocyclic systems of biological interest [10-13], we have decided to synthesize a series of quinazoline derivatives having sulfonamide moiety with potentially wide spectrum of biological responses.

MATERIALS AND METHODS:

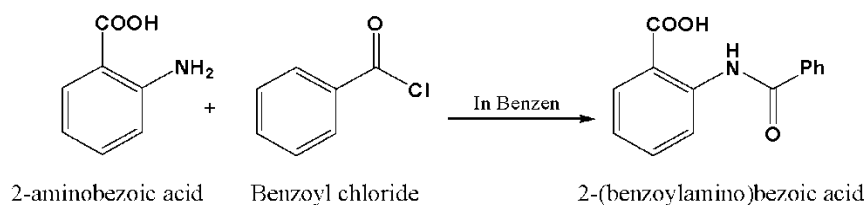
1- Synthesis of O-Benzoyl amino benzoic acid (OBABA)

Al-kaf et al., Synthesis and antimalarial activity of new quinazolinone-4 derivatives

- Benzoylation of anthranilic acid in benzene medium

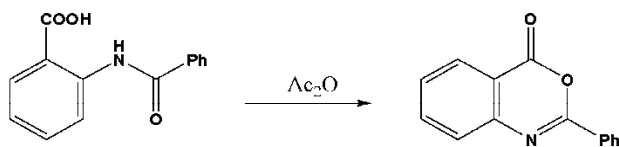
Dissolve 119 g of anthranilic acid in 300 ml of benzene by mixing and add 100 ml of Benzoyl chloride drop by drop, upon heater.

In the process of the reaction, the precipitate of O-Benzoyl amino benzoic acid is formed and after the addition of all quantity of benzoyl chloride the reaction mixture may crystallized. Precipitate must be recrystallized from ethanol with charcoal three times.
M.P = 170°c Yield = 50%



2-Synthesis of quinazolinone ring (2-phenyl benzoxazinone):

38 ml acetic anhydride (Ac₂O) distilled to 27 ml by boiling, then add 13 g (0.05mole) of O-Benzoyl amino benzoic acid in 10 minutes, the precipitate is formed. Then crumbled, filtered and recrystallized from ethanol.
M.P = 116°c Yield = 50%



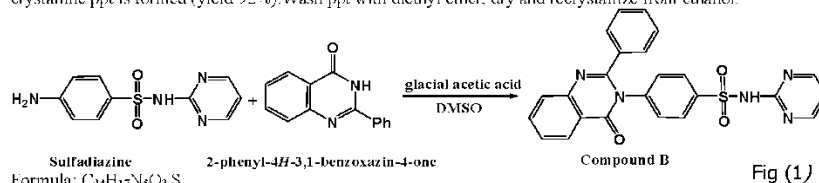
2-(benzoylamino)benzoic acid

2-phenyl-4H-3,1-benzoxazin-4-one

B-Synthesis of compounds (A & B):

1- Synthesis of 4-(4-Oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-N-pyrimidin-2-yl-benzenesulfonamide (Compound A):

2.23 gm (0.01mole) 2-phenyl-1,3-benzoxazinone-4 and 2.50 gm. (0.01mole) 2-(p-aminobenzene)sulfamido)-pyrimidine are dissolved in 7 ml glacial acetic acid and 0.5 ml DMSO and boil during 2 hours, after that white crystalline ppt is formed (yield 92%). Wash ppt with diethyl ether, dry and recrystallize from ethanol.



Formula: C₂₄H₁₇N₅O₃S

Properties: white crystalline powder without odour, soluble in DMSO, slightly soluble in ethanol, insoluble in water and ether.

· M.P. crystallization from ethanol=265-269 C°

· RF from ethanol 0.89

· Elemental analysis:

Calculated %: C(63.29%), H(3.76%), N(15.38%)

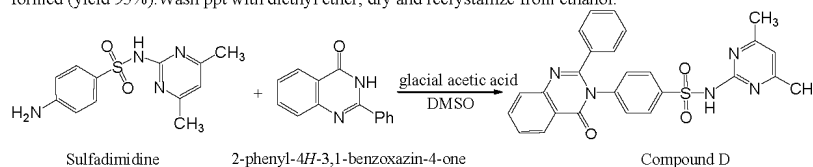
Found %: C (62.79%), H (3.66%), N (15.22%)

· IR: C=O: 1638, C=N: 1588, S=O: 1159. UV: 220, 270 nm.

Al-kaf et al., Synthesis and antimalarial activity of new quinazolinone-4 derivatives

2- Synthesis of N-(4,6-Dimethyl-pyrimidin-2-yl)-4-(4-oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-benzenesulfonamide (Compound B)

2.23 gm (0.01mole) 2 phenyl-1,3-benzoxazinone-4 and 2.78 gm (0.01mole) N-acetyl-p-aminobenzenesulfonamide are dissolved in 7 ml glacial acetic acid and 0.5 ml DMSO and boil during 4 hours, after that white crystalline ppt is formed (yield 95%). Wash ppt with diethyl ether, dry and recrystallize from ethanol.



Formula: $C_{26}H_{21}N_5O_3S$.

Properties: white crystalline powder without odour, soluble in DMSO, slightly soluble in ethanol, insoluble in water and ether.

M.P. crystallization from ethanol=234-235 °C

RF from ethanol = 0.73

Elemental analysis:

Calculated %: C (64.6%), H (4.38%), N (14.48%)

Found %: C (64.10%), H (4.20%), N (14.89%)

IR: C=O: 1638, C=N: 1588, S=O: 1159

UV: 225, 270 nm

NMR integrals of (Compound B) spectrum correspond to protons quantity of the suggested structure. The multiples of aromatic protons are in the field of 8.1–9.0 ppm the signal of one proton is strongly enough displaced into a weak field area and observed as a doublet in the field of 9.7 ppm, that unequivocally testifies of quinazolinone nucleus formation.

Study of acute toxicity:

Acute toxicity study was carried out according to kerber's method [16,17] on mice (18-24 gm). The examined substances were given to mice in the form of suspension with tween-20 intraperitoneally.

Antimalarial activity Screening:

The antimalarial activity screening in vitro was carried out at department of microbiology, Shephaco Pharmaceutical industry, Sana'a-Yemen.

On the bases of the anti-malarial activity of chloroquine salts, synthesized compounds having quinazolinone-4 nucleus have been studied for anti-malarial effect. In which the activity was studied on vitro-test according to

(WHO. 2003) [18]. As chloroquine is classified according to its action on plasmodium life cycle stages in human hosts [19] as blood schizonticides, which attack parasites in red blood cells, preventing or terminating the clinical attack.

WHO in-vitro test of anti-malarial drugs susceptibility test was performed in duplicate in a 96-well micro-titer plate, according to the World Health Organization method (WHO) (in vitro micro test) that is based on assessing the inhibition of schizont maturation [19] and the RBMI 1640 was the culture media that was used for cultivation of *P. falciparum* [18].

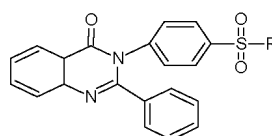
Data analysis:

Data analysis was carried out using a computerized mathematical long-concentration-response-Probit analyzing model for result interpretation [20], based on the method of Litchfield and Wilcoxon to fit a regression line to the data points which were directly derived from the counting results. This method is presently the most widely accepted analytic approach to dose-effect experiments showing a long-normal distribution of results. The 50% and 90% effective concentration (EC50 and EC90, respectively), i.e. the drug concentration at which 50 and 90% schizont maturation inhibition had occurred, were calculated from mathematically derived regressions. Cutoff points, the lowest drug concentration at which no schizont maturation was observed, were used as measure of full inhibition.

Fig (2)

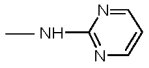
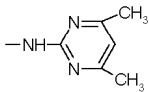
RESULTS:

The following table (1) represents the results of acute toxicity of N-sulfonamide derivatives of quinazolinone-4;



Al-kaf et al., Synthesis and antimalarial activity of new quinazolinone-4 derivatives

Table. 1:

| Laboratory index. | R | LD ₅₀ mg/kg (IPR-MUS)* | Class of toxicity |
|---------------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------|
| Compound A |  | 3500 | VI (harmless) |
| Compound B |  | 2800 | V (practically nontoxic) |
| *IPR-MUS: intraperitoneally in mouse. | | | |

Acute toxicity of new quinazolinone-4 derivatives investigation has shown that these substances according to the classification of K.K.Sidorov [15] are related to substances VI classes of toxicity, which means that they are practically nontoxic and harmless.

Specifically follows to emphasize that preparation "sulfanilamide" has LD₅₀-930 mg/kgs at intraperitoneally introduction for mice [14], and related to substances with toxicity of class IV [15].

Elemental analysis:

According to the prediction, the structures of the synthesized compounds were confirmed on the basis of the elemental analysis data, and UV, IR -and NMR-spectroscopy. Electronic absorption spectrums are measured on the spectrophotometers of CF-103 in quartz cuvettes of 1 cm thickness, ethanol solvent. IR-spectrums are measured on spectrometer Specord IR-75 in a suspension in vaseline oil. NMR spectrums were registered on Bruker-300Mhz device at 20°C in HMDS, as the internal standard. All reagents corresponded to BDH, SIGMA and ELDRICH."

For a thin-layer chromatography, plates of «Silufol UV-254» were used. As a developer, iodine vapors were used. Ultraviolet spectrums of absorption of the synthesized compounds are characterized by two wide absorption bands.

For quinazolinones-4 the front strip in most cases is within the limits of 240-290 nm, rarely of 250-320 nm and it is high-intensity one, the second strip is more

intensive in the field of 200-220 nm. In IR-spectrums of all quinazolinones-4 we can observe the absorption strips in the field of 1640-1675 (Ar-C=O), 1590-1650, 1520-1580, 1460-1500 cm which are characteristic for quinazolinone cycle [22,23, 24].

Results of antimalarial activity:

The in vitro test for the compounds (A & B) was performed. The schizonts maturation inhibition (SMI) (the lowest drug concentration in which no such schizonts were observed) was determined by using probit analysis for individual drugs. The frequency of schizonts maturation growth of plasmodium falciparum in different concentrations of the drugs is described in the table (2).

The schizonts minimum inhibition percentage and effective concentration (EC₁, EC₁₆, EC₃₄, EC₅₀, EC₉₀ and EC₉₉) for each drug are described in the table (4).

Al-kaf et al., Synthesis and antimalarial activity of new quinazolinone-4 derivatives

Table No. 2:

| Table No. (2): Number. of schizonts/100 ring forms : | | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| Conc./well | Cpd A (1) | Cpd A (2) | Cpd B (1) | Cpd B (2) | +ve control (Chlq,Ph) (1) | +ve control (Chlq,ph) (2) |
| -ve control | 15% | 10% | 16% | 16% | 13% | 19% |
| 7.8 | 2% | 2% | 1% | 1% | 0% | 9% |
| 15.6 | 2% | 1% | 1% | 0% | 2% | 3% |
| 31.25 | 1% | 1% | 0% | 0% | 1% | 2% |
| 62.5 | 0% | 2% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| 125 | 1% | 1% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| 250 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |
| 500 | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% |

Table No. 3:

| Drug conc. (µg/well) | SMI% Cpd (A) | SMI% Cpd (B) | SMI% Chlq,Ph |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| 7.8 | 84% | 93.7% | 71% |
| 15.6 | 88% | 96.8% | 84% |
| 31.25 | 92% | 100% | 90.6% |
| 62.5 | 92% | 100% | 100% |
| 125 | 92% | 100% | 100% |
| 250 | 100% | 100% | 100% |
| 500 | 100% | 100% | 100% |

Table No. 4: The efficacy conc. of compounds (A & B) compared with the positive control chloroquin phosphate.

| EC | Cpd (A) | Cpd (B) | Chlq,Ph |
|------------------|---------|---------|---------|
| EC ₁ | 2 | 1 | 2 |
| EC ₁₆ | 2 | 2 | 4 |
| EC ₃₄ | 4 | 5 | 6 |
| EC ₅₀ | 6 | 6 | 7 |
| EC ₉₀ | 23 | 9 | 28 |
| EC ₉₉ | 224 | 22 | 58 |

Discussion:

Among strategies to compact malaria, the search for new antimalarial drugs including quinazolinone-4 derivatives appears to be a priority. Investigations of drugs of quinazolinone nucleus have provided strong

evidence for several compounds with potent antimalarial activity [4-6]. The efficacy of antimalarial drugs depends primarily on their ability to kill malarial parasites by interrupting their essential life function, leading to inhibition of multiplication and allowing the

immune system to remove damaged parasites completely from the circulation [21]. This efficacy varies according to the susceptibility of each parasite clone within a natural, often genetically heterogeneous, population of malaria parasites and is generally referred to as drug sensitivity.

The results obtained from *in vitro* tests do not necessarily reflect the clinical outcome of malaria therapy as this is not merely dependent on the intrinsic drug sensitivity of the pathogen, but is also dependent on a several host related factors such as the immune status of the patient. Although the immune status of individuals might at first sight seem to be an obstacle to determining the specific drug response of parasite populations.

The *in vitro* results of compound (A) show complete inhibition of the schizonts maturation exhibited at 250 µg/ml with $EC_{50} = 6$ and $EC_{99} = 224$, while chloroquine show complete inhibition of the schizonts maturation exhibited at 62.5 µg/ml with $EC_{50} = 7$ and $EC_{99} = 58$ that means activity of compound (A) can be increased by increasing the dose.

The compound (B) showed higher effectiveness than chloroquine in which the complete inhibition of the schizonts maturation exhibited at 31.25 µg/ml with $EC_{50} = 6$ and $EC_{99} = 22$ that approved an activity with a low dose.

Finally, we advice for doing further studies on the investigated compounds for testing activity on chloroquine resistant strains of *Plasmodium falciparum* and *in vivo* studies concerning pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of these drugs.

Conclusion:

1. Quinazolinone-4 derivatives, containing in N-3 nucleus of quinazolinone arylsulfonamide fragments were obtained for the first time. Synthesis of 4-(4-Oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-N-pyrimidin-2-yl-benzenesulfonamide (Compound A), and N-(4,6-Dimethyl-pyrimidin-2-yl)-4-(4-oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-benzenesulfonamide (Compound B) are carried out in the lab by allowing interaction of 2-phenylbenzoxazinones-4 with p-aminobenzenesulfonamides in a medium of acid catalyst and strong polar aprotic solvent DMSO.
2. Introduction of quinazolinone cycle in the place of primary amine of the molecule of sulfanilamide brings to reduce its toxicity and give new and interested pharmacological activity.
3. The investigated compounds (A & B) showed high antimalarial activity compared with chloroquin.
4. Analysis of pharmacological activity predicted by program PASS allow in experiments to confirm the antimalarial activity.

REFERENCES:

1. Pojarsky AR. Theoretical principles of heterocyclic chemistry. Pergamon Press. Second Edi, 2000. 276.
2. Cheeseman GWH, Cookson RF. Condensed Pyrazines. New York: Wiley Interscience, 245-1979.
3. Castle R.N. Condensed pyridazines including chinnolines and phthalazines-New York: Wiley-interscience, 98-1973.
4. Armarego WLF. Fused pyrimidines quinazolines. New York: Wiley intrescience. 236-1967.
5. Ji-Wang C, Chia-Yun C, Kang-Chien L. Process for preparing 3-(1H-Tetrazol-5-yl)-4(3H)-quinazolinone derivatives". United States Patent 4,929,728 Appl. No. 430,285. May 29, 1990.
6. Yahontov LN; Liberman SS; Jihareva GP; Kuzmin KK. Biological activity of quinazoline derivatives. Chem Pharm J.1977;11:14-26.
7. Ji-Wang C, Chia-Yang Sh, Guan-Yu L. Studies on quinazolinones.3-Novel and efficient route to the synthesis of conformationally rigid analogues of ketanserine and SGB-1534 as antihypertensive agents. Biomed Chem Lett.1991;1:571.
8. Bartone D, Olisa UD. General organic chemistry. Translated from English. M Chemistry 1985; 9:97.
9. Ji-Wang, C. et al. New Approaches toward the Synthesis of Tetrahydropyrido [2, 1-b] quinazolin-10-One Derivatives. Chem Pharm Bull.1998; 46:928-933.
10. Gilchrist TL. Heterocyclic chemistry. Moscow: Mir, 464-1996.
11. Kojevnicov UV; Smimov NN, Zalesov VS, Gradel EE. Synthesis and biological activity of perchlorates 1-ethyl-2-methyl-3-aryl-4[3h] quinazolonium. Chem Pharm J. 1981;12(6): 55-59.
12. Izgunova OL, Kojevnicov UV, Obvinseva LM, Zalesov VS. Study amongst quinazolinone-4. XVII. Synthesis and biological activity of 1,2-disubstituted of quinazolinone - 4. Chem Pharm J. 1985;33 (11):1047-1049.

Al-Kaf et al., Synthesis and antimalarial activity of new quinazolinone-4 derivatives

13. Lipunova GN. et. al. Anticancer activity of flour derivatives of condensed quinolines and quinazolines. *Chem Pharm J.* 2000;34(1):20-23.
14. Safety (MSDS) data for drugs. - London.[Electronic resource]-Access mode: [http:// Physchem.ox. uz.](http://Physchem.ox.uz) L.K. 2005.
15. Sidorov k. k. About harmonization of domestic and international classifications of acute toxicity of chemicals. *Toxicological vestnik.* 6:2-3.2004;
16. Semov I.N, Gaisura VV. Elements of Experimental Pharmacology. 2000; 352.
17. Fisenko VP. Guidelines of experimental (before clinical) study of new pharmacological substances. *Medicine;* 2000: 398.
18. World Health Organization (WHO). Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. 2003.
19. World Health Organization (WHO). In vitro micro test: (MarkIT) for the assessment of the response of plasmodium falciparum to chloroquin, mefloquin, quinine, amodiaquin, sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin. 97.20-2001.
20. Wernsdorfer WT, Wernsdorfer MG. The evaluation of in vitro tests for the assessment of drug response in plasmodium falciparum. *Mitt. Oesterr. Ges. Trop Parasitol* 1995;17:221-228.
21. World Health Organization (WHO). Assessment of therapeutic efficacy of anti-malarial drugs: for uncomplicated falciparum malaria in areas with intense transmission. 96.1077-1996.
22. Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. *Spectroscopic Identification of organic compounds.* 5th.ed -New York; 419.1991
23. Tashhodjayev B, Turgunov KK, Kristallovich AI. IR-specters and crystallie structure of chlorhydrates and complex of salts of 2,3-polymethylene-3,4-dihydroquinazolinone-4. *J Chem Natural Products.* 1999; 3:364-367.
24. Nakanisi K. Infrared specters and structure of organic compounds. *M Mir;*216-1965.

Cite this article as: Al-Kaf AG, Almahbushi AA, Ansar M, Ibrahim A, Abudunia AM. Synthesis and antimalarial activity of new quinazolinone-4 derivatives. *Res Pharm Health Sci.* 2016;2(4):227-233.

SYNTHESIS, ANALGESIC, ANTI-INFLAMMATORY AND MOLECULAR DOCKING STUDIES OF NEW QUINAZOLIN-4-ONE DERIVATIVES.

Al-kaf Ali¹, Akachar Jihane², Bennani Fatima Zahra², El Jaoudi Rachid², Ansar M'Hammed³, Ibrahim Azeddine², Abudunia Abdul-Malik^{2*}

¹Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Sana'a University, Sana'a Yemen.

²Biotechnology Laboratory (Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University, BP 6203, Rabat Institutes, Morocco.

³Department of Medicinal Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University-Rabat, Morocco.

Reçu le 14/1/2017 . accepté le 08/08/2017

*Corresponding author: abdelmalek.dunia@um5s.net.ma

Abstract : Two new quinazolin-4-one derivatives were synthesized by condensation reaction of 2-phenylbenzoxazin-4-ones and *p*-aminobenzenesulfonamides, in a medium of acid catalyst and strong polar aprotic solvents (DMSO or DMFA). The compounds are also tested for their yields obtained, by using some of strong polar aprotic solvents and have been investigated for analgesic, anti-inflammatory (*in vivo*) and *in silico* docking studies to recognize the hypothetical binding motif of the title compounds with the cyclooxygenase isoenzyme COX-2 using Autodock Vina software.

The results showed that the investigated compounds (A and C) have a high analgesic and anti-inflammatory activities. The compounds A and C showed appreciable inhibition of the edema size with a percent inhibition of 19% and 43% respectively, the anti-inflammatory activity of the compounds showed excellent protection against in comparison with diclofenac sodium that exhibited a significant anti-inflammatory activity with 15% of inhibition, while the analgesic activity was significantly increased after treatment by the both A and C compounds compared with the standard diclofenac sodium.

The docking study of compound A and C showed that their score of affinity was found around -8.2 and -9.1 respectively in comparing to diclofenac with -8.4. We concluded that the new synthesized quinazolin-4-one derivatives exhibited anti-inflammatory activity and possess potent analgesic effect; the docking study of the synthesized derivatives confirmed the results and revealed that compounds A, has a significant anti-inflammatory activity.

Keywords: Synthesis, Quinazolin-4-one derivatives, Molecular Docking, Anti-inflammatory activity, analgesic activity.

Résumé : Deux nouveaux dérivés de la quinazolin-4-one ont été synthétisés par réaction de condensation de 2-phénylbenzoxazin-4-ones et de *p*-aminobenzènesulfonamides, dans un milieu de catalyseur acide et de solvants aprotiques polaires forts (DMSO ou DMFA). Les composés dérivés sont également témoins de leur rendement obtenu, en utilisant certains des solvants aprotiques polaires forts et ont été étudiés pour des études analgésiques, anti-inflammatoires (*in vivo*) et *in silico* docking pour reconnaître le motif de liaison hypothétique des composés étudiés avec l'Isoenzyme COX-2 de cyclooxygénase utilisant le logiciel Autodock Vina.

Les résultats ont montré que les composés étudiés (A et C) ont des activités analgésiques et anti-inflammatoires élevées.

Les composés dérivés A et C ont montré une inhibition appréciable de la taille de l'œdème avec un pourcentage d'inhibition de 19% et 43% respectivement, l'activité anti-inflammatoire des composés présentait une excellente protection contre le diclofénac sodique qui présentait

une activité anti-inflammatoire significative Avec 15% d'inhibition, tandis que l'activité analgésique a été significativement augmentée après traitement par les deux dérivés de A et C par rapport au diclofénac de sodium standard.

L'étude Docking des composés A et C a montré que leur score d'affinité a été trouvé autour de -8,2 et -9,1 respectivement par rapport au diclofenac avec -8,4. Nous avons conclu que les nouveaux dérivés de la quinazolin-4-one synthétisés présentaient une activité anti-inflammatoire et possédaient un effet analgésique puissant; L'étude d'amarrage des dérivés synthétisés a confirmé les résultats et révélé que les composés A, ont une activité anti-inflammatoire significative.

Mots clés: Synthèses, Dérivés de la quinazolin-4, Amarrage moléculaire, Activité anti-inflammatoire, Activité analgésique

1. Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the main kind with therapeutic applications that exceed many years; actually they are often used for their analgesic effects and also for the antipyretic ones, and either in an important doses for anti-inflammatory impacts. The success of NSAIDs are a principal way to pain control thanks to its implication in the COX pathway, as they are linked with a several of negative effects. These involved a perturbation in renal function, impacts on blood pressure, hepatic injury and an increased risk of cardiovascular adverse effects in patients treated by a COX-2 inhibitors and the NSAIDs [1]. The synthesis of new compounds devoid of such side effects has become an important alternative for chemists and researchers. Various studies showed that the natural and synthetic quinazolin-4-one derivatives have drawn a huge consideration owing to their expanded applications in the field of pharmaceutical chemistry. Quinazolinones are the main structures available in a lot of natural products like the synthetic medicines. 4-(3H)-Quinazolinone is often encountered heterocyclic moiety in medicinal chemistry known for a thousand years. Quinazolinone derivatives get its importance due to the variety class of their biological characteristics [2]. Many substituted quinazolinone derivatives possess a wide range of bioactivities such as antimalarial, anticancer, antimicrobial, antifungal, antiviral, antiprotozoan, anti-inflammatory, diuretic, muscle relaxant, antitubercular, antidepressant, anticonvulsant, acaricidal, weedicide, and many other biological activities [3]. Inflammation is a one of the several complex biological responses to irritants and hurts or damaged cells and had involved in the pathogenesis of arthritis, cancer and stroke, like in neurodegenerative and cardiovascular disease [4]. Prostaglandins make a key function in the production of the inflammatory response. They are produced from arachidonic acid by COX2 isoenzymes and their biosynthesis, is over-expressed during inflammatory states, and is stopped by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [5]. COX-2 is often used as model in molecular docking studies to predict the hypothetical protein-ligand binding mode, which plays a significant role in structural based drug design and structure activity relationship. In this study, our aim was to synthesize new quinazolin-4-one derivatives having sulfonamide moiety with potentially wide spectrum of biological responses. These quinazolinone derivatives were evaluated for the toxicity investigation against a panel of guinea pigs (hamster) also for, their analgesic and anti-inflammatory activities. The Docking study (in silico) of the most active compounds was performed against active sites of COX2 to predict the hypothetical protein-ligand binding mode of these compounds.

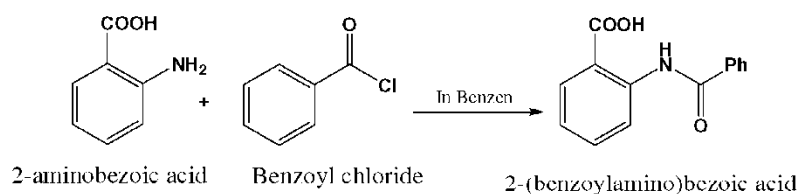
1. Experimental Section

Chemistry

Synthesis of *O*-Benzoyl amino benzoic acid (OBABA)

To a solution of 119 g of anthranilic acid in 300 ml of benzene were added 100 ml of benzoyl chloride drop by drop, upon heating. After cooling the precipitate formed was recrystallized from ethanol (Scheme 1)

M.P – 170°C Yield – 50%



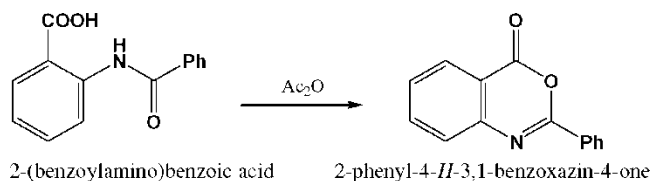
Scheme 1: Synthesis of *O*-Benzoyl amino benzoic acid (OBABA)

Synthesis of (2-phenyl benzoxazinone)

A solution of 13 g (0.05mole) of *O*-benzoyl amino benzoic acid in 38 ml acetic anhydride (Ac₂O) was heated for 10 minutes. After cooling the precipitate formed, was filtered and recrystallized from ethanol. (Scheme 2)

M.P – 116°C Yield – 50%

Synthesis of compounds (A, C)



Scheme 2: Synthesis of 2-phenyl benzoxazinone

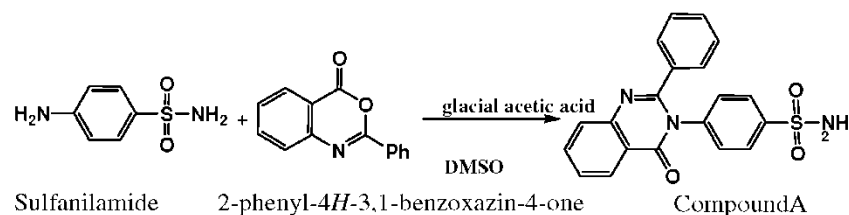
Synthesis of 4-(4-oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-benzenesulfonamide (Compound A)

2.23g(0.01mole) of 2-phenyl-1,3-benzoxazin-4-one and 1.72 g (0.01mole) of *p*-aminobenzene sulfonamide were dissolved in 7 ml of glacial acetic acid and 0.5 ml of DMSO. The reaction mixture was heated for 5 min. The white compound formed was recrystallised from ethanol (yield 86%; M.P=275-276°C (Scheme 3)

Formula: C₂₀H₁₅N₃O₃S; RF from ethanol –0.49; Calculated %: C (63.65%), H (3.98%), N (11.14%); Found %: C (63.15%), H (3.28%), N (10.80%)

IR: C–O: 1681, C–N: 1588, S–O: 1159.

UV: 205,260 nm.



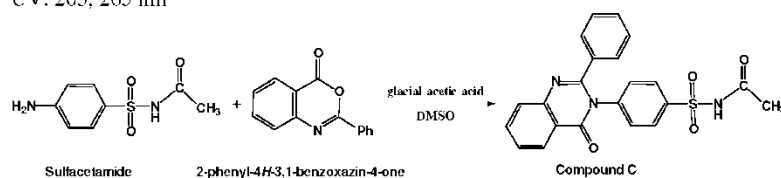
Scheme 3: Synthesis of 4-(4-Oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-benzenesulfonamide (Compound A)

Synthesis of *N*-acetyl-4-(4-oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-benzenesulfonamide (Compound C):

2.23g (0.01mole) of 2-phenyl-1,3-benzoxazin-4-one and 2.14g (0.01mole) of *N*-acetyl-*p*-aminobenzenesulfonamide were dissolved in 7 ml of glacial acetic acid and 0.5 ml DMSO. The reaction mixture was heated for 5 min. After cooling the white compound isolated was recrystallized from ethanol (Yield:86%; M.P– 195-196°C (Scheme 4); RF from ethanol – 0.65

Elemental analysis: Calculated %: C (63.00 %), H (4.09%), N(10.02%)

Found %: C (62.75%), H (3.99%), N (9.87 %); IR: C=O: 1685, C=N: 1588, S=O: 1159
UV: 205, 265 nm



Scheme 4: Synthesis of *N*-acetyl-4-(4-oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-benzenesulfonamide (Compound C)

Pharmacology Investigations

Study of acute toxicity

Animals: guinea pigs (hamster) of both sexes weighing from 230-370 g b.wt. and 12-14 weeks old were used in the experimental work. Animals were housed plastic Rats were maintained at a temperature of 25–2°C, relative humidity of 50+5% and photoperiod at 12 h dark/12 h light. All animals had free access to food and water; Rats were allowed to acclimatize to the laboratory environment for 7 days before start of the experiments. All experiments were conducted in accordance with the Official Journal of the European Committee in 1991. The experiment protocol was approved by the Institutional Research Committee regarding the care and use of animals for experimental procedure in 2010; The examined substances were given to guinea pigs in the form of suspension with tween-80. Acute toxicity study was carried out according to kerber's method [6, 7]

Determination of LD50: The LD50 was mathematically determined following oral administration of substances to adult rats according to Kerber method (Pershin, 1971) using the following formula:

$$LD50 = LD100 \cdot \sum (z \times d) / m$$

Where, z is a half of sum of animal quantity died from two successive doses, d is the interval between two successive doses and m is the number of animals per group.

*Analgesic and anti-inflammatory Activity**Animals*

Thirty five (35) male albino mice of Swiss strain weighing (25-30 g), were obtained from the Central Animal House of the College of Sciences of Sana'a University and were used in the experimental work. Animals were selected for the study based on previous study that demonstrated a better percent induction of inflammatory using formalin. treatment groups (7 animals/group), which were housed group wise in polypropylene cage (17x11x6) and kept under controlled environmental conditions (temperature: 22- 2 0C, humidity: 50-55%, natural light/dark cycle). The mice received a standard pellet diet and water *ad libitum*. All experiments were performed during light phase between 9.30 AM to 3.30 PM. The protocol of the study was approved by the Institutional Animal Ethics Committee. The care of the animal was as per the Guidelines of Yemeni National Science Academy, Sana'a, for the Care and Use of Laboratory Animals.

Protocol and Treatments

The animals were randomly divided into four different groups. Group (1) as Control group receive a normal saline I.P 60 mints before formalin injection. (2) is considerate as Standard drug group receive a diclofenac sodium (10 mg/kg) I.P. 60 mints before formalin injection. and two groups received one of each compound (A or C) at 500 mg/kg for each before formalin injection. Drugs and vehicle were injected in a volume 10 ml/kg by intraperitoneal (IPr) route.

One percent formalin (0.1 ml) was injected under the plantar surface of the right hind paw of the mouse 60 mints later. The left paw which acted as control was injected with 0.1 ml of 0.9 % saline. The animals were treated according to their respective grouping as mentioned above. Using aseptic conditions.

Licking Observation and Edema Measurements

The mouse was then kept in an open cage and the licking response recorded in seconds for each mouse licking the injected paw or leg was recorded for 30min period.

Two phases of intense licking were observed, an early first phase from 0-5 min and a late second phase between 20-25 min. The first phase represents the acute pain response while the second phase, tonic pain response [8-9]. These two phases were scored separately for studying the effect of drugs on formalin-induced pain responses.

The increase in paw edema induced by formalin was measured as a mean of difference increase in hind paw between left and weight legs [10].

Biochemical Assay

The animals were scarified under ether anesthesia by spinal incapitation and blood collected by cardiac puncture on heparinized tubes and centrifuged for 10 mints at 5000 rpm and plasma separated and stored at -450C for estimation of total glutathione, glutathione reductase, Glutathione peroxidase, ALP, AL.T, AST, Total Free fatty acids, Total lipid peroxides.

Docking methodology

Molecular docking analysis mode inhibition of COX-2 by A and C compounds was further assessed with the software AutoDock Vina v.1.0.2 [11]. The crystal structures of COX-2 were obtained from the Protein Data Bank with (PDB code 4COX). All bound water and ligands were eliminated from the protein and the polar hydrogen, Kollman United Atomcharges

(partial charges q_i on each atom) and Stouten solvation parameter (electronic polarizability) are discussed in sections using Autodock tools [12].

Compound A and C structure was initially sketched in ChemDraw. The initial coordinates of the inhibitors of the diclofenac and the indomethacin were get from the ligand of PDB has name DIF and IMN respectively this two compounds are used as control docking.

All compounds/inhibitors were retained with only polar hydrogen atoms. Gasteiger charges and torsional angles were added by utilizing AutoDock Tools [12]. The grid was centered in the active site region which involves all functional amino acid residues in the crystal structures. Grid maps were generated using the Autogrid Program. The docking was performed by Lamarckian genetic algorithm with pseudo-Solis and Wets local search with population size of 150, energy assessment: 2500,000 and 200 docking runs using AutoDock vina [11].

The binding modes of A and C showing lowest binding free energy with the active cavities of COX-2 were selected for further confirmation of docking conformation and comparison. The simulation results, interactions of the docked protein with ligand were analyzed using Pymol 1.1eal and Discovery Studio Visualizer 4.5.

Statistical analysis

Data were expressed as Mean \pm SD. Statistical analysis was done using paired 't' tests. Comparisons were made among healthy, untreated and treated animals. A p value of <0.01 was considered significant. in the above tests were calculated using Delta Graph (USA).

2. Results and discussion

Synthesis and elemental analysis

Chemical Part

Modification of synthesis method for N-3 substituted quinazolinones

During the researches which had been carried out on the organic chemistry department of the Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy [13], it was worthwhile to obtain the remote derivatives of N-3 substituted derivatives of quinazolin-4-one by the direct interaction of *o*-benzoylaminobenzoic acid with aromatic amines, excluding thus a stage of benzoxazinones formation. Thus it was necessary to obtain:

1. N-sulfonic derivatives of quinazolin-4-ones on the basis of 2-phenylbenzoxazinones and to prove its structure by counter synthesis proceeding from *o*-benzoylaminobenzoic acid.
2. Determination of strong polar aprotic solvents (DMSO & DMFA) role in the borders of the used way of synthesis and to prove the expediency of acid catalysis usage.

Quinazolin-4-ones synthesis with N-arylsulfonic fragment was earlier carried out in two stages, the first one is the Synthesis of 2-phenylbenzoxazin-4-ones, and second one is the replacement of a heteroatom of oxygen by nitrogen. The most widespread method of quinazolin-4-ones synthesis is to use benzoxazinones and amine component boiling in the medium of ethanol [14]. However this technique appeared to be unsuitable for synthesis of N-heteryl derivatives of quinazolin-4-ones. The given fact is explained by the weak nucleophilic properties of primary amino group of heterocyclic amine. With the purpose to synthesise the remote 3-heteryl derivatives of quinazolin-4-ones by the replacement the heteroatom oxygen by nitrogen atom, it was proposed the synthesis modification carrying out the reaction in the medium of glacial acetic acid with addition of catalytic quantities of strong polar aprotic solvent (DMSO). As against heterylamines, in *p*-arylsulfones the amino group has higher reactivity that is proved by the speed of reaction and, in many cases, practically with a quantitative yield of main products. For the definition of the preparatory opportunities of the

given technique the interaction of 2-phenylbenzoxazin-4-ones with *p*-aminobenzenesulfonamide was chosen.

Effect of strong polar aprotic solvents on the yield of the synthesized compounds: For revealing the acid catalyst role and different solvents (such as DMSO and DMFA), the reagents were carried out in different conditions in the medium of glacial acetic acid without the catalyst, in glacial acetic acid with catalytic quantity of DMSO, in glacial acetic acid with catalytic quantity of DMFA, only in DMSO and only in DMFA. See (Table 1).

Table 1. Percentage of yield obtained with different solvents.

| Solvent(s) Compound | DMSO + glacial acetic a | DMFA + glacial acetic a | glacial acetic a | DMSO | DMFA |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------|-------------|
| Compound A | 86 | 77 | 61 | No reaction | No reaction |
| Compound C | 54 | 40 | 29 | = | = |

The yield of the main product is compared in reactions without DMSO addition and with DMSO addition that testifies about the expediency of catalytic quantities of polar aprotic solvent usage. In this case the yield is increased by 25% (Scheme 5). The given fact is explained by nucleophilic properties of primary amino group of sulfonamides and that is coordinated to the known data on DMSO properties as a polar aprotic solvent [15]. Comparison of the yield of the amine product in reactions without DMFA addition and with DMFA addition testifies about the expediency of catalytic quantities of polar aprotic solvent usage as in this case the yield is increased by 12.5% in average. Being based on the role of polar aprotic solvents concepts, it is possible to assume that the introduction of DMSO and DMFA in the reaction medium allows:

- To reduce to a minimum the solvates formation with the amine component participation;
- To increase nucleophilic properties of amino group;
- To increase reaction rate and the yield of the main products. [15]

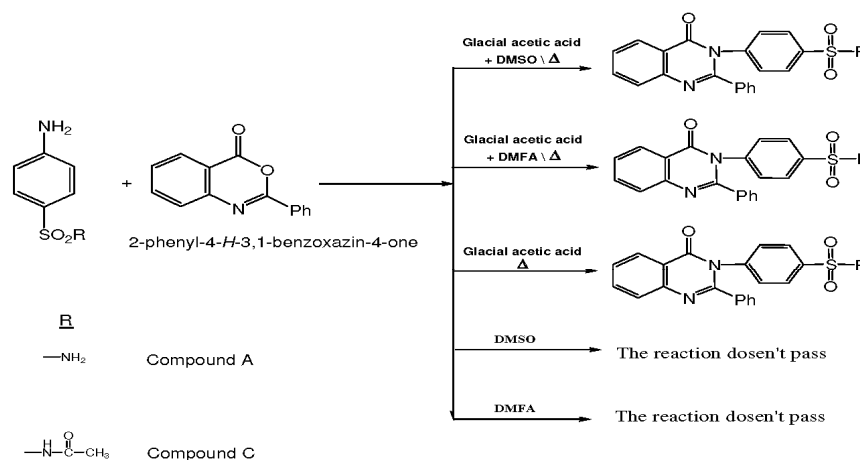
In DMSO and DMFA medium we couldn't find the obvious traces of reaction. It confirms the conclusion about the acid catalysis necessity, first of all, at a stage of benzoxazinones decyclization.

According to the prediction, the structure of the synthesized compounds is confirmed on the basis of the elemental analysis data, and also UV-, IR -and NMR-spectroscopy. Electronic absorption spectrums are measured on the spectrophotometers of CF -103 in quartz cuvettes of 1 cm thickness, ethanol solvent.

IR-spectrums are measured on spectrometer Specord IR-75 in a suspension in Vaseline oil. NMR spectrums were registered on Bruker-300Mhz device at 20°C in HMDS, as the internal standard. All reagents corresponded to BDH, SIGMA and ALDRICH."

For a thin-layer chromatography, plates of «Silufol UV-254» were used. As a developer, iodine vapors were used. Ultraviolet spectrums of absorption of the synthesized compounds are characterized by two wide absorption bands.

For quinazolin-4-ones the front strip in most cases is within the limits of 240-290 nm, rarely of 250-320 nm and it is high-intensity one, the second strip is more intensive in the field of 200-220 nm. In IR-spectrums of all quinazolin-4-ones we can observe the absorption strips in the field of 1640-1675 (Ar-C=O), 1590-1650, 1520-1580, 1460-1500 cm^{-1} - which are characteristic for quinazolinone cycle [16, 17, 18].

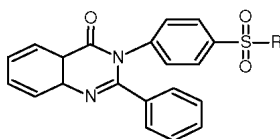


Scheme 5: Reactions without DMSO addition and with DMSO addition and reactions without DMFA addition and with DMFA

Pharmacology investigations

Study of acute toxicity

Acute toxicity of new quinazolin-4-one derivatives investigation (Scheme 6) has shown that these substances according to the classification of K.K.Sidorov [19] are related to substances V1 classes of toxicity, which means that they are practically nontoxic and harmless. (Table 2) Specifically follows to emphasize that preparation "sulfanilamide" has LD₅₀-930 mg/kgs at intraperitoneally introduction for mice [20] and related to substances with toxicity of class IV [19].(Table 2)



Scheme 6: N-sulfonamide derivatives of quinazolin-4-one

Table 2: Toxicity of N-sulfonamide derivatives of quinazolin-4-one

| Laboratory index. | R | LD ₅₀ mg/kg (IPR-MUS)* | Class of toxicity |
|-------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Compound A | —NH ₂ | 4000 | VI (harmless) |
| Compound C | —NH—COCH ₃ | 3200 | VI (harmless) |

*IPR-MUS: intraperitoneally in mouse.

Analgesic and Anti-inflammatory Activity

Results of the analgesic using formalin-induced pain responses and anti-inflammatory activity of pure compound A and C are given in (Tables: 3, 4 and 5)

The results obtained from analgesic studies are presented in (Table 3, fig.1, panel 1) for licking response (Scoring, at both phases). The compounds showed statistically significant ($p < 0.01$) analgesic activity at tested dose levels. The compounds activity was statistically comparable to the reference drug using Diclofenac. The compounds inhibited both phases of the formalin-induced pain with a more potent effect observed during the second phase. The compounds exhibited a significant ($P < 0.01$) inhibition in both phases of the formalin pain test, but with a less intense effect in the first phase. The licking time in both compounds and diclofenac drug during the phase 2 was significantly ($p < 0.001$) lower than saline treated group (Tables 3, Fig.1, panel 2). In addition, licking time of the compounds A and C was significantly lower than diclofenac ($p < 0.001$) (Table 4 and figure 2 panel 3, 4). The late phase of licking response in formalin test could be related to an acute inflammatory phase process. There is increased vascular permeability and leukocytes migration occurs. Several mediators along with neutrophil-derived reactive oxygen species and free radicals like peroxynitrite are reported to be involved during this process [21].

Furthermore the formalin pain test is very useful for evaluating the mechanism of pain and analgesia. Drugs which act mainly centrally, such as narcotic analgesics, inhibit both phases of pain in this model, while peripherally acting drugs, such as aspirin or indomethacin, only inhibit the late phase. The results obtained in this study indicate that the compounds possess analgesic properties which are mediated by peripheral and central inhibitory mechanisms. The greater effectiveness of these compounds in the late phase could be attributed to its ability to inhibit peroxynitrite formation [22-24].

The results of the present study show also that these compounds possess significant anti-inflammatory activity in all the tested experimental models using formalin-induced mouse paw edema and showing inhibition of all phases of inflammation (table 5).

The development of edema in the paw of the rat after injection of formalin is a biphasic event. The initial phase of the edema is due to the release of histamine and serotonin and the edema is maintained during the plateau phase by kinin like substance [25] and the second accelerating phase of swelling due to the release of prostaglandin like substances. In the present study; percentage of edema reduction in compound C treated group was significantly lower than ($p < 0.01$) than saline treated group, while non-specific comparison between compound A and saline treated group, but a significant decrease in edema reduction in compound A than diclofenac treated group (table 6 and figure 11). Inhibition of edema observed in formalin model may be due to the ability of the compounds to inhibit these chemical mediators of inflammation could be due to their strong antioxidant activity. These results were reported in further studies [26-27], and confirmed that these compounds have an anticonvulsant, anti-inflammatory, antifungal, anti-malarial and sedative. The results of the present study show that compounds A and C (at the dose 500 mg/kg) produce anti-nociceptive and anti-inflammatory effects in formalin-induced tonic pain inflammatory model, but compound C was strongest than both compound A and diclofenac. The effect was more marked on the late phase as compared to early phase of pain response. Finally, further studies needed to investigate the mechanism of analgesic and anti-inflammatory activities of these compounds.

Table 3: Comparison among different estimated groups in licking response (Scoring) at both phases (Fig.1)

| Variables | (HC)Rats (n=7) M ± SD | (DC)Saline Treated Rats (n=7) M ± SD | (Dec)Treat ed Rats (n=7) M ± SD | (CpA)Investi gate Compound 2 Treated Rats (n=7) M ± SD | Investigate Compound 1 Treated Rats (CpC) (n=7) M ± SD |
|---|-----------------------------|---|--|---|---|
| Licking Score At Phase One (0-5 Min) 1 | 58.43±26.27 | 418.28±127.94 *** | 321.71±81.19 *** | 250±82.96 *** ◆ | 181.71±88.01 ** ◆◆◆ |
| Licking Score At Phase Two (20-25 Min) 2 | 1.57±1.51 | 336.42±88 *** | 144.71±26.68 *** ◆◆◆ | 47.57±29.27 ** ◆◆◆ ◇◇◇ | 7.86±6.38 ** ◆◆◆ ◇◇◇ |

The statistical data were expressed as M ± SD. M, mean; SD, standard deviation; n, number of rats; ◆ or ◇ or * = P < 0.05 ; ◆◆ or ◇◇ or ** = p < 0.01 ; ◆◆◆ or ◇◇◇ or *** = p < 0.001 among different groups; n= number of rats/group; * = compare among different groups and healthy control Rats; ◆ = compare among different groups and saline treated rats; ◇ = compare between diclofenac treated and Investigated treated rats .

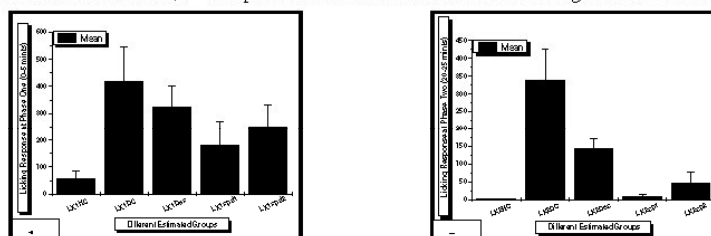
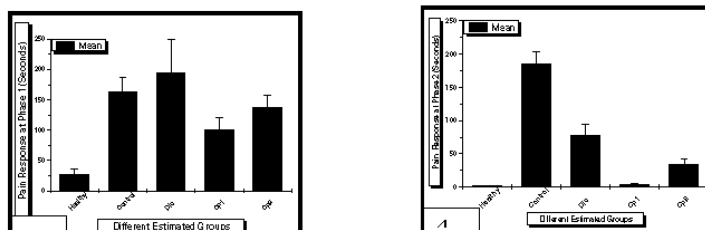
**Fig.1.** Comparison Among Different Estimated Groups in Licking Response (Scoring) at both phases (compound 3, 2)**Fig.2.** Comparison among different estimated groups in licking response (seconds) at both phases (compound 1,4)

Table 4: Comparison among different estimated groups in licking response (seconds) at both phases (Fig.2)

| Variables | Healthy Control Rats (HC) (n=7) M ± SD | Saline Treated Rats (DC) (n=7) M ± SD | Diclofenac Treated Rats (Dec) (n=7) M ± SD | Investigate Compound 2 Treated Rats (CpA) (n=7) M ± SD | Investigate Compound 1 Treated Rats (CpC) (n=7) M ± SD |
|---|---|--|---|---|---|
| Licking Score At Phase One (0-5 Min) 3 | 27.5±8.2 | 164.2±22.7 *** | 195.1±55.3 *** ◆◆◆ | 138.4±18.8 *** ◆◆◆ ○○○ | 101.1±19.2 *** ◆◆◆ ○○○ |
| Licking Score At Phase Two (20-25 Min) 4 | 1.3±0.24 | 185.2±19 *** | 78.1±15.44 *** ◆◆◆ | 33.7±8.2 *** ◆◆◆ ○○○ | 4.35±1.4 *** ◆◆◆ ○○○ |

The statistical data were expressed as M ± SD. M, mean; SD, standard deviation; n, number of rats; ◆ or ○ or * = P < 0.05 ; ◆◆ or ○○ or ** = p < 0.01 ; ◆◆◆ or ○○○ or *** = p < 0.001 among different groups; n- number of rats/group; * - compare among different groups and healthy control Rats; ◆- compare among different groups and saline treated rats; ○ = compare between diclofenac treated and Investigated treated rats .

Table 5: Anti-inflammatory activity of compounds A, C and diclofenac on formalin-induced mouse paw edema

| Groups | Mean difference in right and left paw edema (in mg) (30 mints later after Formalin injection) | Reduction of Edema % |
|------------------------------------|---|----------------------|
| Saline Treated Rats (DC) (n=7) | 66.8±11 | ---- |
| (Dec) Treated Rats (n=7) | 57.2±10 ** | 15 |
| (Inves)1 (CpA) Treated Rats(n=7) | 54.2±13 ○○ | 19 |
| (Inves) 1 (CpC) Treated Rats (n=7) | 38.2±7 ** ◆◆ | 43 |

% inhibition of edema = {1- Mean increase in paw swelling in Dec or Inves arthritic treated rats / Mean increase in paw swelling in saline arthritic treated rats} x 100.

The statistical data were expressed as M ± SD. M, mean; SD, standard deviation; n, number of rats; ◆ or ○ or * = P < 0.05 ; ◆◆ or ○○ or ** = p < 0.01 ; ◆◆◆ or ○○○ or *** = p < 0.001 among different groups; n- number of rats/group; * - compare among different groups and healthy control Rats; ◆- compare among different groups and saline treated rats; ○ = compare between diclofenac treated and Investigated treated rats.

Molecular docking studies

Crystal Structure of the COX-2 Ligand-binding domain was determined by (pdb code: 4COX), to study docking analysis Mode inhibition of COX-2 by A and C compounds using the software Autodock Vina software.

The Compounds A,C, the Diclofenac and Indomethacin drugs were ranked after the docking test according to their scores and were visualized inside the pocket to view their fitting and

closure to main residues. The binding poses prediction for diclofenac, indomethacin and substituted quinazolinone (A and C) at the binding site of COX-2 are shown in (Fig.3).

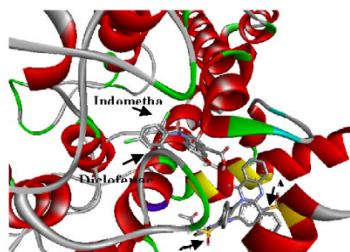


Fig.3. The binding poses of diclofenac, indomethacin and substituted quinazolinone A and C at the active site of COX-2. Indomethacin and Diclofenac superimpose in the same position.

The diclofenac, indomethacin, and the both compounds (C, A) prove a significant activity with the docking score: (-8.1), (-10.3), (-8.6), (-9.1) respectively (Table 6). Diclofenac exhibited hydrogen bonding (thick green, (Fig 4) compound (A and C) of the carboxyl-CI-H with the OH-group of Tyr 385, Val 523 and with the carboxyl-OH of Val 349, Alkyl interaction with Leu 531, Tyr 348, Leu 352.

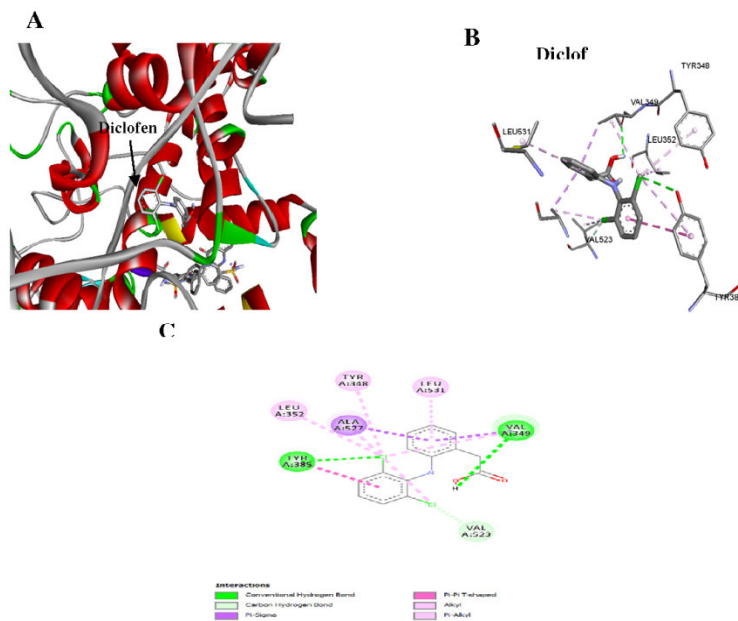


Fig.4. Docking of diclofenac into the active site of COX-2.

- (A): Diclofenac (In grey color) fitting into the pocket of COX2 enzyme showed in cartoon view.
 (B): Structure in 3D of the interactions between diclofenac and the key residue of Cox2.
 (C): Structure in 2D of Interaction between diclofenac and the key residues.

Table 6: Molecular docking scoring affinity and RMSD for compound C, A, Diclofenac and Indomethacin

| Compounds | Binding Affinity(Kcal/mol) | RMSD deviation from best mode |
|--------------|----------------------------|-------------------------------|
| Indomethacin | -10.3 | 0 |
| Compound C | -9.1 | 0 |
| Compound A | -8.6 | 0 |
| Diclofenac | -8.1 | 0 |

The docking study (inhibition of COX-2 by indomethacin) in the active site of Cox2 shows the superpose the Indomethacin natal crystal structure (IMN), and the docked Indomethacin structure into the crystal structure of COX2 pdb : (4COX) the reference drug (Indomethacin) exhibited hydrogen binding of the carboxyl-CO with the OH-group of Tyr 385 and of the carboxyl=O and carboxyl-CO of Tyr 355 and Ser 530 respectively (Thick green, Fig 5, B, C) and other several interactions with Arg 120, Val 349, Ala 527, Leu 531, Leu 384, Tyr 385, Met 522, Phe 381, Trp 387, Ser 530, Val 523, Leu 352, Ser 387, Tyr 355

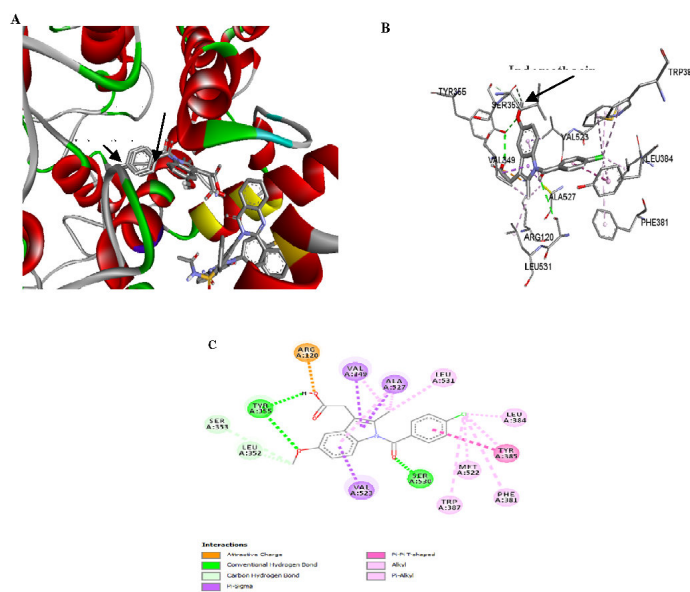


Fig.5. Indomethacin (In grey color) fitting into the pocket of COX2 enzyme.

- (A): The superpose of natal crystal structure Indomethacin (IMN), and structure of Indomethacin docked into the crystal structure of COX2 pdb: 4COX for interpretation of the references,
 (B): Structure in 3D of the interactions between Indomethacin and the key residue of Cox2,
 (C): Structure in 2D of Interaction between Indomethacin and the key residues

In addition, it shows several good links with the active site within 3 Å. The distance of the hydrogen bond ≤ 2.5 Å indicates better contact between the ligand and the receptor. The substituted quinazolinone A and C allows its interaction with the H-bond (C=O-H with Tyr 115) and, (N-H with Glu 524 and Arg 120) residues respectively (Thick green, Fig 6)

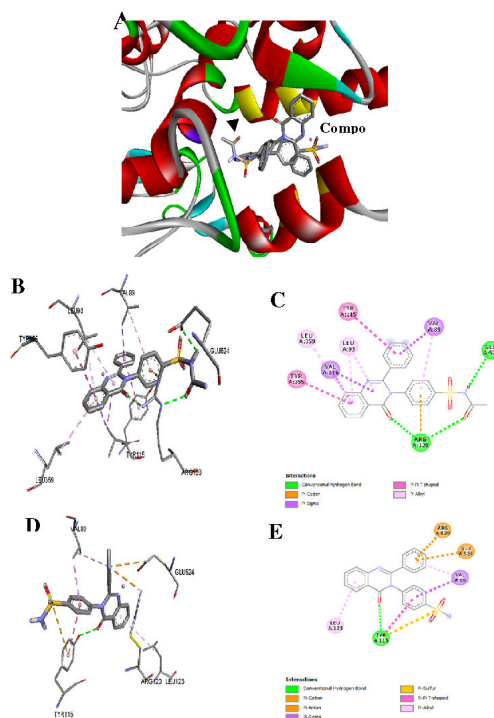


Fig.6. Illustrates compound A and C (in stick) and how it fits into the pocket and the possible bond formation.

(A) : Compound A and C fit into the pocket the protein is shown in cartoon view.

(B) : Structure 3D of the possible H-bond formation between both Arg 120 and Glu 524 between compound C and COX2.

(C): Structure 2D of bond formation between compound C and residues of Cox2.

(D): Structure 3D of the possible H-bond formation between Arg Tyr of compound A and COX2.

(E): Structure 2D of bond formation between compound A and residues of Cox2.

In addition it shows another interaction with several residues with Arg 120, Glu 524, Val 89, Leu 123 for compound A and Thr 355, Val 116, Leu 359, Leu 93, Tyr 115, Val 89 for compound C. Further, compound C shows several good link with the active site in comparing to Indomethacin and has the same residues interaction for example Tyr 355 and Arg 120. These results confirm that compound C has a significant anti-inflammatory activity production by inhibiting the COX-2 enzyme.

3. Conclusion

The synthesis of 4-(4-oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl) benzene sulfonamide (Compound A), N-acetyl-4-(4-oxo-2-phenyl-4H-quinazolin-3-yl)-benzenesulfonamide (Compound C) have been performed by allowing interaction of 2-phenylbenzoxazin-4-one with *p*-aminobenzenesulfonamides in a medium of acid catalyst and strong polar aprotic solvents (DMSO or DMFA). A strong polar aprotic solvents (such as DMSO & DMFA) were approved to increase the yield of reactions by 25% and 12.5% respectively.

Both compounds A and C having analgesic and anti-inflammatory activities but compound C showed a significant activity than compound A, also the compounds A has a pharmacological activity more significant than standard drug diclofenac. Further studies are important to ensure their analgesic and anti-inflammatory mechanisms.

The docking study explains the inhibitory effect of the A and C compounds against the in vivo anti-inflammatory and analgesic activity. The compounds A and C have similar effect as diclofenac and indomethacin reference drugs in the in vivo anti-inflammatory and analgesic activity.

References

- [1] D.J. Connolly, D. Cusack, T.P. O'Sullivan and P.J. Guiry, *Tetrahedron*, **2005**, *61*(43), 10153-10202.
- [2] Abida, N. Parvez, A. Rana, M. Imran, *Int. J. Energy Environ. Int. J.Pharm. Biol. Arch.* **2011**, *2*, 1651-1657.
- [3] Nathan C. *Nature* **2002**, *420*:846-885.
- [4] Vane JR. *Nature*, **1971**, *231*:232-235
- [5] Cheeseman G.W.H., Cookson R.F. New York: Wiley-Interscience, **1979**, 245.
- [6] Yahontov, L.N; Liberman, S.S; Jihareva, G.P; Kuzmin, K.K. Biological activity of quinazoline derivatives. *Pharm Chem J.* **1977** *11*: 14-26.
- [7] Shibata M, Ohkuba T, Takahashi H, Inoki R. *Pain* **1989**, *38*: 347-52.
- [8] Verma V, Mediratta PK, Sharma KK. *Indian J Physiol Pharmacol.* **2000**; *44*(3):255-64.
- [9] Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland HS, Hole K. *Pain* **1992**, *51*:5-17.
- [10] Trott O, Olson A.J. *J. Comput.Chem.* **2010**, *31*: 455-461.
- [11] Morris. G. M., Goodsell. D. S., et al. *J Comput Chem* **1998**, *19*: 1639-1662.
- [12] Kodonidi I.P., Magonov M.M., Ivanov R.V., Al-kaf A.G., Mutsueva S.H. *Pyatigorsk.* **2004**, *59*: 178-179.
- [13] Gilchrist TL. Gilchrist T.-M: Mir, *Heterocyclic chemistry* **1996**; 464.
- [14] Parker, A. *Adv.Org. Chem* **1968**, *5*, p:24-27, 42-43.
- [15] Silverstain R.M., G. C. Bassler and T.C. Morrill. 5th ed, Inc. NY, **1991**, 419
- [16] Tashhodjaev B, Turgunov K.K, Kristallovich A.L. *J. Chem. Natural Products.* **1999**, *3*: 364-367.
- [17] Nakanishi K. – M.: *Mir*, **1965**. 209
- [18] Safety (MSDS) data for drugs. -London, **2005**. [Electronic resource]- Access mode: <http://Physchem.ox.ac.UK>.
- [19] Sidorov k. k. *About. Toxicol Vet*, **2004**; *6*: 2-3.
- [20] Verma V, Mediratta PK, Sharma KK. *Indian J Physiol Pharmacol* **2000**, *44*: 255-64.
- [21] Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. *Mech Ageing Dev* **2002**, *123*: 1007-9.
- [22] Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. *J Pineal Res* **1997**; *23*: 106-116.
- [23] Cuzzocrea S, Caputi AP. *Biol Signals Recept* **1999**, *8*: 136-142.
- [24] Chauhan O, Godhwani JL, Khanna NK, Pendse VK. *J Exp Biol.* **1998**, *36*: 985-989.
- [25] Shibata M, Ohkuba T, Takahashi H, Inoki R. *Pain* **1989**, *38*: 347-352.
- [26] Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. *Pain* **1989**, *38*: 347-348.

Antioxidant activity from the aerial parts of *Anisotestrisulcus* from Yemen

¹Methaq Algabr, ²Nabil Al-Hajj, ³Abdul-malik Abu Dunia, ⁴Intisar Abdelrahim Bashir

¹Department of Chemistry, Laboratory of Chemistry, Faculty of Applied Sciences, University of Hajjah, P.O. Box 80004, Hajjah, Yemen.

²Department of Chemistry, Marine Science and Biological Research Authority, Aden, P.O. Box 1231, Aden, Yemen.

³Department of Biotechnology, Laboratory (Med-Biotech), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University Rabat, Morocco.

⁴Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, AL Neelain University Khartoum, Sudan.

Received 23 August 2016; Accepted 1 November 2016; Published 20 November 2016

Address For Correspondence:

Methaq Algabr, Department of Chemistry, Laboratory of Chemistry, Faculty of Applied Sciences, University of Hajjah, P.O. Box 80004, Hajjah, Yemen.

Copyright © 2016 by authors and American-Eurasian Network for Scientific Information (AENSI Publication).

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

ABSTRACT

Background: *Anisotestrisulcus* (Forssk.) Nees. (family Acanthaceae) aerial part is used in folk medicine in the Arabian peninsula for treatment of hepatic conditions. It showed different activities such as antibacterial, hepatoprotective, and cytotoxicity. It is a rich source of alkaloids and is used as an antidiabetic, bronchodilator, hypotensive, and local anesthetic. To the best of our knowledge, there is no report on the phenolic constituents of *A. trisulcus*. **Objectives:** to evaluate antioxidant activity of aqueous extracts from *Anisotestrisulcus*. **Results:** Results from antioxidant activity assays showed that ethanol in DPPH radical scavenging is more active than Petroleum ether and chloroform. This study suggested that the differences of the potency of the antioxidant activity may be explained by the differences in the polyphenol and flavonoid levels. **Conclusion:** *Anisotestrisulcus* leaves possesses significant antioxidant activity.

KEYWORDS: *Anisotestrisulcus*, Antioxidant activity, DPPH

INTRODUCTION

Reactive oxygen species are produced as a result of physiological processes as byproducts of energy production, for the prevention from the invasive microorganisms or as signaling and regulatory molecules [1]. The deleterious effects of the reactive species occur in the lack of the equilibrium between oxidation and antioxidant defense in the body. Oxidative stress may cause a serious damage in the body, as reactive oxygen species are known to be highly responsible from oxidation of biological molecules; such as lipids, DNA and proteins [1].

The genus *Anisotes* contains 23 species, which are represented by herbs, shrubs or sometimes climbers. [2,3] *Anisotestrisulcus* (Forssk.) Nees. (family Acanthaceae) is a stiff erect shrub with a height up to 3.5 m (Figure 1). It is monopodially branched carrying opposite decussate leaves at the nodes bearing bright orange-colored tubular flowers. [3] *A. trisulcus* known as Almodh, Madh, Moze, and Modaid in the Kingdom of Saudi Arabia (KSA) [3]. It is used locally in several pharmaceutical forms to limit tobacco consumption and suppress appetite [4]. The plant was known to possess anti-bacterial, cytotoxic, bronchodilator, hypotensive, local anesthetic, antidiabetic, and hepato-protective activities [2, 5, 6, 7]. It is also used as treatment for all hepatic conditions including hepatitis, jaundice, gallstone, and other hepatic problems [2, 6]. Previous phytochemical study of *A. trisulcus* revealed the isolation and identification of several alkaloids such as 5-hydroxy vasantine, 7-hydroxy vasicine, 7-hydroxy vasicinone, anisotine, peganine, vasicinone, 5-methoxypeganine, and trisulcusine [2, 8, 9]. In continuation of our investigation, we report herein the isolation

ToCite This Article: Methaq Algabr, Nabil Al-Hajj, Abdul-malik Abu Dunia, Intisar Abdelrahim Bashir., Antioxidant activity from the aerial parts of *Anisotestrisulcus* from Yemen. *Advances in Natural and Applied Sciences*. 10(16):Pages: 12-16

and structural elucidation of one new benzoyl flavonol: 7,8,30-trihydroxy-5-methoxy-40-benzoyl flavonol (5), along with eight known compounds: a-amyrin (1), b-sitosterol (2), stigmasterol (3), (2S,3S,4R)-2[(20R)-20-hydroxytetracosanoylamino]-octadecane-1,3,4-triol (4), allopateuletin (6), veratric acid (7), vanillic acid (8), and b-sitosterol-3-O-b-D-glucopyranoside (9) from *A. trisulcus* aerial parts. Their structures were established by various spectroscopic methods as well as comparison with authentic samples. The total methanolic (MeOH) extract and different fractions were evaluated for their antioxidant and anti-inflammatory activities.

In this study, the antioxidant activity of *trisulcus* (Forssk.) Nees. (family Acanthaceae) were evaluated by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay. DPPH is a free radical which has maximum UV absorption at 515 nm. The antioxidant capacity of the sample was determined by measuring the decrease in absorbance of DPPH after reduction.

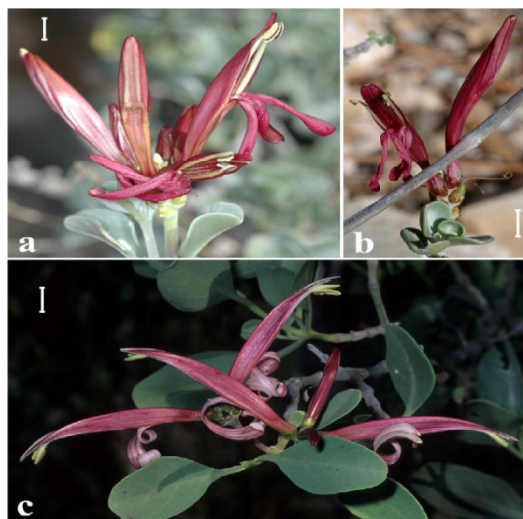


Fig. 1: *Anisotestrisulcus*

MATERIAL AND METHODS

Plant material:

The aerial parts of *Anisotestrisulcus* was collected in March 2016 during the flowering stage in the Hajjah area of Yemen. The plant was identified and authenticated by Dr. Prof. Abdellah Amine (College of Agriculture, Sana'a University).

2.2. Chemicals:

All chemical reagents were of analytical grade and all solvent were purchased from Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA).

Preparation of the Extracts:

Fifty grams leaves from plant was individually extracted with 300 ml of 95% methanol, Ethanol and diethyl ether (separately) in an ultrasonic device at room temperature. The extracts were filtered and the residues were re-percolated for three times and was eliminated from the solvent using a rotary evaporator and sample was preserved at 4 °C until used.

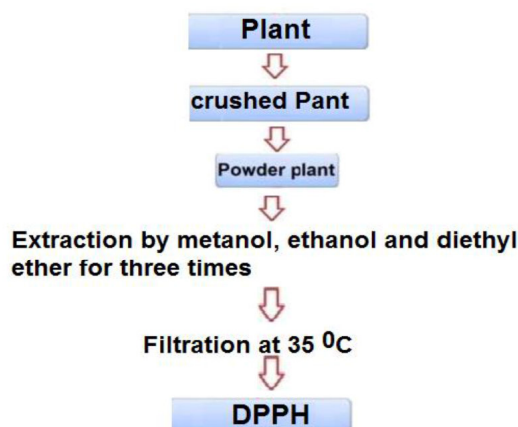


Fig. 2: Experiment flowchart for extract of *Anisotetrissulcus* plant

Antioxidant activity:

The antioxidant activity was determined as previously outlined by the decrease in the absorption of each concentration (0.25, 0.5, and 1 mg/mL) in DPPH solution (4 mg was dissolved in HPLC MeOH 50 mL to obtain a concentration of 80 µg/mL) monitored at 517 nm using a spectrophotometer [10,11,12]. The absorbance of DPPH in MeOH was measured after 2 min. The antioxidant activity of total MeOH extract and different fractions was measured in relation to TBHQ (as a reference antioxidant) set as 100% antioxidant activity. Determinations were performed in triplicate. The antioxidant activity was calculated using the following equation:

$$\text{Antioxidant activity: } 100 \times 1 - \frac{\text{absorbance with compound}}{\text{absorbance of the blank}}$$

Statistical Analysis:

The experiments were conducted at least in triplicate. Analysis of variance (ANOVA, one-way) was used to separate means at a 0.05 significant level (SPSS Version 13.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS AND DISCUSSION

The present study shows little antioxidant activity less than 50%. In extraction by ethanol, antioxidant activity was 13±0.05%, less than 50%. Extraction by methanol shows negative results, meaning zero antioxidant activity. Also, extraction by chloroform gave a result of 7±0.02, also less than the active propylgalate standard that we use as an antioxidant standard.

In a previous study [13], the antioxidant activity for *Anisotetrissulcus* in agreement with the present study using DPPH radical scavenging assay. DPPH shows negative results in three different concentration samples (0.25, 0.5 and 1.00) means low antioxidant percent and so not specific [13]. In bio-medical research laboratory, India, Jigani industrial area for evaluation of antioxidant activity of medicinal plant constituent *Anisotetrissulcus* shows positive results (0.65±0.11) using DPPH radical scavenging assay appear high percent more than 50% and so high specific to use [14]. The previous study of Vidyanaagar K Arad, Maharashtra, India -415109, for evaluation of antioxidant activity shows it is a rich source of polyphenol which led to the conclusion that high soluble phenolic in extract taken to strong free radical scavenging activity [15]. The present study is in agreement with [13] and different to other research this referentially due to different climate of previous study between India, Sudan and Cairo areas. Sudan and Cairo in equator area and India above equator area.

In this study, radical scavenging activity was determined for the selected extracts of *Anisotetrissulcus* plant. Being a stable free radical, the DPPH assay is a simple and rapid method frequently used to evaluate the ability of antioxidants to scavenge free radicals. As shown in (Fig.3), all the sample extracts exhibited significant dose dependent inhibition of DPPH activity that rapidly increase from 1.5 to 6.5 mg/ml. This showed that the young leaves exhibit a strong scavenging activity and it has been reported that phytochemicals especially plant phenolics constitute a major group of compounds that act as primary antioxidants [16]. Medicinal plants used in

traditional medicine and healing are among natural antioxidant sources. Plants are rich sources of phenolic compounds such as flavonoids, tannins and anthocyanins, which are the most important natural antioxidants [17]. Plants provide flavors, fragrances and traditional medicines as part of everyday life. Approximately 3000 plant species contain therapeutic activities, of which only 300 are commercially important [18].

Table 1: Antioxidant activity (DPPH) of *Anisotetrissulcus* extracts with one concentration.

| NO | Sample Code | DPPH scavenging test |
|----|-----------------|----------------------|
| 1 | Ethanol | 90±0.05 |
| 2 | Petroleum ether | inactive |
| 3 | Chloroform | 70±0.02 |
| 4 | TBHQ | 91±0.02 |

The values are means of three independent analyses.

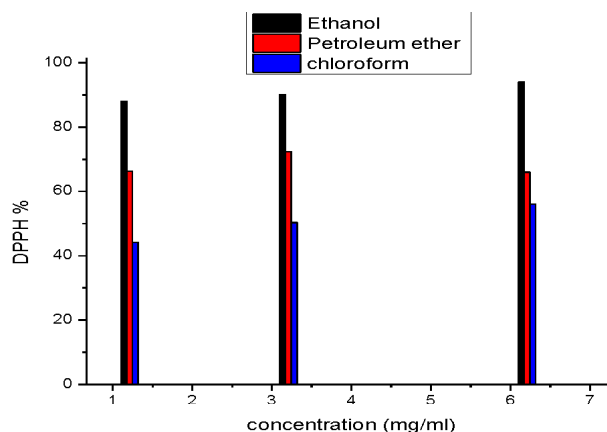


Fig. 3: DPPH radical scavenging activity of *P. imuloides* extracts with different concentrations. Data are expressed as mean ± SD (standard deviation) (n = 3).

Conclusion:

The results obtained in this study clearly showed that ethanol extracts from the leaves of *Anisotetrissulcus* possess antioxidant activity which may be caused by the high content of polyphenols and flavonoids. The very strong antioxidant activity of

Anisotetrissulcus suggests that the extracts obtained by polar solvents from the leaves could be used as an effective natural source of antioxidant and food additives.

ACKNOWLEDGMENT

This work is supported by ¹Department of chemistry, Faculty of Applied Science Hajjah University, Yemen. The authors wish to thank Dr: Abdulla Amin (Department of Biology in the College of Agriculture, Sana'a University, Yemen) for identification of the plant. Special thanks and greets to Mr. SharafAlkuhanifor his support research scientific.

REFERENCES

- Cornelli, U., 2009. Antioxidant use in nutraceuticals, *ClinDermatol*, 27: 175.
- El-Shanawany, M.A., H.M. Sayed, S.R.M. Ibrahim, M.A.A. Fayed, 2011. 5-Hydroxyvasentine, a new pyrroloquinazoline alkaloid from *Anisotetrissulcus*(Forssk.)Nees. *J Nat Prod Plant Resour*, 1: 80-5.
- Al-Rehaily, A.J., 2000. Pharmacognostic studies on the leaf of *Anisotetrissulcus*(Forssk.). *Pakistan J BiolSci*, 3: 1427-30.
- Collenette, S., 1999. Wild flowers of Saudi Arabia, National Commission for Wild life Conservation and Development (NCWCD) & Sheila Collenette. King of Saudi Arabia: King Fahd National Library, p: 2.

5. Al-Rehaily, A.J., M.S. Al-Said and K.E.H. El-Tahir, 2011. Peganine isolated from *Anisotetrissulcus* a smoking deterrent and anorexigenic agent. *African J Pharm Pharmacol.*, 5: 1342-8.
6. Ali, A.A.N., K. Al-rahwi and U. Lindequist, 2004. Some medicinal plants used in Yemeni herbal medicine to treat malaria. *African J TradCAM*, 1: 72-6.
7. Ali, N.A., W.D. Jülich, C. Kusniek and U. Lindequist, 2001. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, (2): 173-179.
8. Al-Azizi, M.M., 1979. Quinazoline alkaloids from *Anisotetrissulcus* L. *Egypt J Biotechnol.*, 2: 1-6.
9. Ali, A.A., H.M. Sayed, S.R.M. Ibrahim, A.M. Zaher, 2013. Chemical constituents, antimicrobial, analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Euphorbia peplus* L. *Phytopharmacology*, 4: 69-80.
10. Al-Musayeb, N.M., G.A. Mohamed, S.R.A. Ibrahim and S.A. Ross, 2013. Lupeol-3-O-decanoate, a new triterpene ester from *Cadabafarinose* Forssk. growing in Saudi Arabia. *Med Chem Res.*, 22: 5297-302.
11. Mohamed, G.A., A. Alliucide, 2013. New antioxidant flavonoid from *Allium cepa* L. *Phytopharmacology*, 4: 220-7.
12. Mohamed, G.A., S.R.M. Ibrahim, N.M. Al-Musayeb and S.A. Ross, 2013. New anti-inflammatory flavonoids from *Cadabaglandulosa* Forssk. *Arch Pharmacol Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0305-1>.
13. El-Shamawany, M.A., H.M. Sayed, S.R. Ibrahim and M.A. Fayed, 2014. Chemical constituents, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Anisotetrissulcus*. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 52(1): 9-14.
14. SATHISHA, A.D., H.B. LINGARAJU and K. SHAM PRASAD, 2011. E-Journal of Chemistry available at: <http://www.e-journals.net>, 8(2): 882-886.
15. Lokhande, K.D., C.G. Kulkarni, M.C. Shinkar, S.T. Jadhav and S.S. Salunkhe, 2014. International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology And Chemistry, available at: www.ijapbc.com IJAPBC - 3(3).
16. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism of their antioxidant activity available at <http://www.tandfonline.com/doi/abs.vopnhwarvom>.
17. Shariati, F.N., A. Kamkar, A.M.A. Shams, A. Misaghi, A.H. Jamshidi and K.G.R. Jahed, 2012. Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant *Pulicariagnaphalodes*.
18. Bakkali, F.S., D. Averbeck, Averbeck and M. Idaomar, 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.

RESUME

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation des fleurs de *C.arvensis* plante médicinale très connue dans la thérapie traditionnelle au Maroc.

Les extraits des fleurs N-héxanique (EH) et méthanolique (EM) ont été obtenus par soxhlet, celle de l'extrait aqueux (AE) par macération dans l'eau.

Une analyse quantitative révèle que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes totaux. L'identification chromatographique a permis de caractériser quatre grandes familles de composés phénoliques dont l'acide caféique est le représentant majeur.

L'évaluation, *in vitro* de l'activité antioxydante a montré que des différents extraits présentent des activités antiradicalaires et antioxydantes intéressantes.

Le criblage des extraits pour leur activité antimicrobienne a montré que 73 % des souches testées ont été inhibées par les extraits organiques et 13% par l'extrait aqueux. Les valeurs CMI de l'extrait méthanolique étaient de

12,5-25 mg/mL celles de l'extrait N-hexanique étaient de 6,25-12,5 mg/mL en étant bactéricide pour toutes les bactéries tandis que les extraits méthanolique étaient bactécide sur 50% des souches sensible, Seul l'extrait méthanolique, qui a montré une activité antifongique sur *Candida tropicalis 1* et *Candida famata 1*.

L'étude de cytotoxicité, a révélé que les extraits méthanolique et aqueux ont une activité sur les antimyéloïdes (CI₅₀ de 31 mg/mL)

Les propriétés anti-inflammatoires des extraits ont été étudiées par œdème induit par la carragénine et par traumatisme expérimental, l'extrait N-héxanique a montré une réduction significative de l'œdème

L'étude de l'activité antidiabétique sur les enzymes (α -amylase, α -glucosidase et β -galactosidase) a montré que les extraits méthanolique et aqueux sont de puissants inhibiteurs de ces enzymes.

Ces travaux permettent de postuler que les fleurs de *C.arvensis* sont une source prometteuse de composés anti-oxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et antidiabétiques.

Mots clés : *Calendula arvensis*, screening phytochimique préliminaire, composés phénoliques, CLHP-DAD-MS, activités antioxydante, antimicrobienne, cytotoxicité, anti-inflammatoire et antidiabétique.

Abstract

In this thesis our work contributes to the valorization of the flowers of *C. arvensis* this plant very known in traditional therapy in Morocco.

The N-hexanic (HE) and methanolic (ME) extracts were obtained by soxhlet, while the aqueous extract (AE) was obtained by maceration in cold water.

A quantitative analysis reveals that the methanolic extract is the richest in total polyphenols; total flavonoids. Chromatographic identification showed that four major families of phenolic compounds of which caffeic acid is the more representative.

The in vitro evaluation of the antioxidant activity has shown that different extracts show interesting anti-radical and antioxidant activities.

Screening of the extracts for their antimicrobial activity showed that 73% of the strains tested were inhibited by the organic extracts and 13% by the aqueous extract. MIC values of the methanolic extract were in between 12.5-25 mg / ml and those of the N-hexane extract were 6.25-12.5 mg /ml. being bactericidal for all bacteria while methanolic extract was bactericidal on 50% of bacterial tested, only the methanolic extract, which showed antifungal activity on *Candida tropicalis 1* and *Candida famata 1*.

The cytotoxicity study revealed that the methanolic and aqueous extracts have antimyeloid activity (IC 50 of 31 mg /ml).

The anti-inflammatory properties of the extracts were studied by carrageenan-induced oedema and by experimental trauma, the N-hexanic extract showed a significant reduction of oedema.

The study of the antidiabetic activity on the enzymes (α -amylase, α -glucosidase and β -galactosidase) showed that the methanolic and aqueous extracts are powerful inhibitors of these enzymes.

This work allows applying flowers of *C. arvensis* as a promising source of antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anti-diabetic.

Key words: *Calendula arvensis*, preliminary phytochemical screening, phenolic compounds, HPLC-DAD-M, activities, antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity, anti-inflammatory, antidiabetic.

ملخص

الأذريون الحقلي أو ما يسمى باللغة المغربية الدارجة بالجمرة تعتبر نبات طبي معروف لدى العشابين في الطب التقليدي ويتم استخدامها في العلاج نظراً لأهميتها في علاج التهابات الحادة وتسكين الآلام .

يهدف العمل المقدم في هذه الأطروحة للمساهمة في تقييم فاعلية الزهور لهذه النبتة الطبية المهمة (الجمرة) وذلك من خلال الفحص الأولي الفيتوكيميائي والتعرف على بعض المركبات الفينولية بواسطة HPLC-MS ، DAD-MS ، أيضاً تقييم النشاط المضاد للأكسدة، والمضادة للميكروبات، النشاط المضادة للخلايا السرطانية (سرطان الدم) ، النشاط المضادة للالتهابات و مضادات السكري .

لقد قمنا بجمع النبتة ومن ثم قطفنا الزهور للدراسة من منطقة سيدي العابد- بالعاصمة الرباط ، بعد ذلك قمنا باستخلاص الزهور بثلاثة مذيبات هامة لها نسبة قطبية مختلفة وهي مستخلص الميثانول والهكسان (HE) و (ME) باستخدام جهاز الأستخلاص (Soxhlet)، في حين تم الحصول على المستخلص المائي (AE) من خلال النقع في الماء البارد.

ساعد التقييم الأولي للمحتوى الفيتوكيميائي للزهور عن وجود بعض المركبات الكيميائية وهذا ما أكدته التحليل الكمي للبوليفينولات ومركبات الفلافونويد الإجمالية، أظهرت النتائج، أن مستخلص الميثانول افضل المستخلصات وأكثرها غنى بمركبات الفينولات والفلافونيد. ومن خلال التعرف الكروماتوغرافي HPLC-DAD-MS. تم العثور على أربع مركبات رئيسية ، كما اننا لاحظنا أن حمض الكافيك هو الأكثر تمثيلاً.

لقد تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة للثلاثة المستخلصات بواسطة أربعة اختبارات ، وهي: تثبيط الجذر الحر (DPPH •) - وخفض قوة أيون الحديدك (FRAP) ، تثبيط الجذر الحر (ABTS) ، وتثبيط اكسدة ال β كاروتين، وبالتالي، من خلال هذا تم ملاحظة القدرة العالية المضادة للأكسدة لمستخلص الميثانول والتي تعتمد على محتوى الفلافونويدات والبوليفينول الكلي مقارنة مع مضادات الأكسدة (حمض الغاليك وروتين). ومن خلال هذه النتائج تبين لنا ان هناك علاقة واضحة ؛ وضحت ان المستخلص الأكثر احتواء علي الفلافونيد والبوليفينول هو الأكثر فعالية .

كما تم فحص المستخلصات لنشاطها المضاد للميكروبات؛ أظهرت النتائج أن نسبة 73 % من السلالات البكتيرية المختبرة تم تثبيطها بواسطة المستخلصات العضوية الميثانول والهكسان و نسبة 13% منها تم تثبيطها بواسطة المستخلص المائي ، وكانت قيم MIC من المستخلص الميثانول ما بين 12.5 و 25 ملغ / مل. في حين كانت MIC لمستخلص الهكسان ما بين 6.25-12.25 ملغ / مل. وكذلك ، تبين لنا ان المستخلصات العضوية لها

نشاط ضئيل كمضاد للفطريات لنوعين هم *Candida tropicalis 1* and *Candida famata 1*.

وبالإضافة إلى ذلك، أظهرت الدراسة ان مستخلصات الميثانول والماء تبين ان لها نشاط ملحوظ ومهم كمضاد لسرطان الدم ، وان التركيز للتثبيط النصفى CI50 هو 31 ملغ / مل .

اما بالنسبة لدراسة الفعالية المضادة للالتهابات عن طريق حقن مادة الكراجينين وأيضاً عن طريق الضرب في رجل الفئران ، تبين لنا ان المستخلصات العضوية الهكسان والميثانول ، أظهرت انخفاضا كبيرا في حجم الورم (P <0,05) بالمقارنة مع دواء المضاد للالتهاب الاندوميثاسين 10 ملج.

ان دراستنا علي الإنزيمات الهضمية الفا الأميليز، الفا جلوكوزيداز وبيتا غالكتوزيداز ، أظهرت ان مستخلص الميثانول والماء لها تأثير مثبت فعال، بينما مستخلص الهكسان كان لها تأثير ضعيف علي جميع الإنزيمات. الإستنتاج ، نستنتج أن مستخلصات الزهور للأذريون الحقلي (الجمرة) وبالأخص مستخلص الميثانول لها مستقبل واعد ومهم في المعالجات الدوائية لكثير من الامراض التي تم التحقيق منها .

كلمات البحث : أذريون الحقلي ، الفحص الاولى الفيتو الكيميائي ، مركبات الفينول ، HPLC-DAD-MS ، الأنشطة المضادة للأكسدة، الجراثيم، سمية الخلايا، مضاد للالتهابات. المضادة لمرض السكري.

أطروحة الدكتوراه

دراسة كيميائية، تقييم النشاط البيولوجي والفارماكولوجي لزهور النبتة الطبية المسماة الأدريون الحقلي (الجمرة)

قدمت ونوشتت علانية يوم: 2018 /07/03

من طرف

السيد عبد الملك عبد الله يحيى أبو دنيا

المزاد في 1 يناير 1978

لذيل شهادة الدكتوراه في علم الأدوية (بيوتكنولوجيا الأدوية الحيوية)

الكلمات الأساسية: أدريون الحقلي، الفحص الأولي الفيتو الكيميائي، مركبات الفينول، HPLC-DAD-MS، تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة، الجراثيم، سمية الخلايا، مضادات الالتهابات، مضادات مرض السكري

| | | |
|------------|-----------------------------------|-------------------------|
| الرئيس | أستاذة علم الأدوية والسموم | السيدة كاتم العلوي |
| مشرف | أستاذ البيوتكنولوجيا الحيوية | السيد عز الدين إبراهيمي |
| مشرف مساعد | أستاذ الكيمياء الدوائية | السيد محمد أنصار |
| ممتحن | أستاذة علم الأدوية والسموم | السيدة أمينة زالو |
| ممتحن | أستاذ الكيمياء الحيوية | السيد محمد عانب |
| مقرر | أستاذ الكيمياء التحليلية | السيد مصطفى دراوي |
| مقرر | أستاذ فيزيولوجيا الكيمياء الحيوية | السيد سعيد الوهلية |
| مقرر | أستاذ علم الأدوية والسموم | السيد رشيد الجاودي |