N° d'ordre :

الجمهوريـــــــة الجزائريـــــة الديمقراطية الشعبيـــــة

وزارة التعليـــــم العـــــالي والبحـــــث العلمـــــي

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DJILLALI LIABÈS Sidi Bel Abbés

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

Mme BENCHAACHOUA. Abbassia

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Enzymes, Micro-organismes et Bio-industries

Intitulé

Caractérisation et Valorisation d'une plante de la famille des astéracées de la région de Sidi Bel Abbès : Évaluation des substances bioactives de *Silybum marianum*.

Soutenu le **:** 28/07/2019

Devant le Jury composé de **:**

Président :	Dr. Miloud MISSOURI,	Université DJILLALI LIABÈS de Sidi Bel Abbès.
Examinateurs :	Dr. Ahmed HARIRI,	Université Mustapha STAMBOULI de Mascara.
	Dr. Rabah KERROUCHA,	Université Oran 1 Ahmed BENBELLA **.**
Directrice de thèse :	Dr. Hassiba MAHDJOUB BESSAM,	Université DJILLALI LIABÈS de Sidi Bel Abbès.

Année universitaire 2018/2019

بسم الله الرحمن الرحيم

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À la mémoire de mon cher et regretté père, et mon cher frère, dont je regrette l'absence,

À la mémoire de ceux que je n'oublierai jamais….

Lokmane Marouane AbedElrahmane Et Lokmane Fayçal Mohamed Ali

Je prie Dieu le tout puissant de les accueillir dans son paradis.

À ma mère, pour ses souffrances endurées, et sa jeunesse sacrifiée pour me permettre d'être parmi les meilleurs.

À mon mari : Ce travail a aussi été réalisé grâce à toi, au temps que tu as bien voulu m'accorder, par amour et par respect à mon ambition. Merci.

À mes enfants, Mohamed Mounir, Ahmed Sohiab et Nourane Serine sans eux, rien n'aurait été possible…

À mon beau père et ma belle-mère pour leur soutien tout le long de mes études.

À tous ceux qui m'ont soutenue, mes chères sœurs et mes belles sœurs.

À mes frères et mes beaux-frères.

À mes nièces et mes neveux.

À mes amies et à toute ma famille.

À tous ceux que j'aime.

B. l. Abbassia

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier « Allah ﷻ » le tout puissant, qui m'a donné la santé, la force, le courage, la patience et la persistance à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

À ma directrice de thèse, Mme MAHDJOUB BESSAM Hassiba. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse, veuillez trouver dans cet ouvrage le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Aux membres de jury,

Monsieur MISSOURI Miloud. Maître de Conférences "A", Université DJILLALI LIABÈS, vous m'avez fait l'honneur d'accepté de présider cette thèse.
Je vous remercie pour votre disponibilité et votre expérience mise au service de ce travail.

Monsieur HARIRI Ahmed de Université Mustapha STAMBOULI, vous m'avez fait l'honneur d'accepté de juger ce travail.
Je vous remercie de vouloir bien assister à ma soutenance pour nous faire part de votre point de vue.

Monsieur KERROUCHA Rabah de l'Université Oran 1 Ahmed BENBELLA, vous m'avez fait l'honneur d'être présent à ma soutenance.
Je vous remercie d'avoir bien voulu accepter la charge d'examinateur de ma thèse.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur BOUKHARI Yahia, de l'Université Mustapha STAMBOULI, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et tout mon respect pour son aide et ses encouragements.

C'est avec un grand plaisir que j'adresse mes vifs remerciements à ma collègue et mon amie Mme SAIDI Imene de l'Université Mustapha STAMBOULI pour ses encouragements, son soutien moral et ses qualités humaines tout au long de la réalisation de ce travail.

Je vous voudrais témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont fait bénéficier de leur conseil et de leur expérience.

J'adresse mes remerciements particuliers à mes parents, ma famille pour leur amour leur soutien inconditionnel et de leur expérience. Merci.

Résumé

Silybum marianum ou chardon Marie est une plante médicinale, appartenant à la famille des astéracées, la plus largement utilisée à travers le monde, pour sa richesse en substances bioactives. L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'efficacité de deux méthodes d'extraction (macération et décoction) de composés phénoliques à partir des différentes parties végétales (feuilles, tiges et fleurs) de *Silybum marianum*, ainsi que la détermination quantitative de l'efficacité de différents solvants d'extraction utilisés.

L'évaluation de l'efficacité des méthodes d'extraction dans les différents extraits bruts a été estimée en quantifiant les teneurs en composés phénoliques par des méthodes spectrophotométriques et en déterminant les activités antioxydantes in vitro, par deux tests à savoir ; la capacité antioxydante totale et le pouvoir de piéger du radical libre DPPH$^{\bullet}$. En outre, l'évaluation du pouvoir antimicrobien a été réalisée par deux techniques ; la méthode de diffusion des disques et la méthode de dilution sur milieu solide. L'identification des composés phénoliques des extraits actifs a été réalisée par RP-HPLC.

Le screening phytochimique a révélé la richesse en contenu phénolique des différents extraits obtenus avec différents solvants d'extraction. Les résultats ont montré que l'extrait hydro-méthanolique des feuilles obtenu par macération, a révélé la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (18.75± 0.55 mg EAG/g MS), tandis que l'extrait hydro-éthanolique des feuilles, obtenu par décoction a enregistré la meilleure teneur en flavonoïdes (5.08 ± 0.57 mg EC/g MS). La plus forte teneur en tanins condensés est observée pour l'extrait aqueux des tiges, obtenu par décoction (04.14 ± 0.82 mg EAT/g MS).

La meilleure activité de piégeage du radical DPPH$^{\cdot}$ par rapport à l'antioxydant de synthèse (acide ascorbique), est montrée avec l'extrait hydro-éthanolique des fleurs obtenu par décoction avec une IC_{50}de 2.099 ± 0,08 µg/ml. L'extrait hydro-éthanolique de la tige, donne la plus grande capacité antioxydante totale (172.04 ±26.06 mg EAG/g MS). Une forte corrélation linéaire a été établie, entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité antiradicalaire.

L'étude de l'activité antimicrobienne, montre un remarquable effet antibactérien de l'extrait hydro-méthanolique et de l'extrait hydro-acétonique par décoction de la tige vis-à-vis des souches *Micrococcus luteus* (ATCC 10240) et *Escherichia coli* (ATCC 8739), respectivement avec une CMI=6.25 mg/ml. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) s'est montré sensible au contact de l'extrait hydro-méthanolique des fleurs par macération, avec une CMI de 12.5 mg/ml, alors que *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) est inhibé par 12.5 mg/ml d'extrait hydro-éthanolique obtenu des fleurs par décoction.
La séparation des extraits par RP-HPLC montre la présence de certains flavonoïdes, de tanins condensés et de dérivés phénoliques.

On peut conclure que l'extraction des composés phénoliques à partir de différents échantillons végétaux est fortement influencée par le type de solvant et la méthode d'extraction utilisée, ainsi que par la capacité de l'échantillon végétal à se solubiliser dans les solvants. Il est donc très difficile de préétablir un mode d'extraction standard approprié pour tous les composés phénoliques.

Mots clés : *Silybum marianum*, composés phénoliques, solvant d'extraction, macération, décoction, activité antioxydante, activité antimicrobienne, RP-HPLC.

Abstract

Silybum marianum or milk thistle is a medicinal plant, belonging to the Asteraceae family, the most widely used around the world, for its richness in bioactive substances. The main objective of this study is to evaluate the efficacy of two methods of extraction (maceration and decoction) of phenolic compounds from different plant parts (leaves, stems and flowers) of *Silybum marianum*, and quantitative determination. The effectiveness of the various extraction solvents used.

The evaluation of the efficiency of the extraction methods in the various crude extracts was estimated by quantifying the contents of phenolic compounds by spectrophotometric methods and by determining the antioxidant activities in vitro, by two tests namely; total antioxidant capacity and the ability to trap the free radical DPPH$^{\bullet}$. In addition, the evaluation of antimicrobial potency was performed by two techniques; the disk diffusion method and the solid-state dilution method. The identification of the phenolic compounds of the active extracts was carried out by RP-HPLC.

The phytochemical screening revealed the richness in phenolic content of the various extracts obtained from several extraction solvents. The results showed that the aqueous methanol leaf extract obtained by maceration, revealed the highest content of total polyphenols (18.75 ± 0.55 mg EAG / g MS), while, aqueous ethanol extract of the leaves, obtained by decoction recorded the best content of flavonoids (5.08 ± 0.57 mg EC / g MS). The highest content of condensed tannins is observed for the aqueous extract of the stems, obtained by decoction (04.14 ± 0.82 mg EAT / g MS).

The best activity for trapping the DPPH$^{\cdot}$ radical relative to the synthetic antioxidant (ascorbic acid) is shown by the aqueous ethanol flower extract obtained by decoction with an IC50 of 2.099 ± 0.08 µg / ml. The aqueous ethanol extract of the stem, gives the greatest total antioxidant capacity (172.04 ± 26.06 mg EAG / g MS). A strong linear correlation was established between flavonoid contents and antiradical activity.

The study of the antimicrobial activity shows a remarkable antibacterial effect of the aqueous methanol extract and the aqueous acetonic extract by decoction of the stem with respect to the *Microccocus luteus* (ATCC 10240) and *Escherichia coli* (ATCC 8739), strains, respectively with a MIC = 6.25 mg / ml. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) was sensitive to contact with the aqueous methanol extract of the flowers by maceration, with a MIC of 12.5 mg / ml, where as *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) is inhibited at 12.5 mg / ml by the aqueous ethanolic extract of the flowers by decoction.
The separation of the extracts by RP-HPLC shows the presence of certain flavonoids, condensed tannins and phenolic derivatives.

Finally, it is concluded that the extraction of phenolic compounds from different plant samples is strongly influenced by the type of solvent and the extraction method used, as well as the ability of the plant sample to solubilize in solvents. It is therefore very difficult to pre-establish an appropriate standard extraction method for all phenolic compounds.

Key words: antimicrobial activity; RP-HPLC; antioxidant activity; decoction ; extraction solvent , maceration; phenolic compounds ; *Silybum marianum* .

ملخص

Silybum marianum أو النبتة الشوكية هي نبات طبي ، ينتمي إلى عائلة : Asteraceae

الأكثر استخداما في جميع أنحاء العالم، لثرائها في المواد النشطة بيولوجيا. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم فعالية طريقتين للاستخراج (النقع، الغلي) للمركبات الفينولية من أجزاء نباتية مختلفة (الأوراق، السيقان والزهور) من*Silybum marianum* وتحديد الكمية فعالية مذيبات الاستخلاص المختلفة المستخدمة.
تم تحديد المحتوى الكمي للمركبات الفينولية بواسطة تقنيات طيفية، وكذا تم تحديد أنشطة مضادة للأكسدة، في المختبر بواسطة اختبارين هما: القدرة الكلية لمضاد الاكسدة والقدرة على تثبيط الجذر DPPH. بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم فعالية مضادات الميكروبات من قبل تقنيتين. طريقة نشر القرص وطريقة التخفيف في وسط جامد. تم تنفيذ تحديد المركبات الفينولية للمستخلصات النشطة بواسطةRP-HPLC .

كشف الفحص الكيميائي النباتي عن ثراء المحتوى الفينولي للمستخلصات المختلفة التي تم الحصول عليها من مذيبات استخلاص متعددة. أوضحت النتائج أن مستخلص *أوراق Silybum marianum* المستخرج بواسطة عملية النقع، كشف عن أعلى محتوى للبولي فينول الكلي (18.75 ± 0.55 ملغ معادل حمض الغاليك/ غ مادة جافة) بينما المستخلص المائي الايثانولي للأوراق، التي تم الحصول عليها عن طريق الغلي سجلت أفضل محتوى الفلافونويد (5.08 ± 0.57 ملغ معادل الكاتشين/ غ مادة جافة). لوحظ أعلى محتوى من التانينات المكثف للمستخلص المائي للسيقان، التي تم الحصول عليها عن طريق الغلي (04.14 ± 0.82 ملغ معادل حمض التانيك/ غ مادة جافة).

أفضل نشاط تثبيط الجذر DPPH فيما يتعلق تركيب مضادات الأكسدة (حمض الاسكوربيك)، يتضح من مستخلص المائي الكحولي من الزهور التي حصلت عليها عن طريق الغلي مع IC50 من 2.099 ± 0.08 ميكغ/ مل. يعطي المستخلص المائي الإيثانولي من الجذع أكبر قدرة مضادة للأكسدة (172.04 ± 26.06 ملغ معادل حمض الغاليك/ غ مادة جافة). وبالتالي هناك علاقة خطية قوية بين محتويات الفلافونويد والنشاط المضاد.

تُظهر دراسة النشاط المضاد للميكروبات تأثيرًا مضادًا للجراثيم من المستخلص المائي الميثانولي والمستخلص المائي-الأسيتوني باستخدام الغلي من الجذع فيما يتعلق *Micrococcus luteus* ATCC 10240) *luteus* و*coli* Escherichia (ATCC 8739) على قيمة الحد الأدنى للتركيز المثبط هى6.25 ملغ/مل. كانت *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) *a* حساسة للتلامس مع المستخلص المائي للميثانول من الزهور عن طريق النقع، مع الحد الأدنى للتركيز المثبط م12.5 ملغ/ مل، في حين تم تثبيط *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)عند 12.5.

يظهر تحاليل المستخلصات بواسطة تقنية وجود بعض الفلافونيدات، التانينات المكثفة والمشتقات الفينولية.
وأخيرا، استنتج أن استخراج المركبات الفينولية من عينات نباتية مختلفة يتأثر بشدة بنوع المذيب وطريقة الاستخلاص المستخدمة، وكذلك قدرة العينة النباتية على الذوبان في المذيبات. لذلك من الصعب للغاية إنشاء طريقة استخراج قياسية مناسبة لجميع المركبات الفينولية.

الكلمات المفتاحية: -*Silybum marianum*- RP-HPLC- الغلي-المركبات الفينولية –النقع-مذيب الاستخلاص- نشاط مضاد للأكسدة-نشاط مضاد للميكروبات.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements

Résumé

ملخص

Abstract

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale……..... 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur *Silybum marianum*

I.1. Famille des Astéracées……... **3**

I.2. Présentation du Chardon Marie (*Silybum marianum*)……..... **3**

I.3.Historique du chardon marie …….. **4**

I.4. Noms vernaculaires…… **4**

I.5.Position Systématique……. **5**

I.6.Habitat et origine…….. **5**

I.7.Description morphologique…….. **6**

I.8.Constituants chimiques de *Silybum marianum*……... **7**

I.8.1. Principaux composants du fruit …….. **7**

I.8.2. Les principaux composants de la partie aérienne ……... **8**

I.9. Propriétés et activités biologiques de la plante …… **9**

I.10.Propriétés antioxydantes…….. **11**

I.11.Toxicité, effet indésirables……... **13**

Chapitre II : les composés phénoliques

II.1. Biosynthèse des polyphénols…… **14**

II.1.1. La voie shikimate ……. **14**

II.1.2. La voie de phénylpropanoide……. **15**

II.1.3. La voie acétate/ malonate…….. **16**

II.2. Classification des polyphénols…… **17**
II.2.1. Phénols simples et les acides phénoliques…… **19**
II.2.1.1 Phénols simples …….. **19**
II. 2.1.2. Les acides phénoliques simples …… **19**
II.2.1.2.1. Les acides hydroxybenzoïques …….. **20**
II.2.1.2.2. Acides hydroxycinnamiques …….. **20**
II.2.2. Les flavonoïdes…… **21**
II.2.2.1. Flavones et Flavonols…….. **22**
II.2.2.2. Flavanones et hydroflavonols……. **22**
II.2.2.3. Flavanols……. **22**
II.2.3. Les chalcones et aurones ……. **23**
II.2.3.1. Les chalcones…….. **23**
II.2.3.2. Les aurones…….. **24**
II.2.4. Tanins…… **24**
II.2.4.1. Tanins hydrolysables…… **25**
II.2.4.2. Tanins non hydrolysables ou tanins condensés……... **25**
II.2.5. Les coumarines ……. **26**
II.2.6. Stilbènes …… **27**
II.2.7. Les quinones ……. **27**
II.2.8. Les alcaloïdes……. **28**
II.3. Propriétés chimiques des polyphénols……..... **28**
II.3.1. Acidité ……... **28**
II.3.2. Liaison hydrogène……. **28**
II.3.3. Nucléophilie…….. **28**
II.3.4. La polarisabilité……. **29**
II.3.5. Complexation des protéines…….. **29**
II.3.6. Chélation des métaux……. **29**
II.3.7. Piégeage des radicaux libres…….. **29**
II.4. Propriétés biologique des polyphénols……... **29**
II.5. Méthode d'extraction des composés phénoliques…….. **31**
II.5.1. Extraction par macération…….. **31**
II.5.2. Extraction par décoction …….. **32**
II.5.3. Autres méthodes d'extraction…… **32**

II.6. Séparation des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée…….. **32**

Chapitre III : Activités antioxydantes et antimicrobiennes

III.1. Activités antioxydantes…….. **34**

III.2. Le stress oxydant …… **34**

III.3. Les radicaux libres…….. **34**

III.3.1. Classes des radicaux libres……... **35**

III.3.1.1. Radicaux libres primaires…… **35**

III.3.1.2. Radicaux libres secondaires……... **36**

III.3.2. Production des radicaux libres…….. **37**

III.3.2.1. Les sources endogènes des radicaux libres…… **37**

III.3.2.2. Les sources exogènes des radicaux libres ……. **37**

III.3.3. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques…… **38**

III.3.3.1. La peroxydation des lipides membranaires …….. **39**

III.3.3.2. Oxydation des protéines ……... **40**

III.3.3. 3. Acides nucléiques……. **40**

III.4. Les antioxydants ……. **41**

III.4.1. Classification des antioxydants selon leurs natures……. **42**

III.4.1.1. Les antioxydants naturels ……. **42**

III.4.1.2. Les antioxydants synthétiques……... **43**

III.5. Avantages et inconvénients des antioxydants de synthèse…….. **46**

III.6. Les antioxydants piégeurs des ERO…… **46**

III.7. Polyphénols comme antioxydants……... **47**

III.8. Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire……... **48**

III.8.1. Test de la capacité antioxydante totale …… **48**

III.8.2. Test de piégeage du radical DPPH ° ……... **49**

III.8.3. Test de réduction de fer (FRAP)…… …… **49**

III.8.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (β- carotene bleaching method)…… **49**

III.8.5. Test de piégeage du radical $ABTS^{\cdot+}$……. **50**

III.9. Polyphénols et activité antimicrobienne……. **50**

Partie II *:* Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1.Objectif du travail……. **52**

I.2.Matériel végétal…… **52**
I.2.1. Présentation de site de prélèvement ……... **53**
I.2.2. Présentation et identification de la plante ……. **53**
I.3.Méthodes d' extraction……. **54**
I.3.1.Extraction par macération…… **54**
I.3.2. Extraction par décoction……. **54**
I.4. Calcul des rendements d'extraction …… **54**
I.5. Étude quantitative et qualitative des différents extraits obtenus……. **55**
I.5. 1. Analyse quantitative ……. **55**
I.5.1.1.Mise en évidence des flavonoïdes …….. **55**
I.5.1.2. Mise en évidence des tanins …… **55**
I.5.1.3. Mise en évidence des saponines…….. **55**
I.5.1.4. Mise en évidence des anthraquinones ……. **55**
I.5.1.5. Alcaloïdes …… **56**
I.5.1.6. Détection des glycosides cardiotoniques (Keller- Killiani)……. **56**
I.5.1.7. Stérols et triterpènes (Liebermann Burchard)……. **56**
I.6.Analyse quantitative …….. **56**
I.6.1. Dosage des composés phénoliques …… **56**
I.6.2. Dosage des flavonoïdes totaux ……. **57**
I.6.3. Dosage des tanins condensés ……. **58**
I.7. Détermination de l'activité antioxydante ……. **58**
I.7.1. Capacité antioxydant totale …… **59**
I.7.2. Piégeage de radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) …….. **59**
I.8. Evaluation de l'activité antibactérienne…… **60**
I.8.1. Préparation des différentes dilutions des extraits…… **61**
I.8.2. Description des souches bactériennes……. **61**
I.8.3. Préparation des inoculums bactériens……. **62**
I.8.4. Ensemencement et dépôt des disques…… **62**
I.8.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide……. **63**
I.9. Séparation des composés phénoliques par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée……... **63**
I.9.1. Principe……... **63**

I.9.2. Description du système RP-HPLC utilisé…….. **64**

I.10. Analyses statistiques ……. **65**

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1.Rendement d'extraction……. **66**

II.2.Analyse phytochimique qualitative et quantitative……... **70**

II.2.1. Analyse qualitative…… **70**

II.2.2. Analyse quantitative de composés phénoliques…… **73**

II.2.2.1. Courbes d'étalonnages…… **73**

II.2.2.2. Dosages de polyphénols totaux……... **76**

II.2.2.3. Teneur en flavonoïdes …… **80**

II.2.2.4. Teneur en tanins…….. **83**

II.3.Pouvoir antioxydant des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* ……. **86**

II.3.1. Capacité antioxydante totale (Total Antioxidant Capacity : TAC)……... **86**

II.3.2. Capacité de piégeage du radical DPPH ·……..... **91**

II.4. Corrélation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en composés phénoliques des différents extraits de *Silybum marianum*……. **102**

II.5. Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tanins) et les IC50……... **104**

II.6.Évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits …… **107**

II.6.1. Évaluation de l'activité antibactérienne …… **107**

II.6.1.1. Le pouvoir antibactérien des différents extraits des feuilles de *Silybum marianum*……..... **108**

II.6.1.2. Le pouvoir antibactérien des différents extraits de la tige de *Silybum marianum*……. **110**

II.6.1.3. Le pouvoir antibactérien des différents extraits des fleurs de *Silybum marianum*……. **112**

II.6.2. Étude de la CMI des différents extraits bruts par méthode de dilution sur milieu gélosé …… **117**

II.7. Analyses par HPLC des extraits de *Silybum marianum*…….. **120**

II.7.1. Analyse des extraits obtenus de la tige ……. **121**

II.7.1.1. Analyse de l'extrait hydro- éthanoïque /décoction de tige……. **121**

II.7.1.2. Analyse de l'extrait hydro- acétonique de la tige obtenue par macération…….. **122**

II.7.2 Analyse des extraits obtenus à partir des feuilles …….. **123**

II.7.2.1. Analyse de l'extrait hydro-éthanolique de la feuille obtenue par décoction……. **123**

II.7.2.2. Analyse de l'extrait hydro-acétonique de la feuille obtenue par macération……. **124**

II.7.3. Analyse des ’extraits obtenus à partir des fleurs..... **125**

II.7.3.1. Analyse de l’extrait hydro-méthanolique de la fleur obtenue par macération..... **125**

II.7.3.2. Analyse de l’extrait hydro-méthanolique de la fleur obtenue par décoction……. ……. **126**

Conclusion générale et perspectives…….. 131

Références bibliographiques…… 134

Annexes…… 159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
01	Activités biologiques en fonction des composés actifs de *Silybum marianum*..	11
02	Les principales classes des composés phénoliques…….	19
03	Principales substances antioxydantes…….....	45
04	Liste des polyphénols liés à leur activité antimicrobienne (bactéries, champignons et virus)…….	51
05	Description et pouvoir pathogène des souches testées……...	61
06	La transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D)	62
07	Rendements d'extraction des différentes parties de *Silybum marianum* par macération et décoction……..	66
08	Résultat de la phytochimie qualitative des extraits des différentes parties de *Silybum marianum par* macération et décoction……..	71
09	Teneurs en polyphénols totaux dans différentes parties de *Silybum marianum* extraits par macération et décoction……	77
10	les teneurs en flavonoïdes (moyenne+ écart type) des différentes parties de *Silybum marianum* par macération et décoction……..	80
11	les teneurs en tanins (moyenne+ écart type) des différentes parties de *Silybum marianum* par macération et décoction……..	83
12	Capacité antioxydante totale des extraits des différentes parties de la plante *Silybum marianum* issu par macération et décoction……..	91
13	Valeurs de CI_{50} des extraits des différentes parties de la plante *Silybum marianum* obtenu par macération et décoction……...	100
14	Relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et les tanins condensés des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par macération……...	103
15	Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tannins) et la CAT des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par décoction…….	104
16	Corrélations linéaires entre le pouvoir antiradicalaire (IC_{50}) et les composés phénoliques des extraits des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par macération……	105

17 Corrélations linéaires entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tanins) et les IC_{50} des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par décoction……. **106**

18 Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits des feuilles de *Silybum marianum* par macération et décoction et des contrôles……. **109**

19 Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits des tiges de *Silybum marianum* par macération et décoction et des contrôles …… **111**

20 Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits des fleurs de *Silybum marianum* par macération et décoction et des contrôles……. **113**

21 la CMI de certains extraits bruts de *Silybum marianum*..... **119**

22 Listes des produits chimiques et réactifs…… **159**

23 Temps de rétention de quelques standards utilisés dans l'analyse par HPLC… **162**

LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
01	Morphologie des différentes parties de Silybum marianum (chardon Marie) ….	07
02	Les flavanolignanes majeures de la Silymarine……..	09
03	Mécanisme d'action de la silymarine……..	13
04	La voie de shikimate……	15
05	La voie de phénylpropanoide……	16
06	Classification et structure des principales classes de polyphénols …….	18
07	Exemples d'acides hydroxybenzoïques …….....	20
08	Exemples d'acides hydroxycinnamiques…….	21
09	Structure de quelques classes des flavonoïdes……	23
10	Structure générale des chalcones…….	24
11	Squelette moléculaire des aurones……...	24
12	Structure générale de tanins hydrolysable……...	25
13	Structure chimique des tanins condensés……	25
14	Structure de quelques coumarines (Ex : Aesculétine, Scopolétine, Umbelliférone ,…) et glycosides de coumarines (ex : Aesculine, Scopoline)	26
15	Structure de le resvératrol……	27
16	Classification des quinones ……...	27
17	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie…….	38
18	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules……..	41
19	Réaction des flavonoïdes avec les EOR……...	47
20	Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques	48
21	Méthodologie du travail…….....	52
22	Localisation géographique des monts du Tessala…….	53
23	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant…….	60

24	Principe de fonctionnement de l' HPLC……..	**65**
25	Rendements d'extraction de différentes parties de *Silybum marianum* par macération……...	**67**
26	Rendements d'extraction de différentes parties de *Silybum marianum* par décoction…….	**68**
27	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	**74**
28	Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes……..	**75**
29	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins condensés……	**76**
30	Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale……..	**87**
31	Comparaison de la capacité antioxydante totale des extraits des différentes parties de la plante *Silybum marianum*……	**88**
32	Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH par l'acide ascorbique et par les extraits des feuilles de *Silybum marianum* obtenue par macération et décoction (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais)……	**94**
33	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique et par les extraits des tiges de *Silybum marianum* obtenue par macération et décoction (chaque valeur représente la moyenne de trois essais) ……	**95**
34	Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique et par les extraits des fleurs de *Silybum marianum* obtenue par macération et décoction (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais) …….	**96**
35	Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI_{50}) des extraits testées et du standard (acide ascorbique) par la méthode de piégeage du radical libre ($DPPH^{\bullet}$)……..	**98**
36	Chromatogramme de l'extrait hydro- acétonique de la tige obtenue par macération…….	**121**
37	Chromatogramme de l'extrait hydro- éthanolique /décoction de tige…….	**122**
38	Le profil chromatographique de l'extrait hydro-éthanolique de feuille obtenue par décoction……...	**124**
39	Chromatogramme de l'extrait hydro-acétonique de la feuille obtenue par macération……...	**125**
40	Chromatogramme de l'extrait hydro-méthanolique de fleur obtenue par macération…….	**126**
41	Chromatogramme obtenu à 280 de l'extrait hydro-méthanolique de fleur obtenue par décoction……	**127**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%	**:**	Pourcentage
$^{\bullet}O_2$	**:**	Oxygène singulet
$^{\bullet}OH$	**:**	Radical hydroxyle
°C	**:**	Degré Celsius
Ac	**:**	Acétone
ADN	**:**	Acide désoxyribonucléique
Aq	**:**	Eau
ARN	**:**	Acide ribonucléique
CAT	**:**	Capacité antioxydante totale
CMB	**:**	Concentration minimale bactéricide
CMI	**:**	Concentration minimale inhibitrice
D	**:**	Décoction
DMSO	**:**	Diméthyle sulfoxyde
DO	**:**	Densité optique
DPPH	**:**	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
EAA	**:**	Équivalents d'acide ascorbique
EAG	**:**	Équivalent d'acide gallique
EAT	**:**	Équivalent d'acide tannique
EC	**:**	Équivalent catéchine
EOA	**:**	Espèces oxygénées activées
ERO	**:**	Espèces réactives de l'oxygène
ETOH	**:**	Ethanol
Fe	**:**	Feuille
Fr	**:**	Fleur
g	**:**	gramme
IC_{50}	**:**	Concentration inhibitrice à 50%
M	**:**	Macération
MeOH	**:**	Méthanol

min	**:**	Minute
ml	**:**	Millilitre.
mg	**:**	Milligramme.
mm	**:**	Millimètre
Mo	**:**	Molybdène
MS	**:**	Matière sèche
NADP	**:**	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	**:**	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (sous sa forme réduite)
NCCLS	**:**	National Committee on Clinical Laboratory Standards
nm	**:**	Nanomètre
$NO^{\bullet}$	**:**	Monoxyde d'azote
O_2	**:**	Anion superoxyde
OH	**:**	Groupe hydroxyle
ONOOH	**:**	Nitroperoxyde
OMS	**:**	Organisation mondiale de santé
pH	**:**	Potentiel hydrogène
PI	**:**	Pourcentage d'inhibition.
RMN	**:**	Résonance magnétique nucléaire
RP-CLHP	**:**	Chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inversée
R^2	**:**	Coefficient de corrélation
R_t	**:**	Temps de rétention
T	**:**	Tige
UFC /ml	**:**	Unité formant colonie par millilitre
UV-VIS	**:**	Ultraviolet-visible.

Introduction générale

À travers les siècles, l'homme a pu développer l'utilisation des plantes comme source essentielle de médicaments. Aujourd'hui, des principes actifs de ces plantes entrent dans la composition d'une grande partie de médicaments et produits de soins, grâce à leur richesse en métabolites secondaires potentiels **(Proestos et *al.*, 2006 ; Chaouch, 2014).**

En effet, plusieurs travaux scientifiques sont menés sur les plantes médicinales pour la recherche et la valorisation de nouvelles molécules. Ces dernières représentent les principaux groupes dotés d'une puissante activité antioxydante ou piégeurs de radicaux libres ou d'autres activités biologiques **(Bettaieb et *al.,* 2016).**

Les composés phénoliques sont présents chez tous les végétaux supérieurs. Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure **(Ramawat et *al.,* 2008).**

Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques. Ils sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative très inégale selon les espèces considérées mais aussi selon les organes, les tissus et les stades physiologiques **(Macheix ,1996 ; Karmakar et *al.,* 2011).** De plus, ils ont des propriétés physico-chimiques très différentes influençant l'extraction des polyphénols **(Michel, 2011).**

La technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des principes actifs de ces métabolites existant dans le matériel végétal, et dans leur identification **(Quy Diem et *al*., 2014**). Classiquement, les composés phénoliques sont extraits par macération ou extraction à reflux avec un mélange hydro-alcoolique **(Azmir et *al.,* 2013).**

De nombreuses recherches ont porté sur l'étude de l'effet de paramètres expérimentaux, comme le mode d'extraction et le type du solvant, ainsi que sur la variation quantitative des composés phénoliques des extraits des plantes, et leur pouvoir antioxydant. L'extraction de ces composés à partir des différents échantillons de végétaux est fortement influencée, d'une part par la nature et la concentration des solvants d'extraction et de pénétration dans la matière végétale, et d'autre part la capacité de l'échantillon végétal à se solubiliser dans les solvants **(Sulaiman et *al*., 2011 ; Mahmoudi et *al*., 2013**). À cet effet, il est très difficile de choisir un solvant approprié pour l'extraction des polyphénols à partir de tous les échantillons végétaux.

Par sa situation géographique, l'Algérie offre une végétation riche en plantes aromatiques qui poussent spontanément. En conséquence, nous nous sommes intéressés à la valorisation

de la plante sauvage *Silybum marianum* tout d'abord *pour* l'obtention et la caractérisation d'une enzyme coagulant le lait **(Benchaachoua, 2010)** ; puis à l'étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des différentes parties de *Silybum marianum.* C'est une plante annuelle à bisannuelle appartenant à la famille des astéracées ou composées. Elle est utilisée depuis plus de deux mille ans en médecine traditionnelle européenne **(Morazzoni, 1995).**

Selon **Belouahem (2009)**, le chardon Marie est particulièrement répandu dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'Atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides. Cette plante présente un intérêt médicinal et pharmaceutique important grâce à sa richesse en substances bioactives. Les propriétés sont dues à la présence de la silymarine avec une concentration d'environ 70 - 80%, responsable de la plupart des effets thérapeutiques de la plante **(Svobodova et *al*., 2006).** Le chardon Marie détient une valeur biologique et médicinale importante, mais reste peu étudié en Algérie.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à déterminer les meilleurs solvants et techniques d'extraction des composés phénoliques dans les feuilles, tiges et fleurs de *Silybum marianum* et à évaluer l'influence de ces paramètres sur l'activité antioxydante afin d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels.

Cette étude comporte deux parties :

La première aborde une étude bibliographique qui traite des notions sur la présentation bibliographique de la plante étudiée ; sur l'intérêt des composés phénoliques et sur les oxydants et les antioxydants.

La deuxième, envisage le travail expérimental qui comporte deux axes :

- ✓ Dans le premier, nous avons réalisé une étude qualitative et quantitative par l'extraction et la détermination des teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins) dans laquelle nous nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits des différentes parties de la plante suivi d'une analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inversée (RP-CLHP)
- ✓ Dans le deuxième, nous discutons les résultats obtenus. Enfin, nous clôturons notre étude par une conclusion générale suivie d'éventuelles perspectives.

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le Silybum marianum

Les plantes fabriquent une grande diversité de métabolites secondaires dont la plupart des molécules nécessaires à leur défense **(Suty, 2015).** Les métabolites secondaires contrairement aux métabolites primaires, ne participent pas directement à l'assimilation des nutriments, ni à leur transformation et sont chimiquement différents des métabolites primaires.

Malgré leur faible poids moléculaire, pour certains, leur structure peut- être d'une très grande complexité. Leur fonction essentielle est de défendre et de protéger la plante contre toutes sortes d'agents pathogènes, de parasites phytophages ou de prédateurs. Ils sont aussi synthétisés en réaction au facteur abiotique tel que la sécheresse ou l'effet des rayons ultraviolets et autres.

Les composés phénoliques sont présents chez tous les végétaux supérieurs. Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative très inégale selon les espèces considérées mais aussi selon les organes, les tissus et les stades physiologiques **(Tsao et *al*., 1995 ; Macheix, 1996).**

I.1.Famille des Astéracées

La famille des Astéracées (Composées) est une famille appartenant aux Dicotylédones, regroupe 24000-30000 espèces de plantes réparties de 1600 à 1700 genres **(Chaouch, 2014)** C'est une famille répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées. Dans le secteur phytogéographique oranais, on trouve cette famille avec 38 genres et 67 espèces **(KaziTani et *al*., 2010).** On y trouve surtout des plantes herbacées même s'il existe des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille **(Guinard & Dupont, 2007**).

Les Asteraceae ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies, groupées en capitules denses, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales (**Raven et *al*., 2014)**.

I.2. Présentation du Chardon Marie (*Silybum marianum*)

Le chardon-Marie (*Silybum marianum*) est une plante annuelle à bisannuelle appartenant à la famille des Astéracées ou composées **(Vincent, 2000),** utilisée depuis plus de deux mille ans en médecine traditionnelle Européenne **(Morazzoni et *al.*, 1993 ; Roux, 2005).**

Si le terme *Silybum* désigne en Grec et en latin un chardon comestible **(Fournier, 1947**), le qualificatif *marianum* proviendrait d'une légende selon laquelle les taches laiteuses marquant les feuilles proviennent du lait tombé du sein de Marie lorsqu'elle allaita Jésus, cachée sous

un bosquet de chardons pour échapper aux persécutions d'Hérode **(Edzard & Pittler, 2005 et Charrié et *al*., 2017).**

Le chardon Marie est une plante médicinale très ancienne, cité dans la Bible par Pline et par Dioscoride dans son Materia medica comme une plante médicinale du genre chardon. Le terme « Silybum » est dérive du grec silybon ou silybos qui veut dire « houppe » **(Rodzko, 2000).** Le terme *marianum* se réfère à La Vierge Marie **(Morazzoni &Bombardelli, 1995).**

I.3. Historique du chardon Marie

Les Grecs de l'antiquité utilisaient déjà le chardon-Marie pour traiter les troubles hépatiques et biliaires. **Pline** l'ancien recommandait de prendre le jus de la plante mélangé à du miel pour « éliminer les excès de bile ». Au moyen Âge, on disait que la plante pouvait combattre la bile noire ou la mélancolie. Au XIXe siècle, les médecins américains l'ont employé pour soigner les affections liées, aux troubles menstruels, aux varices, au foie, à la vésicule biliaire et aux reins. Aujourd'hui, le chardon-Marie est employé dans plusieurs préparations pharmaceutiques destinées au traitement de divers troubles hépatiques et biliaires.

En médecine classique, elle est utilisée pour la prévention et le traitement de divers troubles hépatiques : hépatite, cirrhose, calculs biliaires, ictère (jaunisse) et dommages causés au foie par des substances toxiques.

La Commission Européenne a approuvé, en 1989, l'usage de l'extrait normalisé à 70-80% de silymarine pour traiter les intoxications hépatiques et comme adjuvant en cas d'hépatite et de cirrhose du foie. En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé reconnaissait sensiblement les mêmes usages.

I.4. Noms vernaculaires

Les différentes appellations de la plante en français, arabe, berbère, anglais et allemands sont les suivants :

- **Noms vernaculaires en français :** Chardon-Marie, artichaut sauvage, chardon argenté, chardon notre-dame, chardon marbré, épine blanche, lait de notre-dame, silybe de Marie **(Fournier, 1947; Echelberger, 1987).**
- **Noms vernaculaires en arabe :** Chouk el djemel, Bou-zeroual, Ousûk ez-zerwal, Chouq boutli, Hacoub et Lichilich, Qortom, Harshaf barri, Shouk el-nasara.

- **Noms vernaculaires en targui ou berbère** : Tawra, Douj-n'ilour man **(Beloued, 2009).**

- **Noms vernaculaires en anglais**: Milk thistle, Holy thistle, Lady's thistle, Marian thistle, st Mary thistle, Silybum. Blessed milk thistle, Mediterranean milk thistle, Variegated thistle (**Hammouda et *al*., 2005; Dubé, 2010).**

- **Noms vernaculaires allemands** : Mariendistel **(Fournier, 1947 ; Beloued, 1998).**

I.5.Position Systématique

La systématique du chardon Marie selon Deysson **(1967), Guignard et *al*., (1996), Spichiger et *al*., (2004) ; Winston et *al*., (2008**) est comme suit :

Embranchement :	Phanérogames
Sous - embranchement :	Angiospermes
Classe :	Magnoliopsida
Ordre :	Astrales
Famille :	Asteraceae (Composées)
Sous-famille :	Tubuliflores
Genre :	*Silybum*
Espèces :	*Silybum marianum* (L). Gaerthn

I.6. Habitat et Origine

Originaire du bassin méditerranéen **(Bezanger et *al*., 1980),** le Chardon-Marie affectionne les terrains secs et ensoleillés (terres incultes, bords des chemins) jusqu'à 700 m d'altitude (**Bradly ,2006**). La plante a gagné toute l'Europe occidentale et centrale, l'Afrique du Nord, le Moyen- Orient et s'est naturalisée en Amérique du Nord (**Morazzoni et *al.*, 1995 ; Charrié et *al*., 2017).**

En Algérie, d'après **Quezel & Santa (1963), Belouahem (2009**), le chardon Marie est particulièrement répandu dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'Atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides.

Le chardon -Marie est aujourd'hui répandu en tous lieux, en Amérique du Nord, si bien qu'on le trouve tant au Canada qu'au Mexique, Nouvelle-Zélande, Australie, Afrique du Sud, Chili et Argentine (**Darbyshire, 2003 ; Winston et *al*., 2008).**

I.7.Description morphologique

- **Racines**

D'après **Sindel (1991),** la plante est caractérisée par une racine pivotante, forte, longue, épaisse et fibreuse (Figure 01).

- **Tiges**

Généralement ramifiés, atteignant environ 20 à 150 cm de haut **(Couplan, 2007)**, dressées, très souvent rameuses vers le haut **(Bezanger et *al*., 1980)**, portent peu de feuilles sur la partie supérieure **(Ditomaso, 2007).**

- **Feuilles**

Selon **Bayer et *al*., (1990)**, le chardon Marie est caractérisé par ses grandes feuilles vertes pâles brillantes, tachées de blanc lobées et ondulées, et bordées de dents épineuses à pointe jaune très acérée **(Quezel et *al*., 1963).** Les feuilles de la base sont pétiolées, découpées en lobes à bords dentés épineux, en rosettes **(Sindel, 1997).** Les feuilles supérieures sont plus petites et plus étroites réduites et embarrassantes, à bord moins découpé, mais très épineux, avec des marbrures laiteuses caractéristiques **(Morazzoni et *al*. ,1995).**

- **Fleurs**

Les fleurs sont toutes tubuleuses réunies en capitules terminaux, solitaires, dépassant souvent 6 cm de diamètre, la plupart sont pourvues d'une épine atteignant jusqu'à 5 cm. La corolle est dentée, de couleur pourpre, 5 étamines forment un tube autour du style **(Ditomaso, 2007).** Elles fleurissent depuis le mois de juin jusqu'au mois d'août.

- **Fruits**

Les akènes, souvent improprement désignées par le terme de « graines », de couleur gris pâle à brun, stries de bandes longitudinales foncées, de 6 à 7 mm, plats, lisses, et brillants, surmontés d'une aigrette blanche (**Sindel, 1997 ; Bruneton, 2016).**

(A) Morphologie de la fleur
(http://www.florealpes.com)

(B) Morphologie de la feuille
(http://www.alsagarden.com)

(C) Morphologie de la tige
(www.discoverlife.org)

(D) Morphologie de la racine
(Alaoui, 2016)

(E) Morphologie des graines
(http://www.inspection.gc.ca)

(F) Akènes de chardon marie avec leurs aigrettes
(https://www.avogel.ch)

Figure 01 : Morphologie des différentes parties de *Silybum marianum* (Chardon Marie).

I.8. Constituants chimiques de *Silybum marianum*

I.8.1. Principaux composants du fruit

L'akène du chardon Marie contient entre 1,5 à 3 % de silymarine, un mélange de différents flavanolignanes, isolé en 1968. Les principaux composants sont la silybine, la silychristine, la silydianine et l'isosilybine (Figure 02). Ce sont les molécules les plus actives du chardon

Marie et les principaux composés responsables de l'action thérapeutique de la plante **(Dube, 2010).**

Il contient aussi des flavonoïdes : quercétol, taxifoline, éryodictyol, chrysoériol, naringine et quelques autres (notamment du dihydrokaempférol, du kaempférol, de l'apigénol et du naringétol…) qui présentent eux aussi des propriétés intéressantes) **(Ramawat & Merillon, 2008).**

Le fruit renferme des lipides (20 à 30 %) concentrés en acides gras insaturés : acide linoléique (60 %), oléique (30 %) et palmitique (9 %). Ainsi que du tocophérol (0.038 % environ), les stérols (cholestérol, stigmastérol, sitostérol…), des protéines qui représentent environ (25 à 30 %), des sucres, et des minéraux **(Ramawat &Merillon,2008 ; Bruneton, 2016 ; Charrié et *al*., 2017).**

I.8.2. Les principaux composants de la partie aérienne

La partie aérienne renferme des flavonoïdes : apigénine, kaempférol, lutéolol et leurs hétérosides. On trouve des stérols dont du campestérol, stigmastérol, sitostérol et des dérivés polyacétyléniques. Divers composés : acide fumarique, céramide, asperglaucide sont aussi présents **(Charrié et *al*., 2017).**

Selon **Amrani (2006),** le chardon Marie présente des teneurs élevées en calcium dans tous les organes du végétal (feuilles, graines, tige et racines).

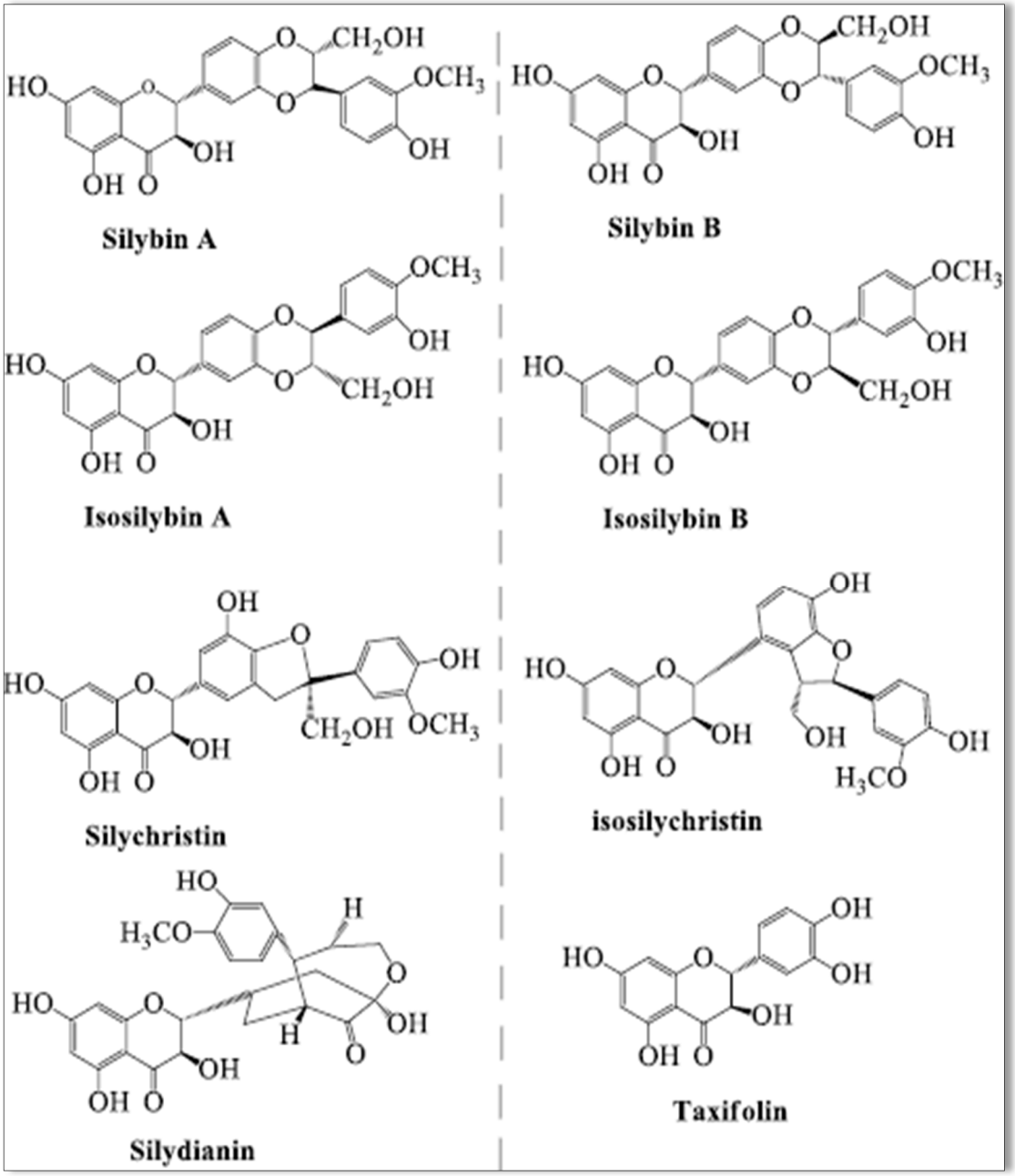


Figure 02 : Les flavanolignanes majeures de la silymarine **(Abouzid et *al*., 2016).**

I.9. Propriétés et activités biologiques de la plante

Le *Silybum marianum* est une plante très riche en substances actives de point de vue médicinal, ses propriétés sont dues à la présence de la silymarine avec une concentration d'environ 70-80% **(Svobodova et *al*., 2006)**, responsable de la plupart des effets thérapeutiques de la plante. Depuis des siècles, la silymarine a été largement utilisée pour ses effets hépato-protecteurs, bien que d'autres effets bénéfiques sur la santé soient reconnus depuis quelques années (Tableau 01), entre autres :

- ✓ La silybine neutralise efficacement différents radicaux libres incluant les radicaux hydroxyles et peroxyle ainsi que l'ion hypochlorite **(Mira et *al*., 1994).**
- ✓ La silymarine, inhibitrice de la peroxydation des lipides membranaires et antiradicalaires, inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires. Elle aurait un effet stabilisateur de membrane, en présence de dommages induits par des xénobiotiques (dans le cas de la toxine des amanites, interagirait de façon compétitive avec les sites impliqués dans la capture de cette toxine). Par ailleurs, elle stimule l'ARN-polymérase : la stimulation de la synthèse protéique augmenterait la capacité de régénération du tissu hépatique **(Baud et *al*., 2013, Bruneton,2016).**
- ✓ La silymarine neutralise les radicaux libres qui peuvent endommager les cellules exposées aux toxines. Elle a une activité antioxydante dix fois supérieure à celle de la vitamine E. Elle contribue au maintien du pool glutathion responsable de la détoxification hépatique (enzymes de phase 2), réduit l'augmentation des transaminases et des phosphatases alcalines, **(Asghar & Masood, 2008), et** protège vis-à-vis du stress oxydatif **(Haddad, 2008).**
- ✓ La silymarine a la capacité de bloquer la fibrose, un processus qui contribue au développement de la cirrhose chez des personnes ayant une inflammation du foie consécutive à une maladie, à un abus d'alcool ou à une hépatite **(Heratchian, 2007 ; Conan, 2016).**
- ✓ Des données accumulées depuis une dizaine d'années montrent que la silymarine inhibe, *in vitro*, la prolifération de diverses lignées de cellules tumorales, c'est un protecteur à l'encontre d'agents cancérogènes **(Bruneton,2016).** Elle diminue la toxicité rénale, à un effet hypoglycémiant **(Krzesinski& Scheen, 2015).**
- ✓ Enfin, *Silybum marianum* : est une plante médicinale qui possède de nombreuses vertus antiémétiques, antispasmodique qui apaisent les crampes digestives. On lui reconnaît par ailleurs une fonction veinoprotectrice et hypotensive. La plante est de plus galactogène et antidépressive **(Mouzali, 2016).**

Quelques activités biologiques de *Silybum marianum* en fonction des composés actifs sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Activités biologiques en fonction des composés actifs de *Silybum marianum* **(Alaoui, 2016).**

Composés actifs du Chardon Marie	Activités Biologiques
Flavonoïdes	-Diurétique, anti-azotémique, antispasmodique,- anti-ulcère gastrique, anti-inflammatoire.
	-Inhibe l'agrégation plaquettaire in vitro.
Flavonols **Catéchols**	-Propriétés antioxydantes. -Réduit les risques coronariens.
Silymarine	-Traitement des maladies hépatiques. -Neutralise l'hépatotoxicité de la phalloïdine et l'amanitine.
	-Réduit l'accumulation de collagène dans le foie chez les rats. -Effet positif sur le diabète induit par l'alloxane chez les rats.
	-Protection du pancréas exocrine de la toxicité.
Flavanolignanes : Silandrine3deoxysilychristine, Silibinine, Silymonine, Silydianine- Quercétol	-Provoque la peroxydation membranaire. -Responsable de l'activité antioxydante.
Quercétol	-Propriétés de protection cellulaire.

I.10. Propriétés antioxydantes

Tout comme d'autres flavonoïdes, la silymarine contient un grand nombre de constituants actifs incluant les flavonoïdes aux propriétés antioxydantes, empêchant ainsi certains produits toxiques de causer des lésions au foie. Le composé le plus actif biologiquement est la silybine. Plusieurs études ont prouvé son efficacité thérapeutique par rapport aux autres composants de la silymarine **(Foster, 1997). Mira et *al*., (1994)** ont montré *in vitro que* la silybine neutralise efficacement différents radicaux libres incluant les radicaux hydroxyles et peroxyle ainsi que l'ion hypochlorite. Ils ont aussi montré une inhibition de la peroxydation des lipides membranaires.

L'effet antioxydant de la silybine a été observé chez des rats ayant une intoxication aiguée provoquée par de l'éthanol ou du paracétamol. Ces deux composants induisent une peroxydation qui a pour conséquence une déplétion marquée du glutathion dans le foie. Un

traitement par la silymarine ou la silybine protège les animaux du stress oxydatif produit sur le foie par l'éthanol ou le paracétamol **(Valenzuela *et al.,* 1985).** Par ailleurs les différentes molécules constituantes du chardon-Marie semblent avoir des rôles variables selon la molécule utilisée pour provoquer expérimentalement la peroxydation membranaire : les flavanolignanes, principalement la silandrine, la 3-deoxysilychristine, la silibinine, la silymonine, la silydianine et le quercétol semblent dans tous les cas être les principaux responsables de cette activité antioxydante **(Hikino et *al.,* 1984).**

Une autre étude de **Miguez et *al*., (1994)** a montré que les effets antitoxiques de la silymarine ou de la silibinine étaient attribuer à leurs propriétés antioxydantes et à leur capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène pour la détoxification des xénobiotiques.

De plus, la silybine protège les globules rouges et stabilise leurs membranes en inhibant la peroxydation des lipides. La silymarine et la silybine semblent, en outre, exercer leur activité antioxydante non seulement en neutralisant les radicaux libres mais également en influant sur les systèmes enzymatiques associés au glutathion. En outre, elle augmente le niveau de superoxyde dismutase ainsi que celle du glutathion peroxydase dans les globules rouges et les lymphocytes. La superoxyde dismutase rend également les radicaux libres inoffensifs **(Altorjay et *al*., 1992).**

Des études in vitro, montrent que la propriété intéressante de la silybine et de la silymarine est qu'elles interviennent dans la régulation du contenu en glutathion de différents organes. Il a ainsi été montré que la silymarine peut augmenter les niveaux de glutathion de 35% dans le foie de rats. Cette augmentation se produit de façon sélective dans le foie, l'intestin et l'estomac **(Valenzuela et *al*., 1989).**

Enfin, la silybine protège les tissus des lésions induites par le fer. Une surcharge en fer est dangereuse car le fer catalyse différents radicaux libres avec, pour conséquence, une peroxydation des lipides membranaires. Le foie est le premier site où le fer exerce ses activités destructrices. Les activités antioxydantes de la silybine aident à protéger de la toxicité du fer. De plus, de multiples travaux expérimentaux tendant à démontrer que la silybine agit comme un chélateur du fer, se liant au fer libre et facilitant ainsi son élimination par la bile **(Pietrangelo et *al*., 1995).**

Un résumé du mécanisme d'action de la silymarine est présenté dans la figure suivante :

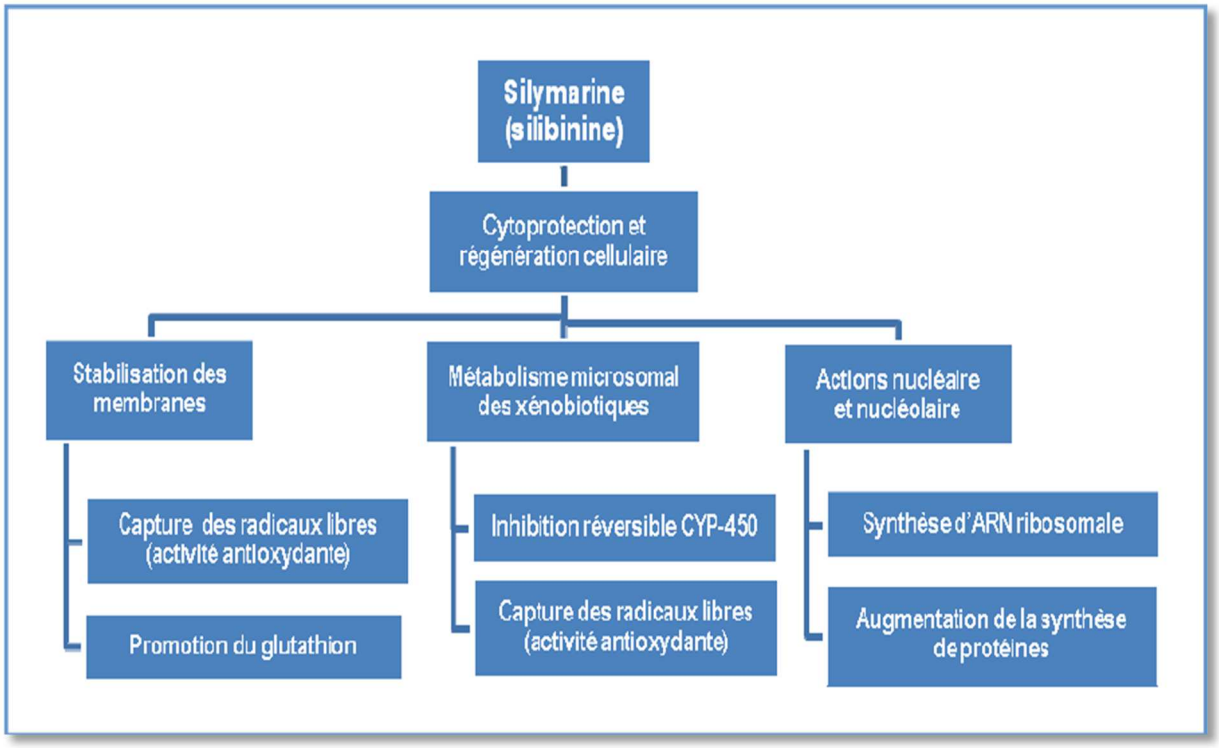


Figure 03 : Mécanisme d'action de la silymarine **(Valenzuela et *al*., 1994).**

I.11.Toxicité, effet indésirable

Il ressort des études de suivi et de l'ensemble des essais qui analysent la fréquence et la nature des effets indésirables par les groupes silymarine, que l'utilisation de la silymarine ne présente pas de risque particulier. On peut occasionnellement noter des troubles gastro-intestinaux légers (effet laxatif) et quelques cas d'allergie ont été rapportés **(Bruneton, 2009).**

Chapitre II : les composés phénoliques

Sous la désignation de composés phénoliques on désigne un vaste ensemble de substances qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles **(Macheix, 1996).**

Les composés phénoliques (ou polyphénols) représentent un groupe de métabolites secondaires affichant une grande diversité de structures, très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure, ils peuvent aller des molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins **(Macheix, 1996 ; Regnault et *al.*, 2008).**

II.1. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'élaboration de cycles aromatiques :

II.1.1. La voie shikimate

La voie du shikimate est une voie métabolique d'importance pour un organisme végétal, puisqu'on estime que 20 à 35 % des substances carbonées biosynthétisées en proviennent **(Regnault-Roger, 2014).** C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques. Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont respectivement produits par les hydrates de carbone lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse, sont convertis en chorismate, précurseur commun d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine (Figure 4)**.** Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques (C6-C1) formant les tanins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés **(Hoffmann, 2003).**

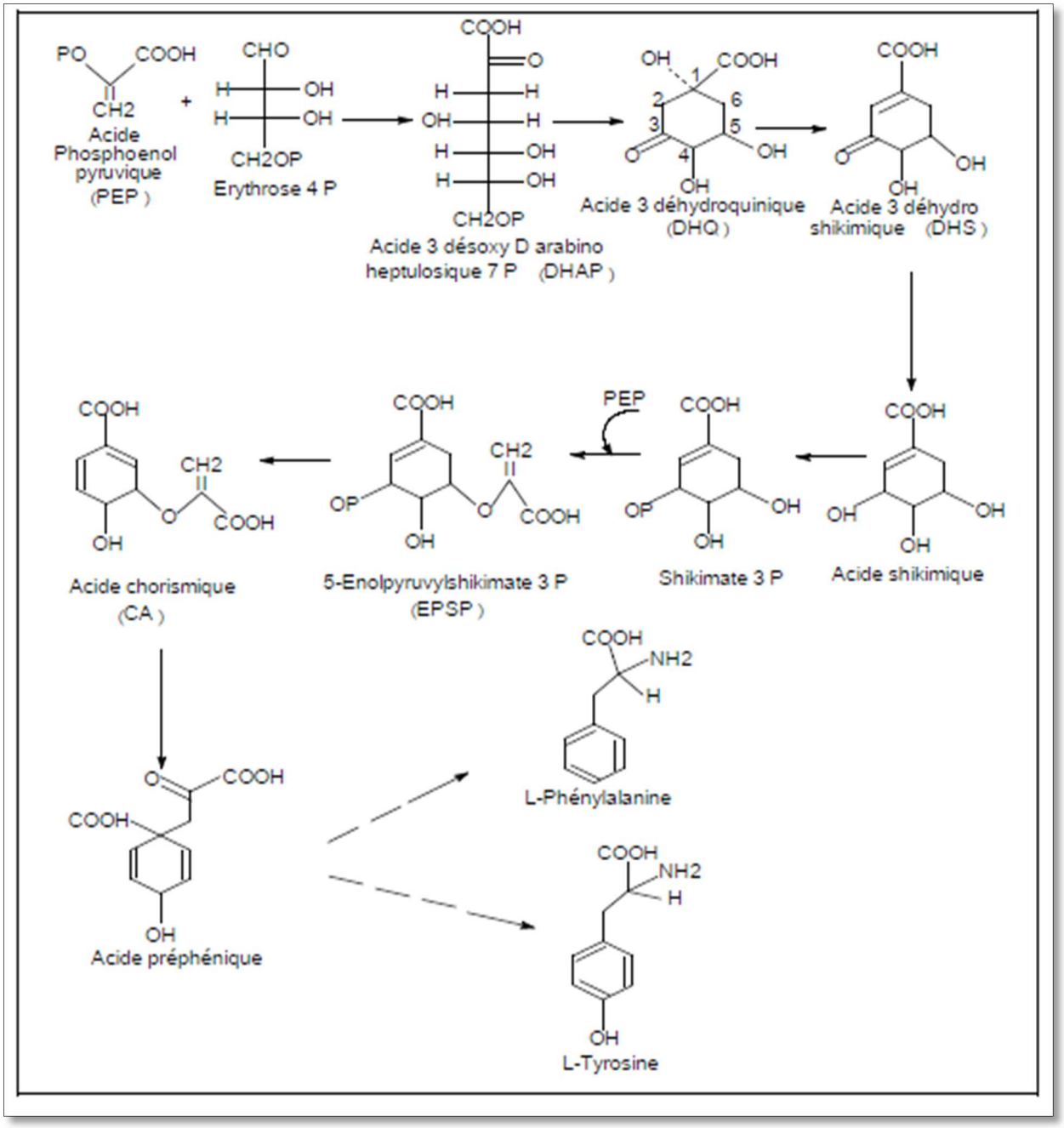


Figure 4 : La voie de shikimate **(Floss, 1997).**

II.1.2. La voie de phénylpropanoide

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est un métabolisme secondaire, spécifique du règne végétal. Il conduit, à partir de la phénylalanine (Phe), à la synthèse d'une multitude de composés dont la nature peut varier suivant les espèces végétales.

L'ensemble des composés phénylpropanoïdes dérive de l'acide *t*-cinnamique, le premier phénylpropane formé à partir de la phénylalanine grâce à l'action de la phénylalanine

Ammoniac Lyase (PAL). Les dérivés phénylpropanes possèdent tous le même squelette carboné issu de la phénylalanine : un noyau aromatique et une chaîne latérale de trois carbones (C6-C3) (figure 5). Ces composés incluent les acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique **(Hoffmann et *al.*, 2004 ; Bruneton, 2009).**

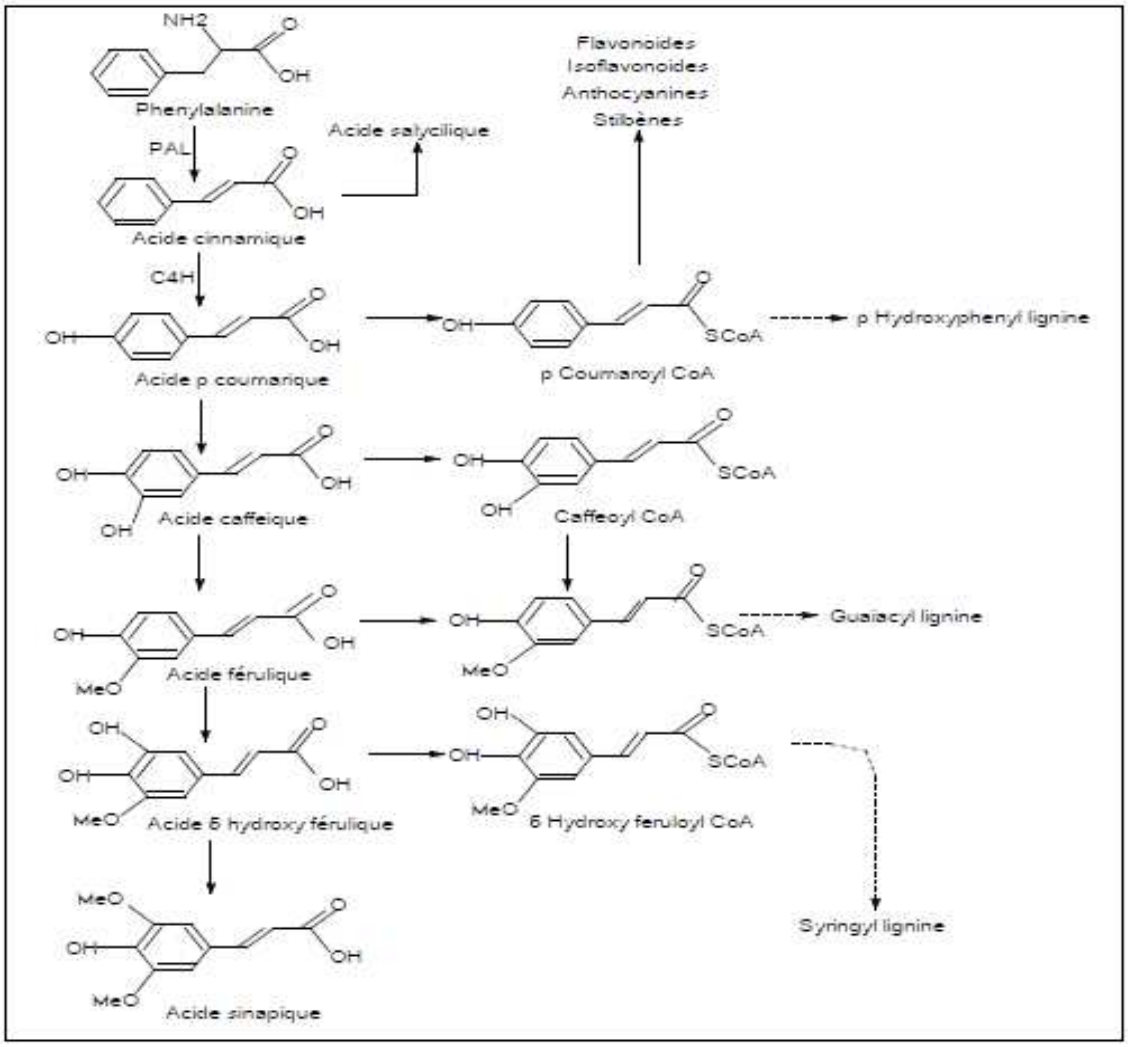


Figure 5 : La voie de phénylpropanoide **(Hoffmann et *al.*, 2004).**

II.1.3. La voie acétate/ malonate

Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulaire **(Macheix et *al.*, 2005 ; Bruneton, 2009).**

La glycolyse ainsi que la β-oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl -CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaines polycétoniques,

obtenues par condensation répétée d'unités ≪ acétate ≫ qui se fait par carboxylation de l'acétyl- CoA **(Knaggs, 2003).**

II.2. Classification des polyphénols

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures qui diffèrent par le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthoxyles sur le squelette de base (Figure 6)**.** Elles peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées) **(Cheynier et *al*., 1998).**

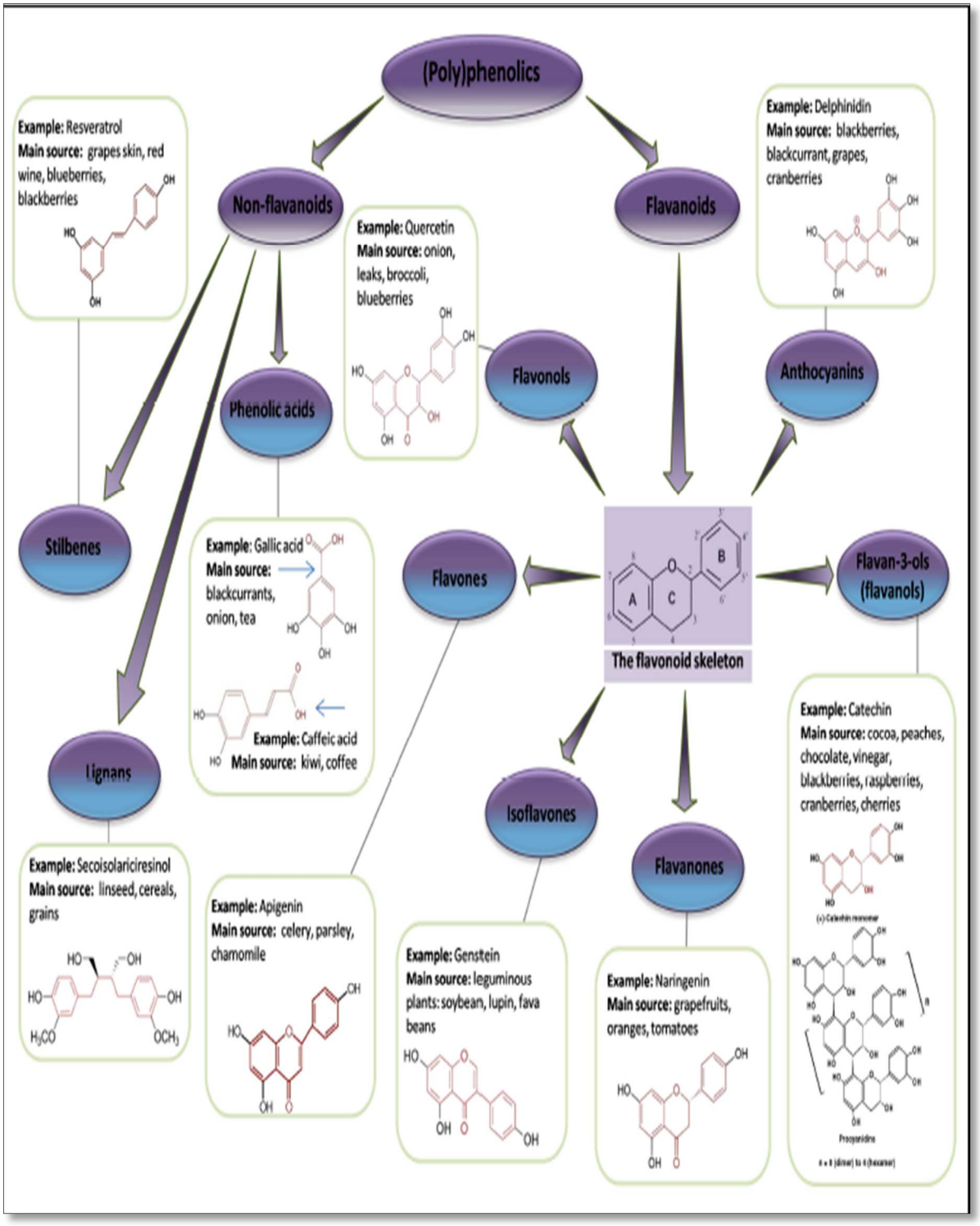


Figure 6 : Classification et structure des principales classes de polyphénols **(Katarzyna et *al.*,2015).**

Ces composés peuvent être classifiés différemment. **Harborne & Simmonds (1964)** ont classifié ces composés dans des groupes basés sur le nombre de carbones dans la molécule (Tableau 02).

Tableau 2 : Principales classes de composés phénoliques **(Harborne & Simmonds, 1964).**

Structure	Classes
C_6	Phénols simples
C_6-C_1	Acide phénoliques et dérivés
C_6-C_2	Acide phényl acétique et acétophénones
C_6-C_3	Acide cinnamiques, cinnamique aldéhyde
C_6-C_3	Coumarines, isocoumarines et chromones
C_{15}	Chalcones, aurones, dihydrochalcone, flavonoïdes
C_{15}	Anthocyanines
C_{30}	Biflavonyles
C_6-C_1-C_6, C_6-C_2-C_6	Benzophénones, xanthones, stilbènes
C_6, C_{10}, C_{14}	Quinones
C_{18}	Bétacyanines
Lignanes	Dimères ou oligomères
Lignines	Polymères
Tanins	Oligomères ou polymères
Phlobaphenes	Polymères

II.2.1. Phénols simples et les acides phénoliques

II.2.1.1 Phénols simples

Les phénols (C_6) sont des molécules aromatiques, des dérives du benzène, dans lesquels le groupe hydroxyle OH est fixé sur un carbone d'un cycle benzénique. Ils sont rares dans la nature en site le catéchol, le phloroglucinol, orcinol et pyrogallol **(Harbone, 1998).**

II. 2.1.2. Les acides phénoliques simples

On distingue deux principales classes**,** les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (**Macheix et *al.,* 2005).**

II.2.1.2.1. Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques se présentent majoritairement sous forme libre**,** ce sont des dérivés de l'acide benzoïque (C_6-C_1) (figure 07), existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides ; ex : acide benzoïque, acide gallique, acide vanillique**… (Collin & Crouzet, 2011).**

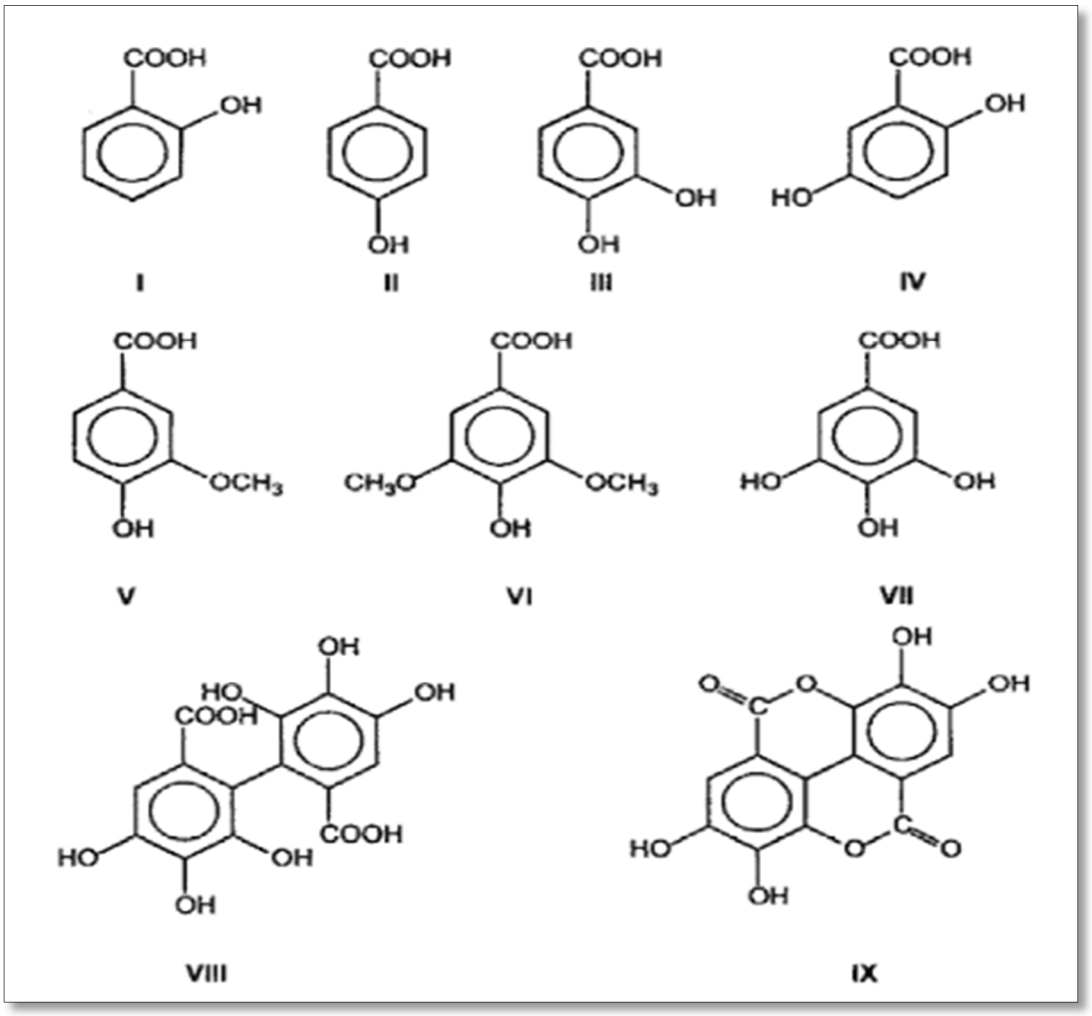


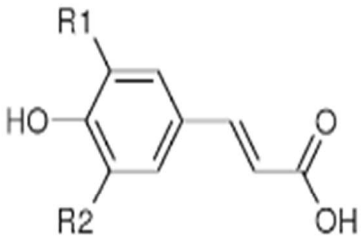
Figure 7 : Exemples d'acides hydroxybenzoïques **(Collin &Crouzet, 2011).**

I : acide salicylique ; II : acide 4-hydroxybenzoïque ; III : acide protocatéchique ; IV : acide gentisique ; V : acide vanillique ; VI : acide syringique ; VII : acide gallique ; VIII : acide hexahydroxydiphénique ; IX : acide ellagiques.

II.2.1.2.2. Acides hydroxycinnamiques

La figure 08 illustre la structure des principaux acides hydroxycinnamiques (C_6-C_3) présents dans les plantes. Les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous une forme estérifiée

par l'acide quinique, souvent sous forme combinée avec des molécules organiques ; ex : Acide caféique, acide coumarique et acide cinnamique **(Collin &Crouzet, 2011).**



Acides hydroxycinnamiques	R_1	R_2
Acide p-coumarique	H	H
Acide caféique	OH	H
Acide 3,4,5 trihydroxycinnamique	OH	OH
Acide férulique	OCH_3	H
Acide sinapique	OCH_3	OCH_3

Figure 8 : Exemples d'acides hydroxycinnamiques **(Collin &Crouzet, 2011).**

II.2.2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble de nombreux composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, la classe la plus importante des métabolites secondaires des plantes **(Bourre, 2003 ; Bruneton, 2009),** et sont distribuées dans toute la plante, localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles **(Marfak et *al.*, 2003).**

Les flavonoïdes sont facilement extractibles, presque toujours hydrosolubles et, ont constitué une source de colorants dès l'antiquité, ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Par conséquent, dès que la chimie organique moderne a commencé à se développer, les flavonoïdes ont été très largement étudiés et leur chimie est bien connue **(Évrard, 2003 ; Bruneton, 2009)**.

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, de ce fait, ils possèdent le même élément structural de base, ce sont des dérivés du phénylpropane avec une composition de base (C_6- C_3- C_6), ayant tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C_6 (A et B) relié par une chaîne en C_3 **(Bruneton, 1999).** Ces cycles benzoïques présentent plusieurs groupements hydroxyles et sont pour cette raison également nommée polyphénols, ils sont responsables de la fonction antioxydante des polyphénols **(Descheemaecker et *al.*, 1999, Évrard et *al.*, 2003).**

Plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées. Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (figure

10). Ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : flavones, flavonols, flavanones, dihydroflavonols, isoflavones, isoflavon, flavanes, flavanols et anthocyanines **(Bruneton, 1999 ; Marfak, 2003 ; Skergetet *al*., 2005).**

Les principaux groupes peuvent être définis et différencié comme suit :

II.2.2.1. Flavones et Flavonols

- Si la liaison C_2-C_3 dans le squelette de la flavanone est insaturée, le compose est nommé flavone dérivé de 2-phénylchromen-4-one.
- Si le squelette est substitué en position C_3 par un groupement hydroxyle et une fonction C=O en C_2-C_3, il est désigné par le nom flavonol dérivé de 3-hydrox-2-phenylchromone-4-one (figure 9).

II.2.2.2. Flavanones et hydroflavonols

Se caractérisent par la présence des centres d'asymétrie et l'absence de la double liaison entre C_2 et C_3.

II.2.2.3. Flavanols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C_3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C_4. Ce sont des dérivés de 2-phényl-3-chromanol **(Bruneton, 1999).**

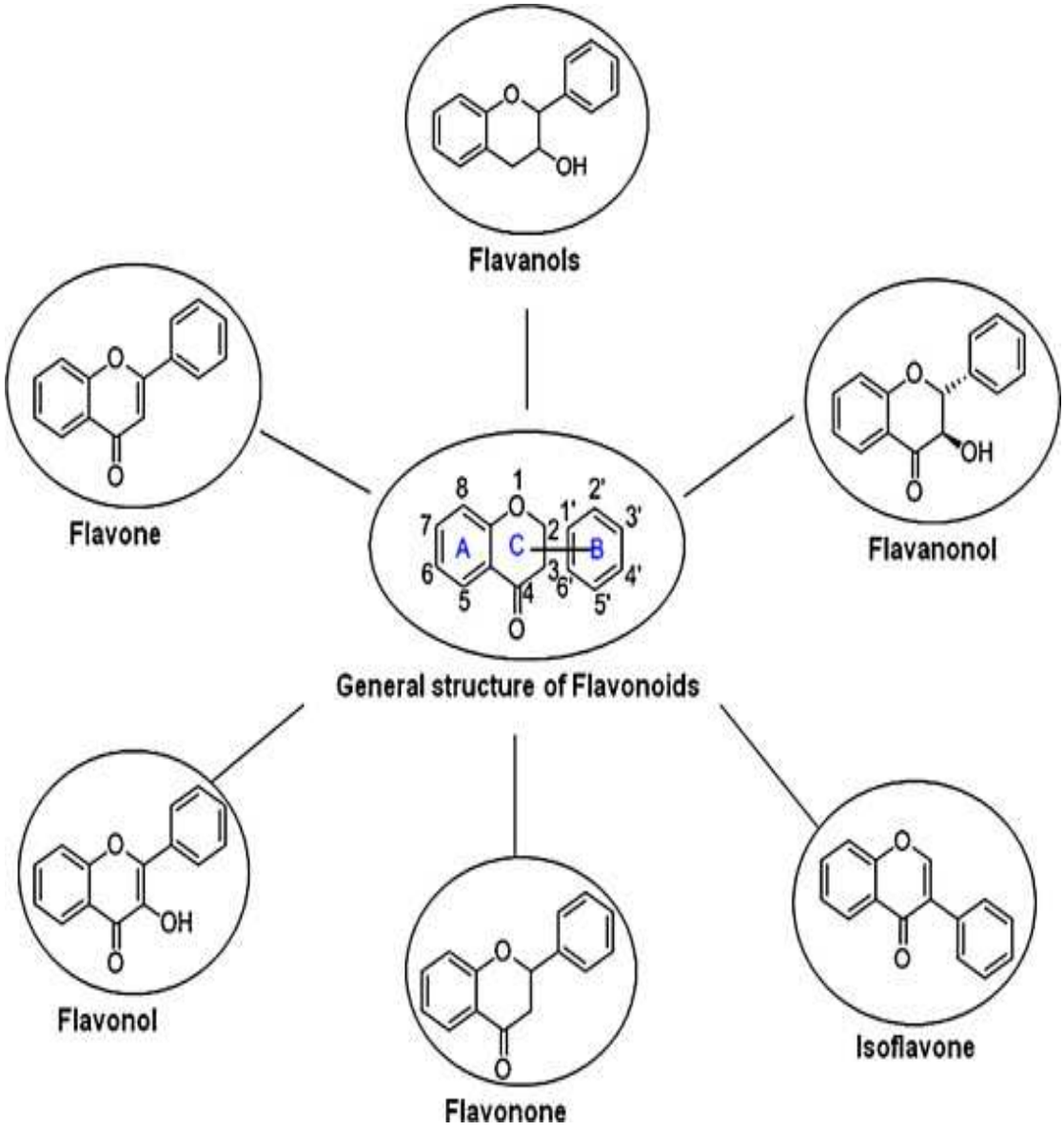


Figure 9 : Structure de quelques classes des flavonoïdes **(Ravi Shankar et *al*., 2013).**

II.2.3. Les chalcones et aurones

II.2.3.1. Les chalcones

Les chalcones, dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence de deux unités aromatiques reliées par une chaine tricarbonée, cétonique et insaturée (figure10). Si les substitutions sur le noyau A sont le plus souvent identiques à celle des autres flavonoïdes, le noyau B est assez fréquemment non substitué **(Bruneton, 2009).**

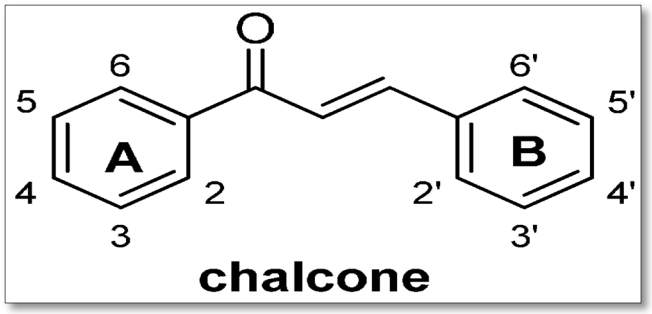


Figure 10 : Structure générale des chalcones **(Xiao-Guang et *al.*, 2014).**

II.2.3.2. Les aurones

Les aurones (2-benzylidènebenzofuran-3 (2H) –ones) sont des composés naturels ou synthétiques appartenant à la famille des flavonoïdes. Les aurones jouent un rôle important dans la pigmentation de certaines fleurs et fruits et contribuent notamment à la couleur jaune vif des fleurs **(Zwergel et *al.*, 2012).**

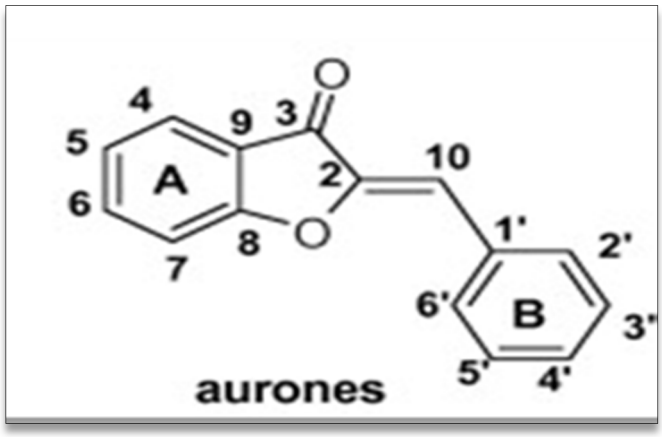


Figure 11 : Squelette moléculaire des aurones **(Detsi et *al.*, 2009).**

II.2.4. Tanins

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, ce sont des composés polyphénoliques en (C_{15}) n, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3 000, ayant la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner avec des macromolécules (protéines, polysaccharides...) **(Gazengelet Orecchioni, 2013)**, qui présentent à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines » **(Bruneton, 2009).**

Ils sont classés en deux groupes distincts :

II.2.4.1. Tanins hydrolysables

Ce sont des polyesters d'oses et d'acides-phénols. Les oses trouvés dans ces tanins sont surtout représentés par le D glucose, ces tanins sont de deux types : les tanins galliques qui sont les esters d'oses (glucose) et d'acides galliques et les tanins ellagiques qui sont des esters d'oses et d'acide ellagiques **(Gazengel & OrecchionI, 2013).**

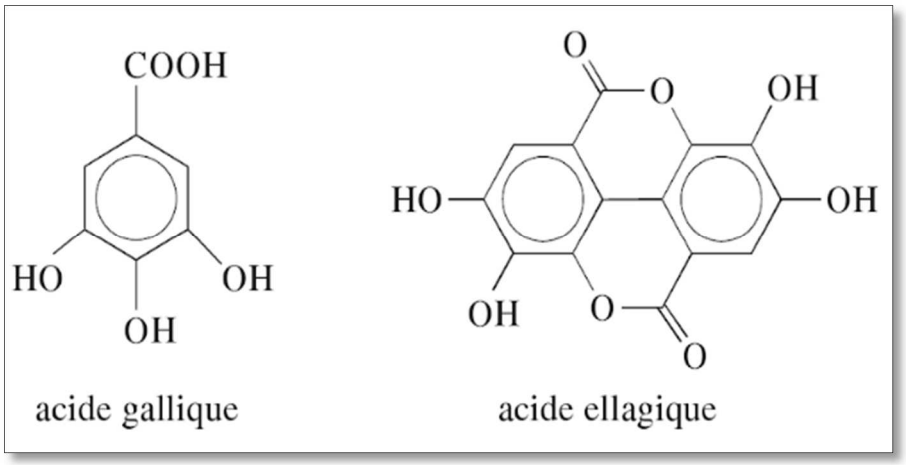


Figure 12 : Structure générale de tanins hydrolysables **(Gazengel & Orecchioni, 2013).**

II.2.4.2. Tanins non hydrolysables ou tanins condensés

De structure plus complexe voisine de celle des flavonoïdes, on les appelle également pro-anthocyanidines. L'élément structurel de base de ces polymères est un flavan- 3-ol **(Bruneton, 2009)**, le plus souvent épicatéchine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités **(Khanbabaee & Ree, 2001).**

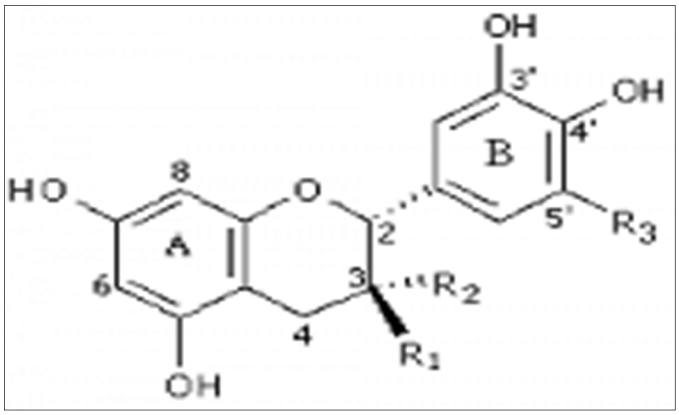


Figure 13 : Structure chimique des tanins condensés **(Guignard, 1996).**

II.2.5. Les coumarines

Présentes dans de nombreux végétaux, les coumarines doivent leur nom de classe à

« Coumarou», le nom vernaculaire de la fève tonka (Dipteryxodorata Willd, Fabaceae), dont la coumarine a été isolé en 1820 **(Bruneton, 1999).**

Ce sont des substances naturelles, organiques et aromatiques, des esters intramoléculaires ; elles sont constituées de neuf atomes de carbone caractérisés par le noyau 2H-1- benzopyrane-2-one **(Gray & Waterman, 1978).** Leur structure de base (C_6-C_3) dérive des acides ortyo-hydrocinnamiques **(Collin & Crouzet, 2011),**

Elles sont substituées en C7 par un hydroxyle et d'après la nature des substituants, sont classées en coumarines simples, furocoumarines et pyranocoumarines **(Bruneton, 2009).** L'ombelliférone, l'esculétine et la scopolétine sont les coumarins les plus répandus dans la nature **(Jain & Joshi, 2012).**

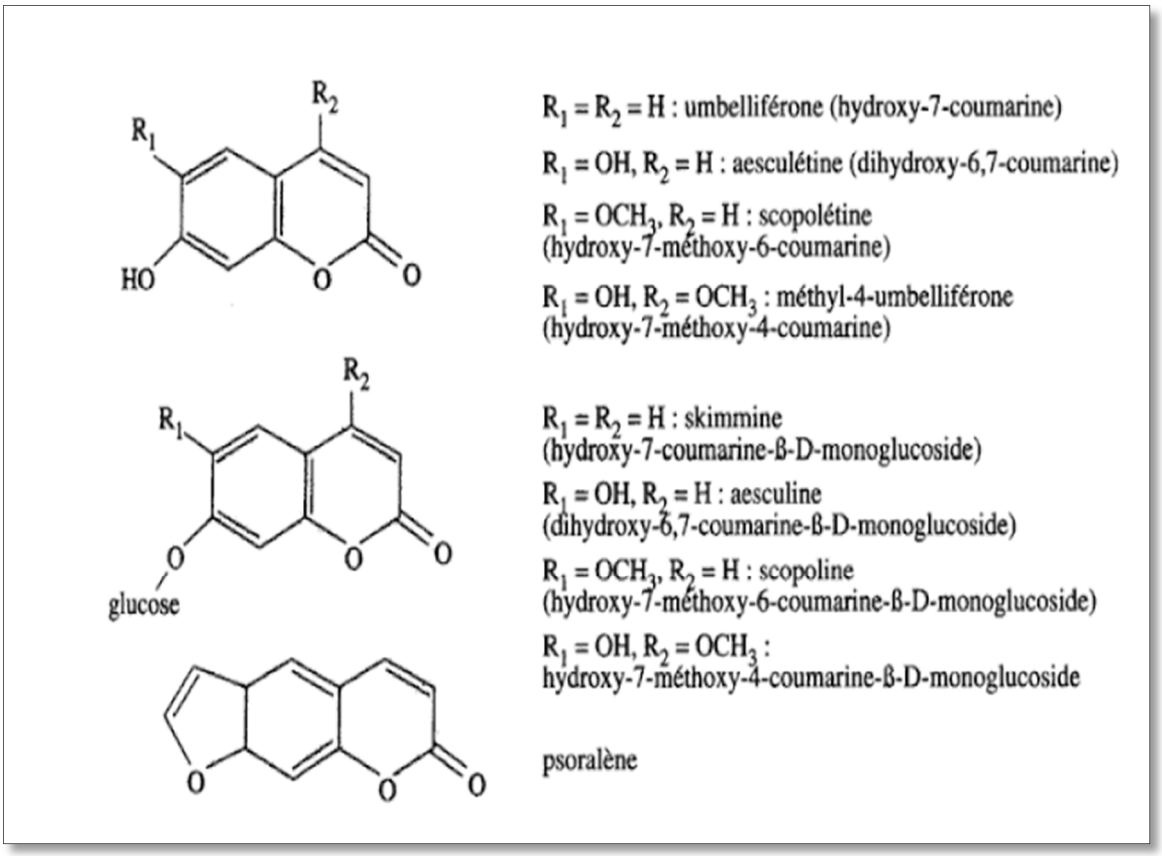


Figure 14 : Structure de quelques coumarines (Ex : Aesculétine, Scopolétine, Umbelliférone…) et glycosides de coumarines (ex : Aesculine, Scopoline) **(Collin& Crouzet, 2011).**

II.2.6. Stilbènes

Les stilbènes sont un groupe de polyphénols non flavonoïdiques issu du métabolisme secondaire végétal, ont une structure chimique de base du type C_6-C_2-C_6, composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène, qui sont connus pour leurs nombreuses propriétés biologiques comme les activités chémopréventives et neuro-protectrices **(Collin & Crouzet, 2011 ; Arraki, 2014).** Parmi ces composés, on trouve le resvératrol (figure 15) qui est le stilbène le plus étudié, de par sa présence dans les produits issus du raisin et ses nombreuses propriétés pharmacologiques (anticancéreux, cardioprotecteur, antioxydant…) **(Leray, 2010).**

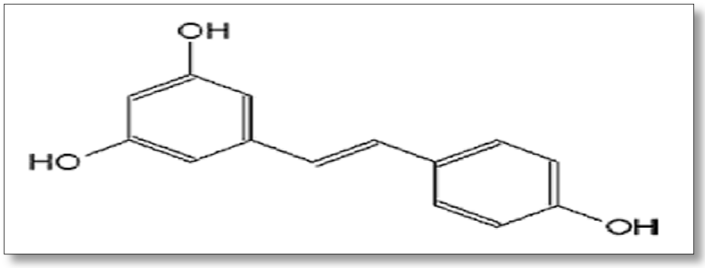


Figure15 : Structure du resvératrol **(Leray ,2010).**

II.2.7. Les quinones

Les quinones sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques et qui sont caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5diénique (ortho-quinones) **(Bruneton, 2009).**

Ce sont des substances colorées (jaunes pâles, rouges et bruns) (figure16). Ils sont présents dans de nombreuses familles de végétaux. On distingue : Benzoquinones, Naphtoquinones, Anthraquinones **(Nascimento et *al.*, 2013).** Ces derniers, les plus répandus sont colorés en orangé rouge et combinés à des sucres **(Harborne, 1998).**

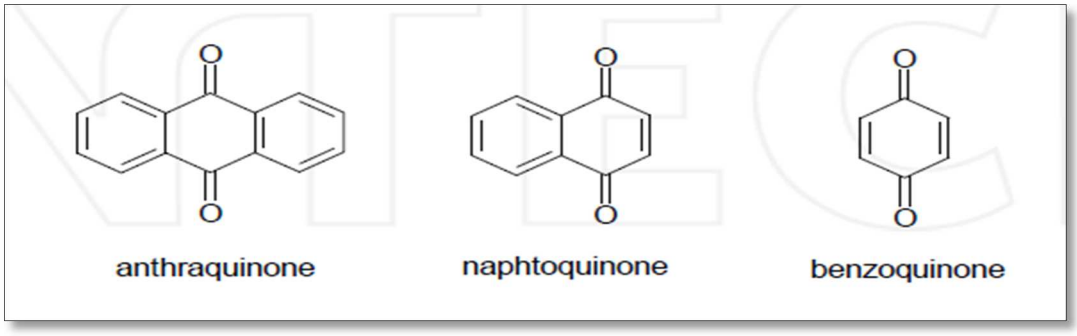


Figure 16 : Classification des quinones **(Nascimento et *al.*, 2013).**

II.2.8. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées d'origines végétales, à propriétés basiques et ont un goût amer. Ils sont dérivés des acides aminés tels que l'ornithine, la tyrosine, le tryptophane et autres. Ils ont des propriétés thérapeutiques ou bien ils sont très toxiques à l'encontre des prédateurs. D'autres ont des qualités analgésiques comme la morphine ou la codéine. Ils agissent également en tant qu'agent antipaludéen comme la quinine, par exemple. Un alcaloïde tel que la vinblastine, qui est produite par la pervenche de Madagascar (*Catharanthusroseus*), s'est avéré être utile pour le traitement de certaines formes de cancer **(Jost & Yan-Chim, 2015).**

II.3. Propriétés chimiques des polyphénols

La présence du cycle benzénique associé à une ou plusieurs fonctions hydroxyles (groupe phénol) confère aux polyphénols des propriétés essentielles.

II.3.1. Acidité

La première propriété des polyphénols est leur acidité. En général, ce sont des acides faibles ($pKa \leq 10$) mais leur pKa dépend de la structure globale de la molécule et de la position des groupements phénoliques et de la nature des substituants sur le noyau aromatique **(Bouras, 2015**).

II.3.2. Liaison hydrogène

Les phénols sont des donneurs de liaison hydrogène (liaison H) en raison du caractère acide du proton du groupe OH. Ce sont aussi des accepteurs de liaison H. En fait, seule la paire libre de l'atome O qui n'est pas conjuguée avec le cycle est capable d'accepter une liaison H en provenance d'un donneur. Ainsi, un phénol est capable de donner une liaison H et d'en recevoir une seulement. Notons que ces liaisons H se renforcent mutuellement (coopérativité). Par exemple, en donnant une liaison H, le phénol allonge sa liaison OH. Cet état de pré-dissociation accentue la densité électronique sur le centre O et donc son caractère accepteur de liaison H **(Nkhili, 2009 ; Laouini, 2014).**

II.3.3. Nucléophilie

La nucléophilie des composés phénoliques est portée par l'atome d'oxygène et les atomes de carbone en ortho et para du groupement OH. Cette propriété est à l'origine des réactions de substituants électrophiles aromatique (alkylation, acylation, etc.) régiosélectives des positions ortho et para (**Nkhili**,**2009).**

II.3.4. La polarisabilité

La polarisabilité des phénols leur permet de développer de fortes interactions moléculaires de dispersion (composante attractive des interactions de Van der Waals) avec autres composés polarisables. Ainsi, en solution aqueuse, l'interaction du noyau benzénique apolaire du phénol avec une autre entité polarisable telle qu'un second cycle aromatique est favorisée par l'effet hydrophobe **(Nkhili, 2009).**

II.3.5. Complexation des protéines

Du fait de leur importance dans des domaines très variés, les phénomènes de complexation protéines-polyphénols ont été à l'origine de nombreux travaux. L'association de ces composés résulte d'une part d'interactions hydrophobes entre les noyaux aromatiques des composés phénoliques et les acides aminés hydrophobes des protéines (acides aminés à noyau aromatique ou à chaine aliphatique), d'autre part de l'établissement de liaison hydrogène entre les groupements hydroxyles des polyphénols et les groupements polaires des protéines : carboxyle, amine, amide **(De Reynal, 2009).**

II.3.6. Chélation des métaux

De nombreux composés phénoliques contiennent certains groupes structuraux susceptibles de former des complexes avec les ions métalliques comme le Fe^{2+} **(Ribérau-Gayon, 1968).** Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater des lésions métalliques en créant des composés complexes inactifs **(Maleśev et Kuntić, 2007).**

II.3.7. Piégeage des radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. À cause de leur faible potentiel redox, les polyphénols (Ar-OH), sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxyles ($ROO^{\bullet}$), les alkoxyles ($RO^{\bullet}$) et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène **(Achat, 2014).** Le radical formé ainsi est ensuite stabilisé par résonnance (délocalisation de l'électron non apparié sur l'ensemble du cycle aromatique) ce qui provoque le ralentissement de la propagation des réactions radicalaires (**Bouras, 2015**).

II.4. Propriétés biologique des polyphénols

Les polyphénols ce très vaste groupe de micro-constituants d'origine végétale rassemblent des actifs structurellement et fonctionnellement différents mais qui présentent pour la plupart, à

des degrés variables, des propriétés antioxydantes et de ce fait, participent à la prévention du stress oxydant et au maintien d'une réponse immunitaire optimale **(Roberfroid et *al*., 2008).**

a) **Les acides phénoliques** ont des propriétés antiparasitaires, antifongiques, antioxydantes, antibactériennes, antiulcéreuses et anticancéreuses. Pharmacologiquement, les mieux caractérisés sont l'acide caféique et l'acide ferulique **(Psotova et *al*., 2003).** Les phénols type resvératrol, un agent anticancéreux à des propriétés antioxydantes et veintoniques **(Roberfroid et *al*., 2008).**
b) **Les flavonoïdes** sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, ils peuvent exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculo-protectrices, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives **(Ghedira, 2005).**
c) **Les tanins** favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures. Par voie interne, ils exercent un effet anti-diarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration (orale ou locale) l'effet antiseptique, antibactérien et antifongique, clairement démontré de ces molécules peut-être intéressant (diarrhées infectieuses, dermites) **(Bruneton, 2009).**
d) **Les coumarines et leurs dérivées** constituent une grande classe d'hétérocycles. La plupart d'entre elles, sont douées d'activités biologiques variées (analgésiques, anti-inflammatoires, protectrices vasculaires, antiparasitaires, anti-œdémateuses, antitumorales, soins des hémorroïdes et des varices **(Ito et *al*., 2005 ; Smyth et *al*., 2009).** Parmi elles, on peut citer, l'activité anticoagulante dont le chef de file est la warfarine, l'activité anticancéreuse et hépatotrope dont le chef de file est l'hymecromone, l'activité antibiotique **(Kayser et *al.*, 1997).** Les coumarines exercent aussi des activités antibactériennes et antifongiques. Elles sont plus efficaces contre les Gram positifs et inhibent la croissance de *Saccaromyces cerevisiae* et la germination des spores d'*Aspergillus niger* **(Cowan ,1999).**
e) **Parmi les stérols**, le plus important du point de vue activité biologique, est le β-sitostérol présent dans toutes les plantes, il possède des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques, antinéoplasiques et à des effets antitumoraux **(Valdés, 1994).** D'autres études ont rapporté des effets bénéfiques du s-sitostérol *in vitro* sur des cellules de cancer du côlon ou du sein **(Awadet *al*., 1998 ; Downie et *al*.,2000).**

II.5. Méthode d'extraction des composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide, à des protéines, à des groupements acides et à des groupements alcalins ce qui peut conduire à la formation d'un complexe tout à fait insoluble, rendant difficile leur extraction **(Boizot & Charpentier, 2006 ; Garcia-Salas et *al*., 2010).** Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) **(Boizot & Charpentier, 2006).**

La technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des principes actifs de ces métabolites existant dans le matériel végétal, aussi bien que dans leur identification **(Quy Diem Do et *al*., 2014).**

De nombreux travaux ont prouvé que, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature des composés (par exemple, classes des molécules phénoliques spécifiques telles que des flavonoïdes, acides phénoliques, etc.), de la nature de l'échantillon (graines, feuilles, ramilles) et de son état physique. Indépendamment de la technique choisie, l'optimisation des conditions d'extraction peut-être changé selon la préparation de l'échantillon **(Antolovich *et al.,* 2000).**

En effet les conditions expérimentales d'extraction telles que la méthode d'extraction, la nature du solvant organique et sa concentration, la température d'extraction, le temps d'extraction ou le nombre des extractions et des répétitions effectuées, jouent un rôle déterminant dans la variation des teneurs en polyphénols **(Trablsi et *al*., 2010 ;Mohamedi et *al*., 2013 ;Mahmoudi et *al*., 2013 ; Chaouch, 2014 ; Bourgou et *al*., 2016**).Classiquement, les composés phénoliques sont extraits par macération ou extraction à reflux avec un mélange hydro-alcoolique **(Azmir et *al*., 2014).**

II.5.1. Extraction par macération

L'extraction par macération est l'une des méthodes d'extraction traditionnelles, la plus couramment employée pour la détermination du contenu des plantes médicinales en métabolites secondaires **(Chaouch, 2013).** La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple, elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant, avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée **(Budic-Letoc et *al.,* 2005 *;* Spigno & Defaveri, 2007**). Elle commence avec le

choix d'un solvant d'extraction adéquate. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint **(Handa, 2008).**

II.5.2. Extraction par décoction

La décoction est la méthode d'extraction solide-liquide utilisée en médecine traditionnelle. Cette opération consiste à extraire les principes actifs d'une plante par action d'un liquide porté à ébullition **(Pierre & Lis, 2007).** La décoction reste efficace pour l'extraction des composés phénoliques car c'est une opération qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles **(Groubert, 1984).**

II.5.3. Autres méthodes d'extraction

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des composés phénoliques à partir de matière végétale comme l'extraction conventionnelle par solvant, l'extraction par eau chaude, l'extraction assistée par enzymes et l'extraction par fluide supercritique.

La méthode d'extraction conventionnelle par solvant peut causer la dégradation des composés phénoliques à cause des températures élevées et de la durée d'extraction. De nouvelles techniques combinant l'extraction conventionnelle avec d'autres facteurs accélérant l'extraction (extraction par micro-ondes, extraction par ultrasons, extraction sous haute pression hydrostatique, extraction par fluide supercritique ou par eau sous-critique) sont utilisées pour pallier à cette dégradation **(Li et *al.,* 2006b, Xu et *al.,* 2007, M'hiri, 2015).**

II.6. Séparation des composés phénoliques par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques ont fait des progrès spectaculaires au cours des trente dernières années, grâce en particulier à l'utilisation quasi systématique de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et des détecteurs à barrette de diodes permettant l'analyse des spectres d'absorption en ultraviolet et le couplage de CLHP avec les techniques physico-chimiques modernes (spectrométrie de masse, résonnance magnétique nucléaire…) **(Macheix et *al*. ,2005).** Ces méthodes sont utilisées selon différentes modalités : utilisation des données spectrales et de rétention, utilisation de composés de référence **(Collin & Crouzet, 2011).**

Cette méthode est majoritairement utilisée pour l'analyse des substances peu ou volatiles, thermolabiles ou polaires. Elle demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages tels que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection **(Michel, 2011).**

Chapitre III : Activités antioxydantes et antimicrobiennes

III.1. Activités antioxydantes

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité ; cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau des radicaux présents. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant **(Favier, 2003).**

Le stress oxydant apparaît lorsque les systèmes antioxydants sont débordés, c'est-à-dire quand l'équilibre entre les réactions pro-oxydantes et antioxydantes est rompu en faveur des premières **(Chatard, 2005).**

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants naturels tels les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols, dont l'efficacité est reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine.

III.2. Le stress oxydant

Le stress oxydant est représenté par l'ensemble des réactions faisant intervenir des espèces réactives de l'oxygène (ROS), elles-mêmes caractérisées par la présence d'un électron célibataire très réactif (radical libre).

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les capacités antioxydantes de la cellule. Les principaux ROS générés sont : l'anion superoxyde (O_2), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) et le peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) **(Carole et *al*., 2011).**

Ce stress peut-être engendré par des situations d'augmentation de la production de radicaux libres causés par des agents toxiques (tabac, pollution, médicament…) ou des situations physiologiques telles que l'exercice physique, l'exposition à l'hypoxie et le vieillissement **(Chatard, 2005)**.

III.3. Les radicaux libres

Plusieurs catégories de corps chimiques sont susceptibles de donner naissance à ces espèces très réactionnelles et leur mise en évidence est difficile **(Thiebault,1997).**

III.3.1. Classes des radicaux libres

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non radicalaires **(Delattre *et al.*, 2005a).**

Les radicaux libres sont des espèces chimiques instables portant des électrons qui s'échappent des combinaisons moléculaires oxygénées. Ayant perdu un atome, ils deviennent alors des «électrons libres» prêts à se recombiner **(Berruex ,1998)**, réagissant spontanément avec d'autres atomes ou molécules pour initier des réactions en chaîne utiles mais parfois aussi nuisibles à l'organisme.

III.3.1.1. Radicaux libres primaires

Les radicaux primaires sont directement dérivés de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO°) **(Favier, 2003)**.

a) L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)

L'ion superoxyde est une espèce réactive oxygénée (une espèce possédant un électron célibataire) naturellement produite dans toutes les cellules des êtres vivants en particulier au niveau des mitochondries, à la suite de la réaction suivante :

$$^{\circ}O\text{-}O^{\circ} + e^{-} \longrightarrow O\text{-}O^{\circ}\ (O_2^{\circ})$$

Il est dangereux surtout par le fait qu'il participe à la formation du radical hydroxyle (OH) **(Wouters, 2015)** et il est à l'origine des cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives **(Justine &Pastre, 2005).**

b) Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :

Il provient d'une réaction entre deux ions superoxyde ($\bullet O_2^-$). Il endommage les membranes cellulaires et est neutralisé par la GPX (glutathion peroxydase), le sélénium et la L-cystéine **(Chaouch, 2014)**.

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{+2H^+} O_2 + H_2O_2$$

c) Radical hydroxyle (˙OH) :

Il est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferriques, au cours de la réaction d'Haber-Weiss :

$$O_2^{\bullet} + H_2O_2^{\bullet} \longrightarrow OH + OH^- + O_2$$ **Réaction d'Haber-Weiss**

Il est très puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique. Ils possèdent une très grande réactivité dans les milieux biologiques, pouvant se combiner avec de nombreuses molécules et serait à l'origine de la production des radicaux libres « secondaires », suite à sa réaction avec différents composés cellulaires **(Castro et *al.*, 2001 ; Babuty et *al.*, 2007).**

d) Oxygène singulet ($^1O_2$) :

L'oxygène singulet est la forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, Il est produit par action de rayonnement UV sur l'oxygène ou par les leucocytes ou encore au cours de la peroxydation lipidique **(Halliwell & Gutteridge, 2006).**

Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :

$$^{\circ}O\text{-}O^{\circ} \longrightarrow {}^1O_2$$ **(Sous l'action de la lumière).**

e) Le monoxyde d'azote (NO˙) :

Le monoxyde d'azote (NO˙) se retrouve en trop fortes concentrations, synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine en présence de la nitrique oxyde synthétase (NOS), il joue un rôle physiologique important comme vasoprotecteur (anti-inflammatoire et anti-thrombotique), neurotransmetteur, et régulateur du système immunitaire **(Toussaint et *al.*,2003).**

Dans les conditions du stress oxydant, notamment par une surproduction du radical superoxyde, la biodisponibilité du NO est fortement réduite suite à sa réaction avec l'anion superoxyde pour former le peroxynitrite (ONOO·) **:**

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow ONOO^{\bullet}$$

Ce composé hautement réactif, cause des dommages aux protéines, lipides et acides nucléiques. Le fait qu'il diffuse largement à travers les membranes contribue à son effet délétère **(Kroncke et *al.*, 2000)**.

III.3.1.2. Radicaux libres secondaires

D'autres formes radicalaires dites « secondaires » peuvent être retrouvées dans les milieux biologiques. Il s'agit en particulier des radicaux : alkyle (R˙), alkoxyle (RO˙) et alkyl peroxyle

(ROO•), générés à la suite de l'action oxydante de radicaux libres oxygénés « primaires » (superoxyde, hydroxyle) sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés, les glucides, les protéines ou les acides nucléiques **(Vergely & Rochette, 2003)**.

III.3.2. Production des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent avoir une double origine, une origine exogène et une origine endogène.

III.3.2.1. Les sources endogènes des radicaux libres

De nombreux systèmes enzymatiques identifiés dans les cellules sont également capables de générer des oxydants **(Salvayre et *al*., 2003) :**

- Au niveau de la chaîne respiratoire, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries par voie enzymatique en molécule non toxique comme H_2O. Cependant au cours du transfert d'électron, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des espèces oxygénées activées (EOA) : Celles-ci sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), ou le radical hydroxyle (OH•), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet ($1O_2$) **(Haleng et *al*., 2007).**

- Les métaux de transition, comme le Fe^{2+}et le $Cu^{2+,}$ agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle (•OH), encore plus toxique **(Salvayre et *al*., 2003).**

- Les NAD(P) H oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent ($O_2^{\bullet-}$)en utilisant NADH ou NADPH comme substrat pour tuer les bactéries ou les virus **(Salvayre et *al*., 2003)**.
- La xanthine oxydase /déshydrogénase peut générer ($O^{\bullet-}$) et (H_2O_2) en utilisant la xanthine ou l'hypoxanthine et NADH comme substrat **(Serteynet *al*., 2002).**

- Des cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote (NO•) à partir de l'arginine et l'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthase. À forte concentration, le monoxyde d'azote réagit avec un radical superoxyde ($^{\bullet}O_2^-$) pour former un puissant oxydant, le peroxynitrite ($ONOO^-$). En outre, le peroxynitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants ($NO^{\bullet}{}_2$, •OH, etc.) **(Haleng et *al*., 2007).**

III.3.2.2. Les sources exogènes des radicaux libres

À côté des productions endogènes, il existe des sources exogènes de formes radicalaires oxygénées, liées à une mauvaise hygiène de vie.

Ils sont consécutifs au tabagisme, à une ingestion excessive d'alcool, à l'ingestion d'huiles oxydées, ou à des agents physiques, tels que la chaleur, les rayons ultraviolets ou encore divers polluants **(Riché & Chos, 2008).**

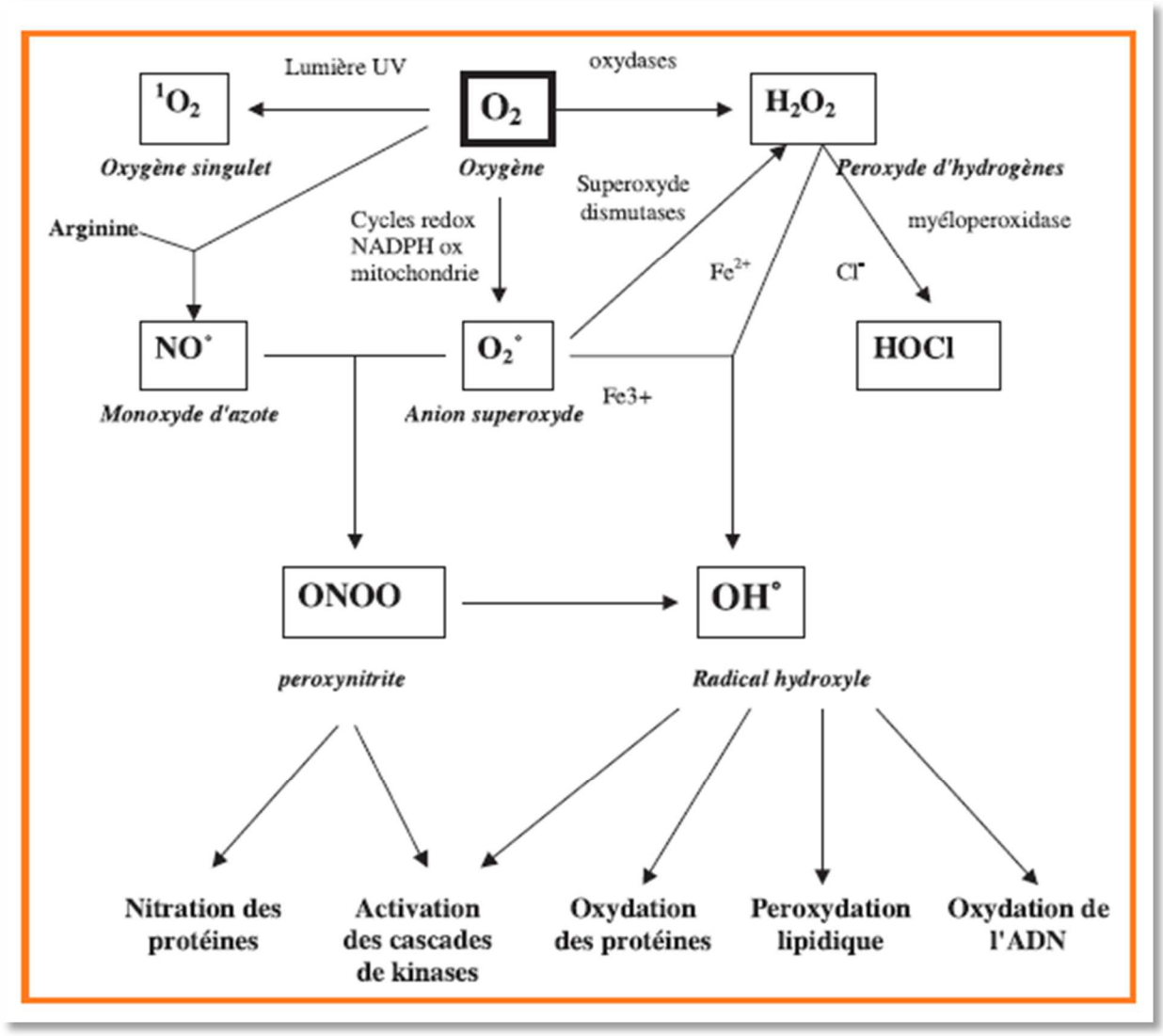


Figure 17 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie **(Favier, 2006).**

III.3.3. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides **(Favier, 2003).**

III.3.3.1. La peroxydation des lipides membranaires

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés, des phospholipides membranaires (membranes cytoplasmiques et des organites intracellulaires), sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyle. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne **(Esterbauer et *al*., 1992).**

Son mécanisme comprend trois étapes **:**

1. **L'initiation** : des radicaux se forment sous l'influence de divers facteurs : lumière, chaleur, présence de métaux ou d'autres radicaux comme le radical hydroxyle (HO°). Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène à l'un des atomes de carbone situé entre deux doubles liaisons du lipide, pour former une molécule d'eau **(Murray et *al*.,2002) :**

$$RH + HO^{\circ} \longrightarrow R^{\circ} + H_2O \qquad (1)$$

Cette réaction supprime le radical hydroxyle mais entraîne la formation d'un radical centré sur le carbone (R°).

2. **La propagation** : le radical centré sur le carbone (R°) va subir un réarrangement pour former, par délocalisation de la double liaison, un radical diène conjugue, oxyde en radical peroxyle (ROO°) **:**

$$R^{\circ} + O_2 \longrightarrow ROO^{\circ} \qquad (2)$$

Cette réaction forme rapidement une réaction en chaîne, car le radical peroxyle est suffisamment réactif pour attaquer les autres acides gras polyinsaturés en arrachant un hydrogène et former un hydroperoxyde lipidique (ROOH) ainsi qu'un nouveau radical centré sur le carbone (R°) **:**

$$ROO^{\circ} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\circ} \quad (3)$$

3. **La terminaison**, entraînée par la réaction de deux radicaux hydroxyles pour donner des produits non radicalaires et terminant la chaine de réactions **:**

$$\left.\begin{array}{l} 2\ ROO^{\circ} \\ ROO^{\circ} + R^{\circ} \end{array}\right\} \text{Produits non radicalaires}$$

Comme alternative de la réaction (3), le radical peroxyle (ROO°), après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes hautement cytotoxiques et mutagènes, tels que le malonaldialdehyde et le 4-hydroxynonenal. Ces derniers peuvent réagir avec l'ADN ou des protéines et provoquer des lésions structurales et fonctionnelles **(Favier, 2003).**

III.3.3.2. Oxydation des protéines

Les modifications des protéines par les radicaux libres provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine **(Levine et *al*., 1990)**. Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres peuvent conduire à des modifications structurales (fragmentation et modification des acides aminés) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique et altération du processus de protéolyse)**.** Ces modifications conduisent à une altération structurale des protéines dont les conséquences sont majeures : perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases… **(Stadtman et *al.,* 2000)**.

III.3.3. 3. Acides nucléiques

Les modifications induites par des processus oxydatifs dans le matériel génétique appartiennent à quatre catégories, modifications des bases, cassures simples, doubles de la chaîne d'ADN et pontages avec des protéines (Figure 18). Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (létalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et aussi dans le vieillissement cellulaire **(Hochberg et *al*., 2006)**.

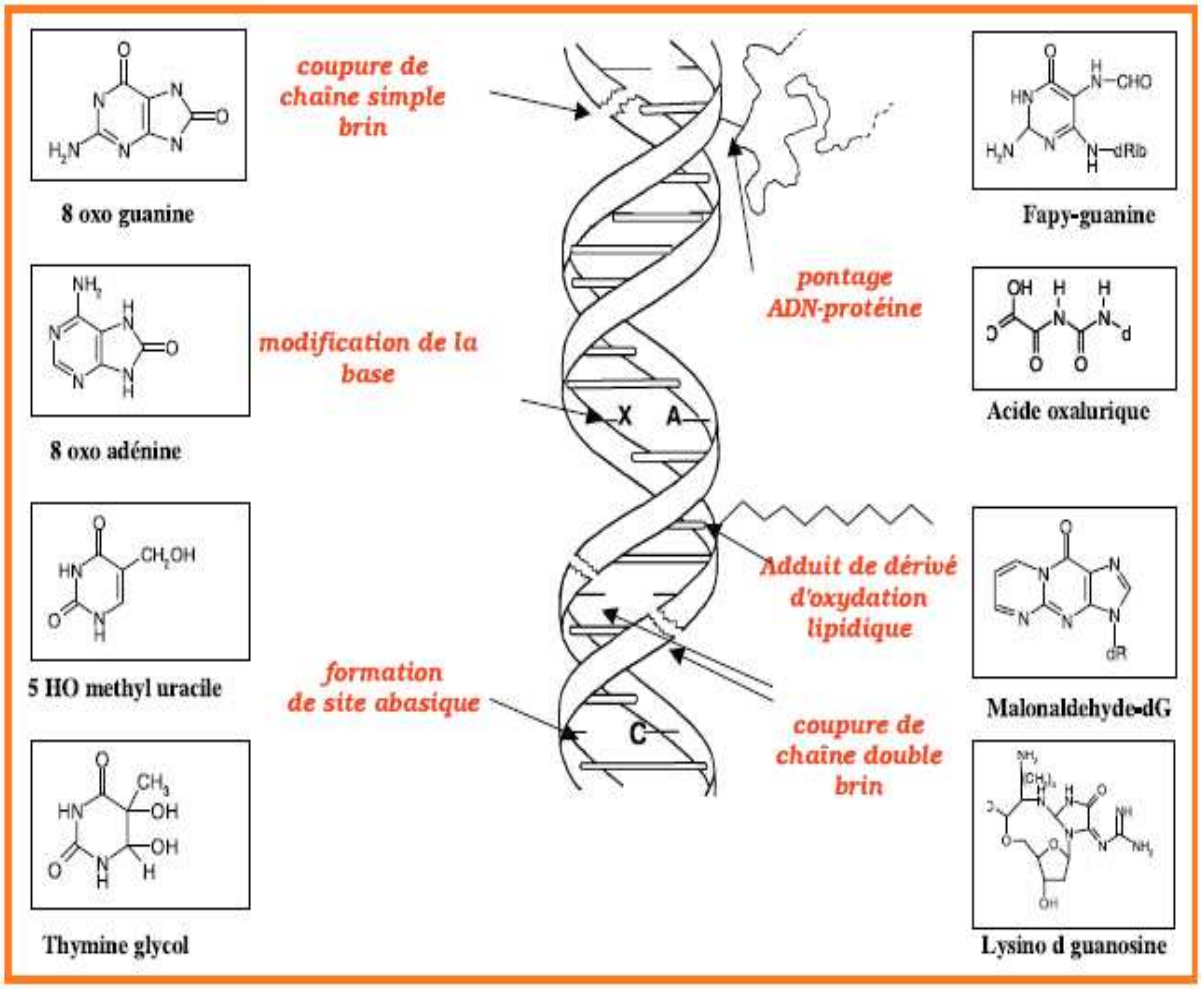


Figure 18 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules **(Favier, 2003).**

III.4. Les antioxydants

Lorsque les systèmes antioxydants sont débordés, c'est-à-dire quand l'équilibre entre les réactions pro-oxydantes et antioxydantes est rompu en faveur des premières **(Berruex ,1998),** cet excès de radicaux oxygénés va attaquer les macromolécules de la cellule, peroxydant les lipides, oxydant l'ADN et les protéines. Ces agressions biochimiques créent des lésions responsables de dysfonctionnement de la cellule variables selon la dose du stress : hyper-prolifération, mort cellulaire par apoptose, dépôt de lipides, mutation... donc le stress oxydant participe ainsi à la mise en place de nombreuses maladies graves, dont les plus importantes sont : les cancers, les maladies cardiovasculaires ou les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer **(Favier, 2003).** Pour neutraliser cet excès, les radicaux libres sont captés et éliminés par des molécules que l'on qualifie d'antioxydants. Notre organisme possède ses propres moyens de défense et il est naturellement équipé d'un système de

protection contre l'action des radicaux libres. Il s'agit de protéines spécialisées appelées enzymes : la superoxyde dismutase, la catalase, le système glutathion-peroxydase. Ce n'est pas tout : certaines vitamines comme la vitamine E, la vitamine C, et encore bien d'autres antioxydants apportés par l'alimentation (fruits et légumes surtout) confèrent à l'organisme une protection supplémentaire non négligeable **(Halliwell et *al*., 1987 ; Marvin, 2002).**

Ces antioxydants peuvent être définis comme étant des substances qui, présentes à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat par la libération d'un ou plusieurs électrons **(Halliwell et *al*., 1987).**

III.4.1. Classification des antioxydants selon leurs natures

Ils sont d'origine endogène (synthétisés et sous contrôle de l'expression des gènes) ou exogène (alimentation et complémentation), enzymatiques ou antioxydants non enzymatiques **(DE Moffarts et *al*., 2005).**

III.4.1.1. Les antioxydants naturels

Les antioxydants primaires sont des enzymes antioxydantes essentielles, naturellement produites par notre organisme, ils possèdent une action directe sur les ERO. Ces enzymes antioxydantes endogènes constituent notre plus puissante défense contre les radicaux libres **(Céline,2004)**.

L'organisme a besoin de systèmes de défense très efficaces, de deux types **:**

a) Les systèmes de défense antioxydants enzymatiques

Les trois enzymes antioxydantes majeures sont :

- Le rôle majeur du **superOxyde Dismutase (SOD)** est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire ;

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

- **La catalase** transforme le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle puis en H_2O au niveau des peroxysomes. Elle interviendrait essentiellement lorsque H_2O_2 est produite en excès (hyperoxie) ou dans les situations d'insuffisance du système glutathion **(Voyer & Magny, 1998 ; Papazian & Roch, 2008)** ;

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$$

- **La glutathion-peroxydase ou (GPx)** catalyse la transformation directe d'H_2O_2 en H_2O et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. Son action nécessite la présence du couple glutathion réduit-glutathion oxydé **(Voyer &Magny, 1998).**

$$\mathbf{2GSH_{(réduit)} + H_2O_2 \longrightarrow GSSG_{(oxydé)} + 2H_2O}$$

$$\mathbf{ROOH + 2GSH_{(réduit)} \longrightarrow ROH + GSSG_{(oxydé)} + H_2O}$$

Ces trois enzymes antioxydantes ont besoin pour être activées d'être mises en présence de minéraux issus des aliments : fer pour la catalase, zinc et cuivre pour la superoxyde dismutase, sélénium pour les glutathions-peroxydases **(Céline,2004).**

b) Les systèmes de défense antioxydants non enzymatiques :

- **La vitamine E** agit en cédant un atome d'hydrogène à un radical libre O_2 pour former un hydroperoxyde et un radical d'alphatocophérol qui est relativement stable, peut-être réduit par l'acide ascorbique, ou réagir avec un deuxième peroxyde pour donner un produit stable non radicalaire ;
- **Le bêtacarotène** (précurseur de la vitamine A) à un rôle de protection des lipides membranaires en interrompant la chaine de lipoperoxydation par un mécanisme de transfert d'électrons ;
- **La vitamine C** : intervient indirectement, par réduction de la vitamine E oxydée ce qui la rend à nouveau disponible ;
- **Les composés thiols**, le couple redox ubiquinone-ubiquinol, la caeruloplasmine, et certains métaux (zinc, sélénium, cuivre, fer…) ont généralement des propriétés antioxydantes **(Voyer et Magny, 1998 ; Papazian & Roch, 2008)**.

III.4.1.2. Les antioxydants synthétiques

Parmi les antioxydants synthétiques qui sont autorisés pour la conservation des produits alimentaires et pharmaceutiques : le butylhydroxytoluène (BHT), du butylhydroxyanisole (BHA) (tableau 3). Ces deux additifs sont insolubles dans l'eau, résistants à la chaleur, mais ont une bonne solubilité dans les milieux lipidiques. Ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évaporent rapidement. Ils peuvent également causer des effets secondaires, comme prouvé par des études récentes. En particulier, le BHT, lorsqu'il est

appliqué sur la peau, endommagerait les tissus pulmonaires. L'utilisation du BHT et le BHA sont actuellement remis en question pour raison toxicologique **(Salvador &Chisvert, 2011).** Les nitrites dans les aliments, présentent des propriétés antioxydantes, qui peuvent contribuer à la formation d'un groupe de composés connus sous le nom de nitrosamines, dont certains sont cancérigènes **(Decloître, 1992).**

Tableau 3 : Principales substances antioxydantes **(Pokorny et *al*., 2001 ; Le Cren, 2004).**

Antioxydants primaires	
Enzymes Cytosoliques	**Vitamines**
-GPX (Glutathion Peroxydase)	**-**Vit C
-GRD (Glutathion réductase)	-vit E (Tocophérols)
- GRT (Glutathion transférase)	-Vit Q (Ubiquinone)
-SOD (Superoxyde Dismutase)	-Vit A (Rétinol)
-Catalase	Vit B_5 (A. pantothénique)
Antioxydants secondaires naturelles	
Minéraux	**Phytochimiques**
-Sélénium	
-Zinc	
-Manganèse	-Terpènes
-Cuivre	-Polyphénols
-Magnésium	
-Anhydride sulfureux (SO_2)	
Antioxydants de synthèse	
-BHT (3,5ditertobutyl4hydroxytoluène)	
-BHA (3-tertiobutyl4-hydroxyanisole)	
-TBHQ (tertiobutylhydro -xyquinone)	
-Trolox (acide-6-hydroxy-2, 5, 7,8- tetraméthylchroman-2-carboxylique)	
-Gallate de propyle (E310)	
-Gallate d'octyle (E311)	
-Gallate de dodécyle (E312)	

III.5. Avantages et inconvénients des antioxydants de synthèse

Actuellement, l'emploi des molécules antioxydantes de synthèse est remis en cause en raison des risques toxicologiques potentiels et de cancérisation. L'utilisation de certaines d'entre elles est interdite, mais sont largement appliquées car peu coûteuses. Par contre, les antioxydants naturels sont aussi coûteux et limités, perçus comme des substances inoffensives, de large gamme de solubilité dans l'eau, d'intérêt croissant et complètement métabolisés et ils sont de forte activité antioxydante **(Valenzuela et *al*., 1996).**

III.6. Les antioxydants piégeurs des ERO

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes :

(i) La libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ;

(ii) La libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) **(Nanjo et *al*., 1996 ; Huang et *al*.,2005**).

Les antioxydants rentrent en compétition avec des radicaux déjà existants et contribuent à bloquer la phase de propagation. Dans le cas des composés phénoliques (AH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome d'hydrogène sur le radical qui le transforme en une molécule stable **(Huang et *al*., 2005**).

À cause de leur faible potentiel redox, ils sont capables de réduire les radicaux libres oxydants ($R^{\bullet}$) comme le superoxyde, le radical peroxyl, le radical alkoxyle ($RO^{\bullet}$) et le OH par transfert d'hydrogène (figure19) **(Densiov, 2005)**. Le radical aroxyle résultant peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.

Les flavonoïdes sont aussi des principaux donneurs d'électrons. Cette capacité est appelée pouvoir réducteur **(Rice-Evans et *al*., 1996)**.

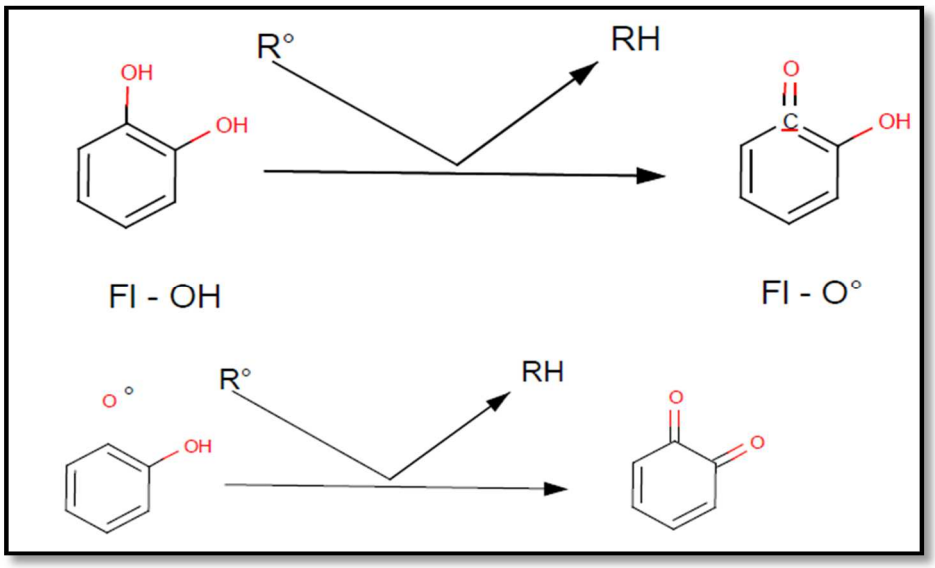


Figure19 : Réaction des flavonoïdes avec les EOR **(Javanovic et *al*., 1994).**

III.7. Polyphénols comme antioxydants

Les polyphénols peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde : O_2^-, radical hydroxyle : OH) pour produire des radicaux phénoxy stables. Ils peuvent aussi agir comme des antioxydants grâce à leur capacité à complexer les ions métalliques **(Collin et Crouzet, 2011).**

Les flavonoïdes en particulier, sont des antioxydants très puissants. Ils ont la capacité à piéger directement les radicaux libres. Leur efficacité dépend essentiellement de leur réactivité et de la stabilité des radicaux formés (figure 20).

La stabilité du radical est garantie par une structure aromatique permettant une forte délocalisation électronique **(Monin, 2012).** Ils sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices des espèces oxydantes (telles que la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclo-oxygénase, la lipooxygénase, la monoxygénases microsomal, et la glutathion-S-transférase) **(Pietà, 2000).**

De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux de transition comme le cuivre et le fer qui a l'état libre peuvent être impliqués dans la production des radicaux libres et inhiber un processus de peroxydation lipidique, surtout au niveau des LDL et ce, d'une façon beaucoup plus efficace que l'alpha-tocophérol **(Puppo, 1992 ; Marcel et *al*., 2008).**

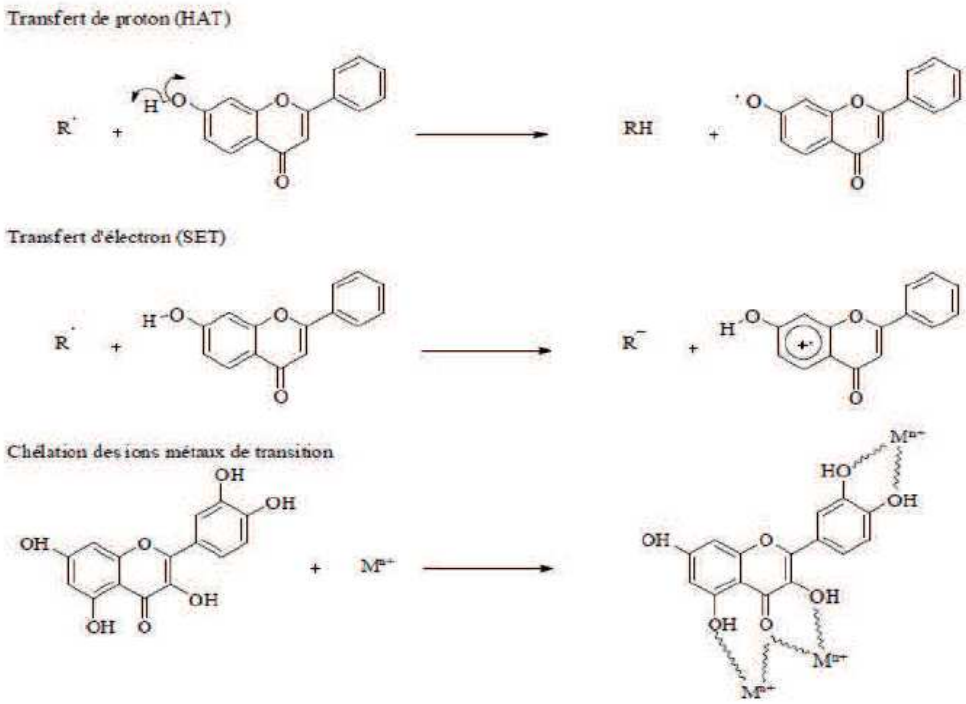


Figure 20 : Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques **(Leopoldini et *al*., 2011).**

III.8. Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo, l'activité antioxydante **(Prioret *al*., 2005).** Ces méthodes diffèrent entre elles selon la nature des radicaux libres, ainsi que selon les techniques analytiques impliquées dans le fonctionnement des processus d'oxydation **(Magalhaes et *al*., 2008).**

Selon **Achat, 2013** ces tests peuvent se diviser en deux catégories : les tests mesurant le transfert d'électrons ou d'hydrogène vers un radical coloré stable facile à détecter (DPPH, TEAC) et ceux faisant intervenir une compétition (ORAC, décoloration de β-carotène et de crocine) entre l'antioxydant et une cible à protéger (pigments, lipides).

III.8.1. Test de la capacité antioxydante totale

Ce test est basé sur la réduction de molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate / Mo (V) de couleur verte **(Prieto et *al.*, 1999).**

III.8.2. Test de piégeage du radical DPPH °

La capacité antioxydante peut-être aussi mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le corps à doser est ajouté à une solution de 2,2diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH °) qui est un radical stable et coloré. Le maximum de son absorption dans le visible se situe vers 515-517nm, dans le méthanol et l'éthanol. La réduction de ce radical par un donneur d'atome H (AH) conduit à la formation de DPPH de couleur jaune et du radical (A°).

La méthode de DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs pour étudier les extraits végétaux et alimentaires. Cette méthode est rapide et peu coûteuse **(Gouveia & Castilho, 2012).**

III.8.3. Test de réduction de fer (FRAP)

C'est une méthode basée sur la réduction chimique de réduction de fer (III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe (II). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm **(Oyaizu, 1986).**

Le pouvoir réducteur d'un composé est associé à son pouvoir antioxydant, une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur. Un point à prendre en compte est la production concomitante de Fe (II), qui est un pro-oxydant bien connu, et peut avoir comme conséquence la génération des radicaux additionnels dans le milieu de réaction. En plus, les composés qui absorbent à la même longueur d'onde peuvent s'y mêler, entraînant une surestimation des résultats **(Ou et *al*., 2002).**

III.8.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (β- carotene bleaching method)

Le β- carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation ; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation **(Goupy et *al*., 1999).**

Cette technique consiste à mesurer à 470 nm, la décoloration du bêta carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du bêta-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C) de manière non spécifique.

L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de la décoloration du bêta-carotène **(Koleva *et al.,* 2001)**.

III.8.5. Test de piégeage du radical ABTS$^{\bullet+}$

Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical ABTS•+, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox (acide 6- hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. L'ABTS oxydé est de couleur bleue à vert, l'ajout d'antioxydant réduit ce radical et provoque une décoloration à 734 nm **(RE et *al*., 1999)**.

III.9. Polyphénols et activité antimicrobienne

L'émergence et la diffusion des résistances aux antibiotiques représentent une réelle menace pour la santé publique mondiale. Les données récentes de la bibliographie abondent de descriptions de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques dont le nombre ne cesse de croître. La principale cause de cette émergence de résistance est une consommation non raisonnée des antibiotiques **(Guillot,1989 ; Ouedraogo et *al*., 2017).**

La recherche de nouveaux composés antimicrobiens dans les plantes médicinales a attiré l'attention de chercheurs partout dans le monde, ce qui constitue une source d'inspiration de nouveaux médicaments, dont les composés phénoliques qui sont utilisés dans les industries alimentaires et cosmétiques et en médecine populaire comme agents antimicrobiens **(Cowan, 1999).**

L'effet antimicrobien des composés phénoliques est principalement lié aux altérations membranaires, à l'inhibition de la synthèse d'ARN et d'ADN ou à celle de l'activité ou de la synthèse d'hydrolases ou d'autres interactions pour inactiver les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire **(Clérivet et *al*., 1996 ; Cowan, 1999).**

L'activité antimicrobienne des polyphénols a été largement étudiée contre un large éventail de microorganismes (tableau 04). Parmi les polyphénols, les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus d'attention du fait de leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols **(Daglia, 2012).**

Tableau 4 : Liste des polyphénols liés à leur activité antimicrobienne (bactéries, champignons et virus) **(Allan de Jesus et *al*., 2013).**

Composés phénoliques	Microorganismes sensibles	Exemples
Flavonoïdes	Bactéries	*Vibrio cholerae, Streptococcus mutans, Clostridium jejuni, Clostridium perfringes, Escherichia coli, Bacillus cereus, Helicobacte pylori, Staphylococcus aureus, Lactobacillus acidophilus, Actinomyces naeslundii, Prevotella oralis, Prevotella gingivalis, Prevotella melaninogenica ,Fusobacterium nucleatum, Chlamydia pneumonia.*
	Virus	Adénovirus, Entérovirus, Flavivirus, HIV
	Champignons	*Candida albicans, Microsporum gypseum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum.*
Tanins condensés	Bactéries	*Escherichia coli, Staphylococcus aureus.*
	Virus	Virus de l'influenza A, type -1,herpès simplex virus (HSV).
Tanins hydrolysables	Bactéries	*Salmonella, Staphylococcus, Helicobacter, Escherichia coli, Bacillus, Clostridium ,Campylobacter, Lysteria.*
	Virus	Le virus Epstein-Barr, les virus Herpès HSV-1 et HSV-2.
	Champignons	*Candida parapsilosis.*
Acides phénoliques	Bactéries	*Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.*
	Champignons	*Candida albibans, Candida krusei ,Candida parapsilosis, Candida tropicalis.*
	Virus	HIV.
Coumarine	Bactéries	*Streptococcus mutans, Streptococcus aureus.*
	Champignons	*Candida albicans.*
	Virus	HIV.
Lignans	Bactéries	*Enterococcus faecalis, Escherichia coli Mycobacterium tuberculosis ,Streptococcus aureus.*
	Virus	HIV.

Partie II : Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I.1.Objectif du travail

L'objectif visé dans cette étude consiste essentiellement à déterminer la meilleure technique d'extraction des composés phénoliques des différentes parties de *Silybum marianum*, en utilisant deux méthodes d'extraction (macération et décoction). Nous employons, pour ce faire, quatre solvants d'extraction afin de voir l'influence de ces paramètres sur l'activité antioxydante et antimicrobienne. L'identification des composés phénoliques des extraits actifs a été réalisée par RP-HPLC.

Cette expérimentation a été réalisée au sein du laboratoire de « Biochimie appliquée » au département de Biologie, de l'Université Djillali LIABÈS de Sidi Bel Abbés.

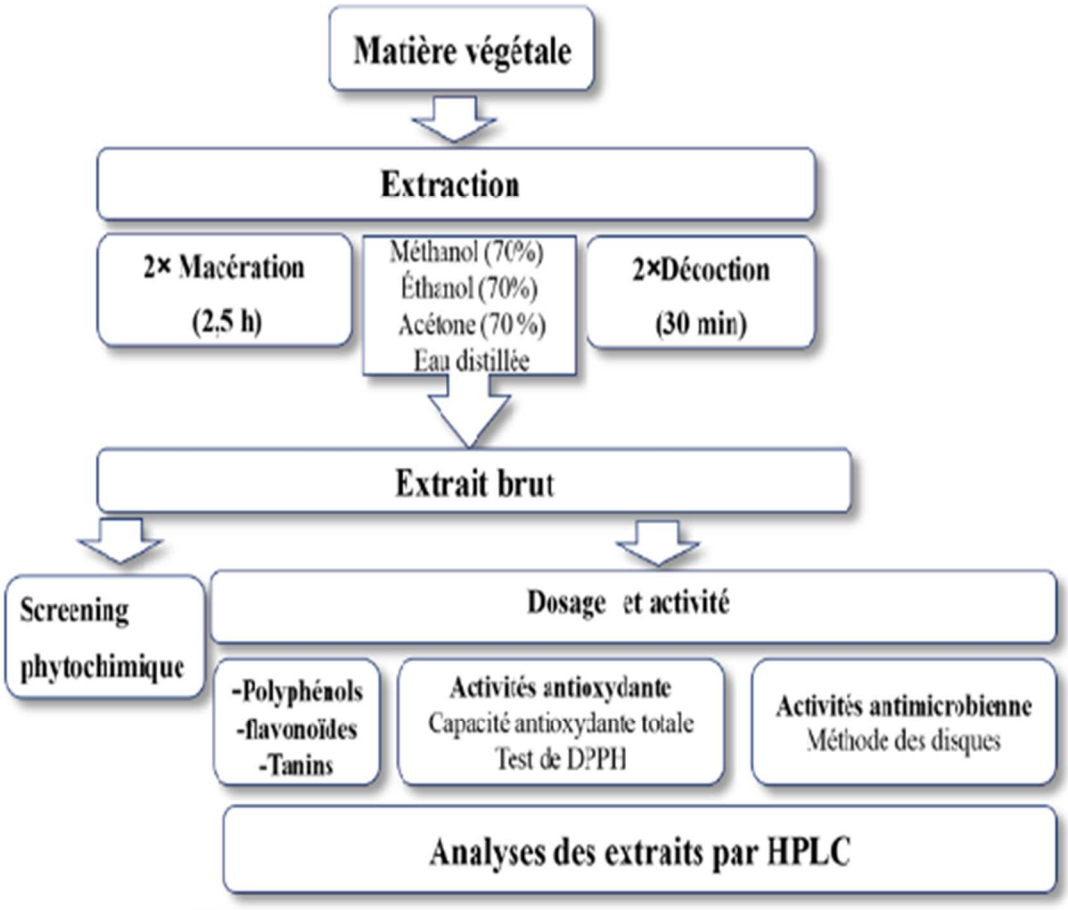


Figure 21 : Méthodologie de travail.

I.2.Matériel végétal

La plante *Silybum marianum* est récoltée pendant la période de floraison (mois de juin) des monts du Tessala (Sidi Bel Abbés - Algérie).

I.2.1. Présentation de site de prélèvement

Les monts du Tessala, présentent une grande diversité biologique, ils sont situés au nord de l'Algérie occidentale, plus précisément au nord de Sidi -Bel Abbés (Figure 22). Cette chaîne montagneuse de l'Atlas Tellien s'étire du sud-ouest au nord-est sur 50 à 60 km, elle est limitée au nord par la plaine de Mleta et la sebkha d'Oran, à l'est par les monts de Béni Chougrane, à l'ouest par les monts de Sebba Chioukh, et au sud par la plaine de Sidi-Bel-Abbès (**Kikken, 1962).**

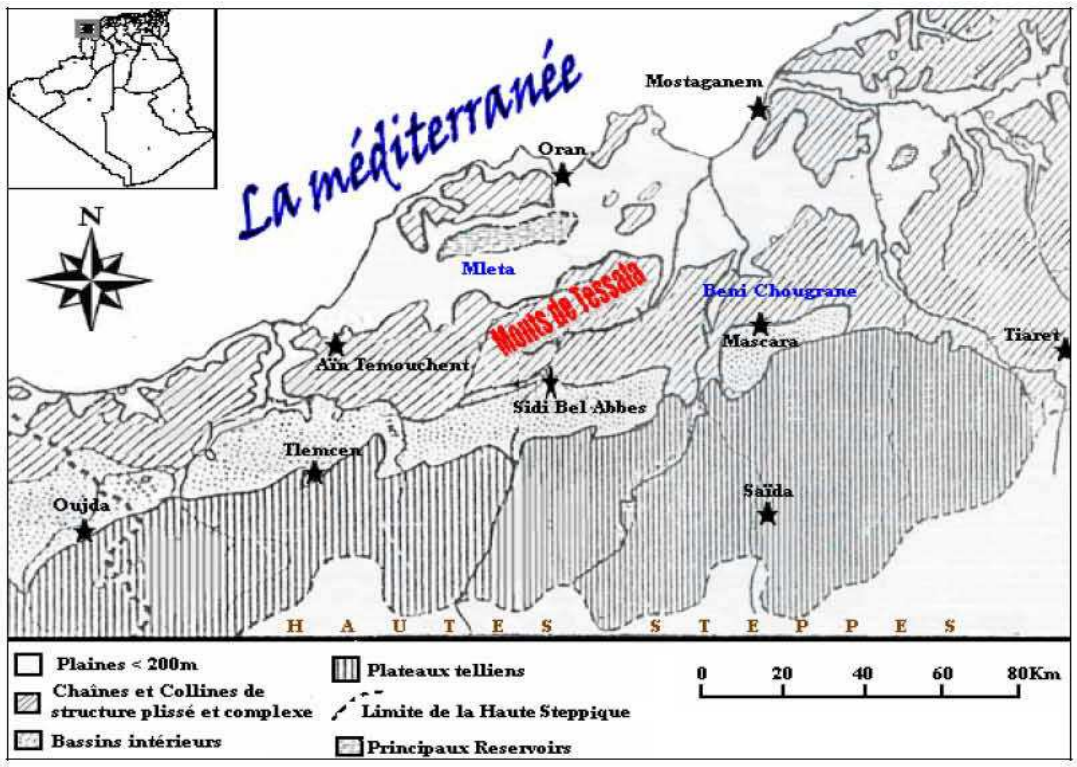


Figure 22 : Localisation géographique des monts du Tessala

(Kikken, 1962 ; Bouzidi et *al.*, 2009).

I.2.2. Présentation et identification de la plante

L'identification botanique de l'espèce a été faite par Monsieur MAHDADI Zouheir, Professeur au département de l'environnement, Université Djilali LIABÈS, Sidi Bel-Abbés, Algérie. Le matériel végétal fraîchement collecté, est séché à l'ombre pendant 2 à 3 semaines. Les feuilles, tiges et fleurs sont pulvérisées au broyeur du type MF 10 BASIC IKAWERKE afin d'obtenir une poudre végétale fine. Les poudres végétales ainsi récupérées, sont ensuite soumises à différentes extractions.

I.3.Méthodes d'extraction

Deux méthodes d'extraction des polyphénols ont été utilisées à savoir, la macération et la décoction, en employant quatre solvants d'extraction ((Méthanol / eau (70/30) ; éthanol / eau (70/30 : v/v) ; acétone /eau (70 /30 : v/v) et l'eau distillée).

I.3.1. Extraction par macération

La préparation des extraits par macération est réalisée suivant le protocole décrit par **Romani et *al*., (1995) & Mahmoudi et *al.,* (2013)** : 10 g de poudre du matériel végétal est soumis à une extraction par macération dans un volume de 100 ml du solvant (méthanol : 70% ; éthanol : 70% ; acétone : 70% et l'eau distillée) à température ambiante durant deux heures et demi sous agitation magnétique, et à l'abri de la lumière, avec renouvellement du solvant (toutes les 2,5 heures). Les macéras sont réunis puis filtrés. Les filtrats sont ensuite évaporés grâce à un évaporateur rotatif à 50°C pour obtenir des extraits secs.

I.3.2. Extraction par décoction

La préparation des extraits par décoction est effectuée selon le protocole décrit par **Chavane et *al*., (2001)** en y apportant quelques modifications : la matière végétale, sèche et broyée à raison de 1 g, est mise en contact avec 10 ml de solvants de polarité croissante à savoir l'éthanol (polarité de 5.2), l'acétone (polarité de 5.4), le méthanol (polarité de 6.6) et l'eau (polarité de 9.0). Les trois premiers solvants sont additionnés de 30% d'eau distillée. La préparation est portée sous reflux et à chaud (100°C) pendant 30 minutes, répétée deux fois afin d'épuiser le maximum de contenu en composés phénoliques solubles de l'échantillon.
Les extraits sont récupérés et filtrés. Les décoctés ainsi obtenus sont concentrés au rota vapeur à une température de 50°C, puis conservés à 4°C.

I.4. Calcul des rendements d'extraction

Le rendement **(Rd)** en pourcentage des différents extraits obtenus, est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait sec obtenue après évaporation et celle de la matière végétale sèche soumise à l'extraction **(Harborne, 1980).** Il est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{Rd\ \% = [P_1\text{-}P_2/P_3] \times 100}$$

P_1 : Poids du ballon après évaporation.

P_2 : Poids du ballon vide.

P_3 : Poids de la matière végétale sèche de départ.

I.5. Étude qualitative et quantitative des différents extraits obtenus

I.5. 1. Analyse qualitative

Le screening phytochimique consiste à déterminer les différentes classes des métabolites secondaires et ceci par des réactions de caractérisation qualitative décrite dans la littérature **(Badiaga, 2012).**

Les résultats sont classés en **:**

1- Réaction très positive (+++).
2- Réaction positive (++).
3- Réaction moyennement positive (+).
4- Réaction douteuse (+-).
5- Réaction négative (–).

I.5. 1. 1. Mise en évidence des flavonoïdes

5 ml d'extrait est traité avec 1 ml d'HCl concentré, quelque tournure de magnésium et 1 ml d'alcool iso- amylique. L'apparition d'une couleur rose ou rouge qui se développe après 3 minutes indique la présence des flavonoïdes **(Ciulel, 1982 ; Békro et *al*., 2007).**

I.5.1.2. Mise en évidence des tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant 1 ml de l'extrait à 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution de $FeCl_3$ à 1%**.** L'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence des tanins catéchiques ; s'il se développe une coloration bleue –noire, ceci indique la présence des tanins galliques **(Trease & Evans, 1989).**

I.5.1.3. Mise en évidence des saponines

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse, leur détection est réalisée en ajoutant 1 ml de l'extrait à 2 ml d'eau distillée, puis la solution est agitée fortement pendant 2 min. Le mélange est ensuite abandonné pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieur 1cm indique la présence des saponosides **(Bruneton, 1999).**

I.5.1.4. Mise en évidence des anthraquinones

Leur détection est réalisée en ajoutant 1 ml de chaque extrait à 0.5 ml de NH_4OH à 10 % sous agitation. La présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse à une couleur violette **(Kehrer, 1993).**

I.5.1.5. Alcaloïdes

La caractérisation des alcaloïdes est effectuée à partir des réactifs de Bouchardat (réactif iodo-ioduré), de Dragendorff (réactif de l'iodo-bismuthate de potassium) et réactif de Mayer (tétra-iodomercurate de potassium) (Annexe II). 3ml de chaque extrait est réparti dans 3 tubes à essai. Dans le premier tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactif de Dragendorff. Dans le deuxième tube, sont ajoutées 2 gouttes de réactif de Bouchardat et dans le troisième 2 gouttes de réactif de Mayer. L'apparition d'un précipité brun-rougeâtre, rouge-orangé et blanc-jaunâtre respectivement dans les tubes, indique une réaction positive **(Guessan et *al*., 2009 ; Yusuf et *al.,* 2013).**

I.5.1.6. Détection des glycosides cardiotoniques (Keller- Killiani)

La détection des glycosides cardiotoniques est réalisée par le test de Keller-Killiani : 5 ml d'extraits sont mélangés avec 2 ml d'acide acétique glacial contenant une goutte de chlorure ferrique. Le mélange est soigneusement ajouté à 1 ml de H_2SO_4 concentré. L'apparition d'un anneau marron, indique la présence du glycoside cardiotonique (**Trease et *al*., 1989, Khandelwal, 2008).**

I.5.1.7. Stérols et triterpènes (Liebermann Burchard)

Dans un tube à essai, 5 ml de la solution à tester sont mélangés à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau brun à la zone de contact des deux liquides avec une couche surnageante verte ou violette indique la présence de stéroïdes et de triterpènes **(Harbone, 2012).**

I.6.Analyse quantitative

I.6.1. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des différents extraits obtenus à partir des différentes parties de *Silybum marianum* a été réalisée par l'utilisation du réactif Folin-Ciocalteu, qui est un mélange de complexes de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune.

- **Principe**

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène(Mo_8O_{23}) -tungstène (W_8O_{23}) de couleur bleue qui possède une absorption maximale à 750 nm. L'intensité de la

coloration produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits analysés **(Boizot & Charpentier, 2006).**

- **Mode opératoire**

Le dosage de polyphénols totaux (PT) est effectué par la comparaison de la densité optique (D.O) observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

Ce dosage est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et *al.,* (2006)** : Un volume de 100 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations est introduit dans des tubes à essai contenant 2 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% fraîchement préparée. Après agitation au vortex et repos 5 min, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu sont additionnés au milieu réactionnel. L'absorbance est mesurée à 750 nm, après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité.

Une courbe standard d'étalonnage est établie en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations de (0 à 400 µg /ml). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/ g MS).

I.6.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de *Silybum marianum* est réalisé selon une méthode spectrophotométrique décrite par **Dewanto et *al*., (2002)**, par l'utilisation de réactifs qui sont des solutions incolores de nitrite de sodium ($NaNO_2$) et de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$).

- **Principe**

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, $AlCl_3$ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes **(Chaouch, 2014).** La réaction entraîne la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec un étalon de catéchine de concentration connue.

- **Mode opératoire**

À 250 µl d'extrait dilué on ajoute 75 µl d'une solution de $NaNO_2$ à 7%. Le mélange laissé au repos à température ambiante pendant 6 min est complété de 150 µl d'une solution d'$AlCl_3$ à 10% fraîchement préparée. Après un repos de 5 min, 500 µl de soude (NaOH, 1M) sont additionnés au mélange, le volume final est ajusté à 2500 µl avec de l'eau distillée, puis agités au vortex pendant 10 secondes. L'absorbance est lue au spectrophotomètre UV-VIS à une longueur d'onde de 510 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires avec un standard, la catéchine à des concentrations de 0 à 800 µg/ml. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligramme équivalent catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EC /g MS).

I.6.3. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode colorimétrique de Folin de Dénis, décrite par **Bajaj &Devsharma, 1977**.

- **Principe**

Le principe de ce dosage est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin. Un complexe chromophore bleu à 760 nm révèle la présence de tanins. L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la teneur en tanins présents dans les extraits analysés.

- **Mode opératoire**

Au mélange, extrait (1ml) eau distillée (75 ml), sont ajoutés 5 ml de réactif de Folin de Dénis et 10 ml de la solution saturée de CO_3Na_2. Le tout est agité au vortex. Après homogénéisation, le mélange est mis à l'obscurité et température ambiante pendant 30 min. L'absorbance du mélange est lue au spectrophotomètre UV-VIS à 760 nm.
Les teneurs en tanins condensés sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide tannique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAT/g MS).

Les teneurs en tanins condensés sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide tannique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAT/g MS).

I.7. Détermination de l'activité antioxydante

De nombreuses méthodes sont utilisées pour évaluer in vitro l'activité antioxydante**.** Pour notre étude, nous avons utilisé deux tests chimiques à savoir :

- La détermination de la capacité antioxydante totale (CAT) ;
- Le piégeage du radical 2,2diphényl1-1-picryl-hydrazyl (DPPH).

I.7.1. Capacité antioxydant totale

- **Principe**

La capacité antioxydante totale (TAC) d'un composé donné ou d'un extrait végétal a pour but la détermination quantitative de la capacité antioxydante. Elle est évaluée à l'aide d'une méthode spectroscopique qui conduit à la formation d'un complexe phosphomolybdène. Cette méthode est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène $Mo(V)MoO^{2+}$ en présence de l'extrait de plante pour former un complexe vert (phosphate/Mo^{5+}) à pH acide **(Prieto et *al*., 1999).**

- **Mode opératoire**

Le réactif au phosphomolybdate est composé d'un mélange d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Un volume de 3 ml de solution du réactif est combiné dans un tube avec 0.3 ml d'extrait. Après 90 min d'incubation à 95°C (auto-oxydation par la chaleur) puis repos de 6 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait.

L'activité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

I.7.2. Piégeage de radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)

Le radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) très stable est largement utilisé pour déterminer directement et rapidement l'effet antioxydant des composés phénoliques **(Shahidi, 1997 ; Hüseyin et *al*., 2011).**

- **Principe**

L'activité antioxydante est déterminée par spectrométrie UV- Visible en mesurant la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de $DPPH^{\cdot}$ à 515 nm.

En présence des piégeurs de radicaux libres, le radical stable DPPH• (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Figure 23) de couleur violette est réduit sous forme non radicalaire DPPH-H (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine) de couleur jaune par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présents dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire **(Maataoui *et al.*, 2006)**.

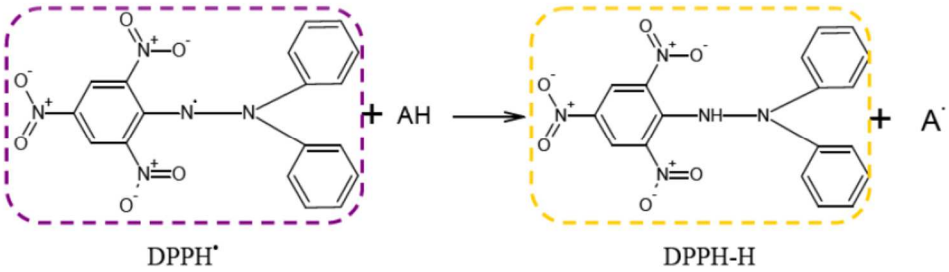


Figure 23 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant **(AH)** (**Michel, 2011).**

- **Mode opératoire**

Le protocole expérimental suivi est celui de **Sanchez-Moreno et *al.*, (1998)**. Une prise d'essai de 50 µl de différentes concentrations préparées dans le méthanol à raison géométrique de deux de chaque extrait est additionnée à 1950 µl de la solution méthanolique de DPPH (0.0025 g de DPPH dans 100 ml de méthanol) fraîchement préparée.

Un contrôle négatif est préparé, en parallèle, 50 µl du méthanol est mélangé avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 515 nm. L'antioxydant de synthèse utilisé est l'acide ascorbique (le contrôle positif).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange **(Liangli, 2008),** selon l'équation suivante :

$$\mathbf{PI = (D.O\ témoin - D.O\ extrait\ /\ D.O\ témoin) \times 100}$$

PI : pourcentage d'inhibition.

D.O témoin : absorbance du témoin négatif.

D.O extrait : absorbance de l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC_{50}). Une faible valeur de CI_{50} correspondant à une grande efficacité de l'extrait **(Chaouch, 2014).**

I.8. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des différents extraits végétaux est réalisée en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide, appelée méthode des disques selon le Comité National des Normes du Laboratoire Cliniques **(NCCLS, 2001).** Cette méthode permet de montrer l'existence ou non d'action antibactérienne des produits à tester.

I.8.1. Préparation des différentes dilutions des extraits

Les extraits étudiés ont été dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO), un solvant dépourvu d'effet antimicrobien. Ainsi, nous obtenons pour les différents extraits, une solution mère à une concentration de 200 mg/ml. Les solutions mères sont diluées suivant un gradient de concentrations décroissantes de raison géométrique deux (2) dans le DMSO afin d'avoir pour chaque extrait une gamme de solutions ayant différentes concentrations. Ces dernières sont utilisées pour déterminer leurs activités antibactériennes.

I.8.2. Description des souches bactériennes

Les souches de références du Laboratoire (American Type Culture Collection), proviennent du Laboratoire National De Contrôle Des Produits Pharmaceutiques fournis par l'Institut Pasteur d'Algérie (Tableau 05).

Tableau 05 : Description et pouvoir pathogène des souches testées.

Microorganismes (Bactéries)	Espèces	Références	Pouvoir pathogène
Bacille Gram +	*Bacillus subtilis*	ATCC 6633	Intoxication alimentaire
Cocci Gram +	*Micrococcus luteus*	ATCC 10240	Infections nosocomiale
	Staphylococcus aureus	ATCC 6538	Intoxication alimentaire, infections nosocomiale
Bacille Gram –	*Salmonella abony*	ATCC 6017	Toxi-infection alimentaire
	Escherichia coli	ATCC 8739	Gastro-entérite et infection urinaire
	Bordetella branchiseptica	ATCC 4617	Infections respiratoires
	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027	Infections nosocomiale, pulmonaires.

ATCC: American Type Culture Collection.

I.8.3. Préparation des inoculums bactériens

Afin de vérifier leur pureté, les différentes souches bactériennes sont repiquées par la méthode des stries sur gélose Mueller Hinton (Annexe II) ; puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures, afin d'obtenir des cultures fraîches et des colonies isolées pouvant servir à la préparation de l'inoculum. Une ansée de colonie est mise en suspension dans 2.5 ml de bouillon Mueller-Hinton. La suspension bactérienne est bien homogénéisée. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 McFarland ce qui correspond à 1-2 × 10^8 UFC/ml (D.O = 0.08 à 0.1 à une longueur d'onde de 625 nm), **(NCCLS, 2001).**

I.8.4. Ensemencement et dépôt des disques

L'inoculum est ensemencé par écouvillonnage sur boîtes de Pétri stériles contenant la gélose Mueller-Hinton (stériles et refroidis à 45-50°C).

Les disques en papier Whatman (6 mm de diamètre) imprégnés de 10 µl d'extrait à différentes concentrations sont placés délicatement sur la gélose inoculée des microorganismes testés. Les boîtes de Pétri sont conservées à 4°C pendant 2 h puis incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour du disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance **(Pibiri, 2005).**

De même, les antibiogrammes réalisés avec des disques contenants des antibiotiques (témoin positif) standards à savoir : érythromycine (15µg) et gentamycine (15µg), prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif).

Lecture et expression des résultats

La lecture des antibiogrammes est faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

Tableau 06 : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D) **(Chaouche, 2014).**

Inhibition	**Transcription**	**Sensibilité**
D < 8 mm	(-)	Résistante
9 ≥ D≤ 14 mm	(+)	Sensible
15 ≥ D ≤19 mm	(++)	Très sensible
D ≥ 20 mm	(+++)	Extrêmement sensible

I.8.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide

L'ensemble des extraits bruts des différentes parties de *Silybum marianum* a fait l'objet d'une deuxième étude qui a porté sur l'évaluation de leur activité antibactérienne par le biais de la méthode des dilutions sur milieu solide ou CMI en milieu solide. Cette méthode consiste en l'ensemencement de gélose contenant des concentrations décroissantes en extrait. On recherche la plus faible concentration pour laquelle il y a inhibition macroscopique de la croissance bactérienne. La lecture de la CMI est effectuée à l'œil nu. La concentration inhibitrice à considérer est la concentration minimale d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est détectée **(Jorgensen et *al*., 1997).**

L'activité inhibitrice des extraits a été identifiée dans une plage de concentration de 6.25 à 200 mg/ml.

I.9. Séparation des composés phénoliques par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée

I.9.1. Principe

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée, combinée à la détection électronique ou à la spectroscopie ultraviolette et visible est sans doute la méthode la plus utilisée pour la séparation, la quantification et l'identification des composés phénoliques **(Merken &Beecher ,2000 ; Mattila & Kumpulainen ,2002 ; Ignat *et al*., 2011).**

Elle ne demande qu'une faible quantité d'échantillon végétal. Elle permet en outre de combiner en une seule opération rapide et reproductible les analyses qualitatives et quantitatives d'un extrait phénolique complexe, ce qui permet l'étude de matériaux végétaux très variés **(Pietta *et al.,* 2003 ; Sakakibara *et al.,* 2003**).

Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées, du solvant d'élution et des composés phénoliques concernés, en particulier leur degré d'hydroxylation, de glycosylation et de méthylation **(Macheix *et al.*, 2005).**

Les extraits des feuilles et des tiges (hydro-acétonique et hydro-éthanolique obtenue par macération et décoction respectivement) ainsi que les extraits des fleurs (hydro-méthanolique obtenue par macération et décoction) ont été sélectionnés pour l'analyse chromatographique par HPLC**,** vu leur richesse en composés phénoliques et leurs activités antioxydantes élevées.

I.9.2. Description du système RP-HPLC utilisé

L'appareillage de chromatographie de marque Shimadzu-system (Figure 24) est muni d'une colonne chromatographique composée d'un gel de silice greffé de groupement organiques apolaires octadécyle C18, du type Ascentis Express C18 column, de 15 cm de longueur, 4.6 mm de diamètre interne et de 2.7µm de diamètre de particules (Supelco, Bellefonte, PA, USA) contenant la phase stationnaire apolaire (phase inverse). C'est une phase inversée, dans ce cas, on parle de la chromatographie liquide à haute performance en phase inversée (RP-CLHP), thermostaté

e à 35°C, d'une pompe (Prominence I. LC-2030C 3D) et d'un contrôleur de gradient auxquels sont connectés un injecteur manuel et un détecteur UV- visible.

Les solvants utilisés pour l'élution sont : le solvant A qui est constitué de l'eau acidifiée avec acide acétique à pH=3 et solvant B qui est le méthanol toujours acidifié avec acide acétique à pH=3.

L'élution est effectuée en mode gradient avec un débit de 0.8 ml /min et le volume d'injection de 5µL d'extrait concentré (100 mg/ml). La détection a été effectuée par un détecteur UV-visible à une longueur d'onde de 280 nm. La durée totale de séparation est de 60 min.

Au niveau du détecteur, chaque composé du mélange sortant de la colonne est détecté, donnant ainsi un signal qui est enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic.

L'identification par analyse en HPLC se fait par la comparaison des temps de rétention et des caractéristiques spectrales des pics avec ceux des standards. Il est également possible de faire l'identification des temps de rétention en se référant à la littérature qui peut-être comparée à ceux obtenus dans des travaux antérieurs avec les mêmes conditions d'analyse.

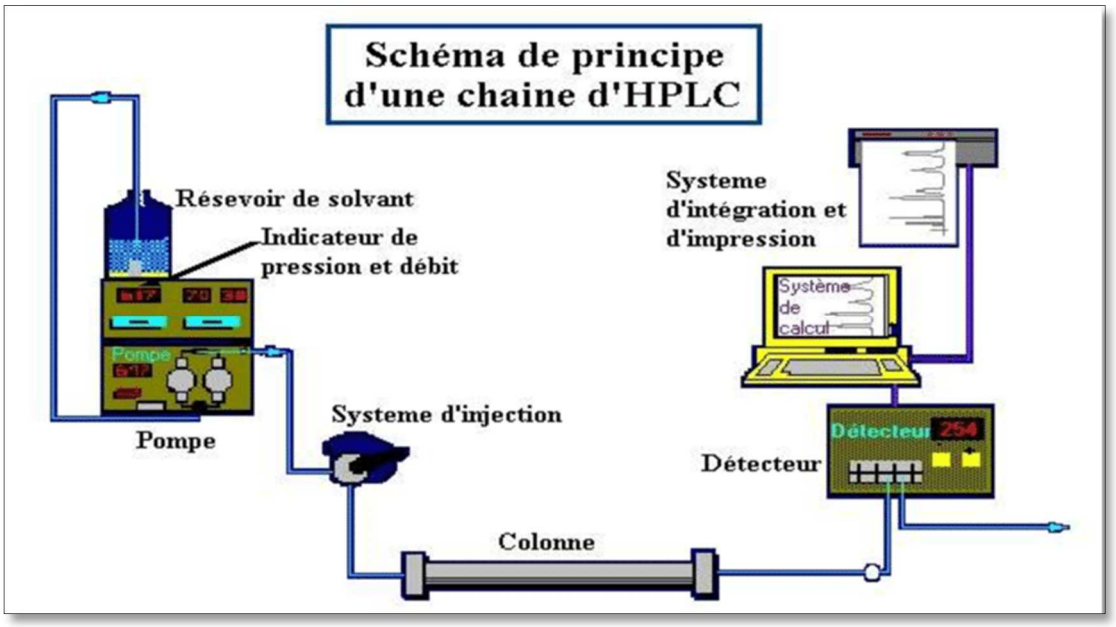


Figure 24 : Principe de fonctionnement de l'HPLC **(Hachoumi, 2013).**

I.10. Analyses statistiques

Les données expérimentales des dosages des taux en polyphénols totaux, en flavonoïdes, en tanins et l'évaluation de l'activité antioxydante sont des analyses effectuées en triplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type.

Le coefficient de corrélation des propriétés antioxydantes a été déterminé en utilisant l'Excel 2017.

Les analyses statistiques ANOVA ont été effectuées par l'Excel 2003. L'analyse de la variance a été appliquée pour déterminer la différence significative à $p < 0,05$.

Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

L'extraction des différents composés phénoliques de *Silybum marianum* a permis d'obtenir 24 extraits en fonction du type du solvant (eau distillée, méthanol : 70%, acétone : 70%, et éthanol : 70%), du mode d'extraction (macération, décoction) et de la partie de la plante étudiée. Le rendement de chaque extrait est exprimé en pourcentage pour 100 g de matériel végétal sec et broyé.

Les rendements d'extraction varient considérablement, ils sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Rendements d'extraction des différentes parties de *Silybum marianum* par macération et décoction (moyenne+ écart type).

Parties de la plante	**Solvants d'extraction**	**Rendement (Rd) (%)**	
		Macération	**Décoction**
Feuilles	Eau	24.71 ± 4.68	24.65 ± 10.77
	Méthanol	22.03 ± 4.79	24.45 ± 6.81
	Acétone	15.43 ± 0.44	19.19 ± 4.57
	Éthanol	19.92 ± 1.40	12.13 ± 5.89
Tiges	Eau	21.75 ±7.58	20.12 ± 3.70
	Méthanol	16.28 ±1.85	18.08 ± 2.98
	Acétone	11.46 ±3.31	21.44 ± 4.09
	Éthanol	13.33 ± 2.40	19.59 ± 4.86
Fleurs	Eau	08.96 ± 4.07	16.72 ± 2.75
	Méthanol	06.95 ± 4.40	19.89 ± 8.75
	Acétone	10.25 ± 4.11	20.84 ± 3.28
	Éthanol	08.70 ± 2.87	9.94 ± 2.99

Les résultats révèlent que le rendement d'extraction diffère selon la méthode, le solvant d'extraction et la partie de la plante utilisée. En effet, dans le cas de la macération (Figure 25), l'eau s'avère le meilleur solvant d'extraction avec une moyenne de 18.47 % sur trois

échantillons (feuille, tige et fleur) et dans un moindre degré le méthanol (15.08% en moyenne), l'éthanol (13.98% en moyenne) et enfin l'acétone (12.38% en moyenne).

Pour les feuilles et la tige de la plante, les extractions par macération montrent que les extraits aqueux présentent respectivement les rendements les plus élevés (24.71% et 21.75%). Les rendements les plus faibles sont obtenus avec les extraits hydro-acétoniques, respectivement dans un ordre de 15.43 % et 11.46%.

Pour les fleurs, l'extrait hydro-acétonique obtenu par macération présente le rendement le plus élevé (10.25%). L'extrait hydro-méthanolique présente un pourcentage de rendement plus faible (06.95%).

Par macération, les feuilles de *Silybum marianum* donnent le rendement d'extraction le plus important (20.52%), suivi par la tige soit 15.72 % en moyenne. Les fleurs par contre, offrent le rendement d'extraction le plus faible a raison de 8.72% en moyenne.

Salem et *al.*, (2016) ont vérifié que les extraits méthanoliques par macération présentent des rendements d'extraction avec une valeur de 11% pour les feuilles et de 7% pour les fleurs et les tiges. Tandis que le plus faible rendement a été enregistré avec les extraits acétoniques dans différents organes (feuilles, tiges et fleurs) dont les valeurs ne dépassent pas 2 %.

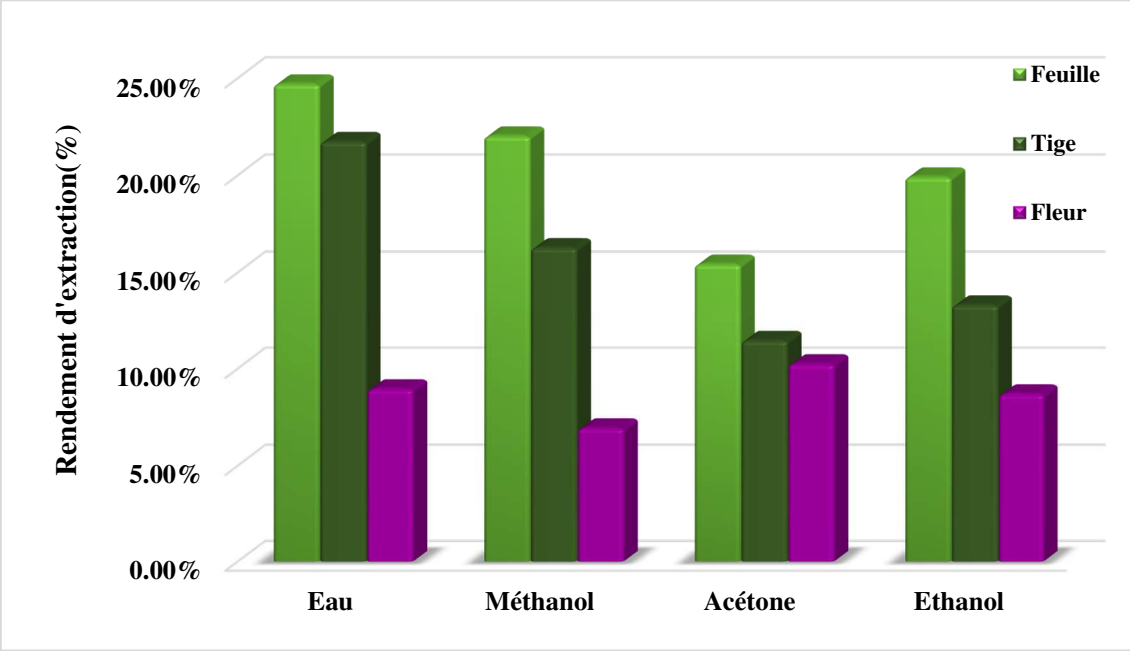


Figure 25 : Rendements d'extraction de différentes parties de *Silybum marianum* par macération.

Concernant la décoction, les résultats des rendements d'extraction illustrés dans la figure 26, montre que le méthanol donne le meilleur rendement d'extraction soit une moyenne de 20,81 % sur trois parties étudiées (feuille, tige, et fleur), contrairement à l'éthanol, dont le rendement est plus faible (13,89 % en moyenne).

Les feuilles présentent le rendement le plus élevé à savoir 20.11% suivi par la tige et les fleurs à raison de 19.81 et 15.85% en moyenne.

Pour les feuilles, les extractions par décoction montrent que l'extrait aqueux présente le rendement le plus élevé (24.65%) et l'extrait hydroéthanolique présente le plus faible rendement (12.13%). Par contre, pour la tige et les fleurs les rendements d'extraction par décoction montrent que les extraits hydro-acétoniques et aqueux présentent respectivement les rendements les plus élevés (21.44 % et 20.84 %). L'extrait hydroéthanolique représente le plus faible rendement (9.94 %) pour les fleurs, les autres extraits de tiges présentent des valeurs très rapprochées.

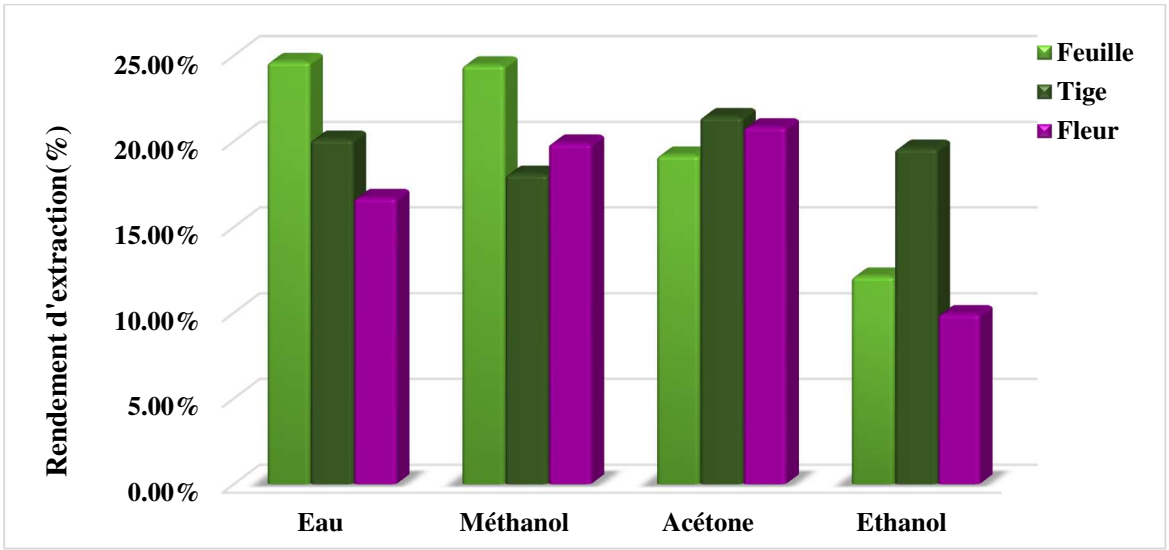


Figure 26 : Rendements d'extraction de différentes parties de *Silybum marianum* par décoction.

Les meilleurs rendements d'extraction des deux méthodes utilisées sont enregistrés pour la décoction soit une moyenne de 18.92 % devant 14,98 % pour la macération. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Mahmoudi et *al.*, (2013).** La décoction reste efficace pour l'extraction des composés phénoliques car c'est une opération qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles **(Leybros & Frémeaux, 1990)**. Toutefois, cela n'empêche pas que la macération soit une des méthodes d'extraction la plus simple et la

plus utilisée pour la détermination du contenu des plantes médicinales en métabolites secondaires **(Chaouch, 2013).**

Dans notre cas, les meilleures moyennes de rendements d'extraction par différents solvants sont pour les extraits aqueux (16.10% en moyenne) suivie par les extraits hydro-méthanoliques (13.05%en moyenne) puis par les extraits hydro-éthanoliques et les extraits hydro-acétoniques qui sont très proches (12.66 et 11.85 % en moyenne). Dans ce contexte, nos résultats sont en accord avec ceux de **Lehout et *al*., (2015)** qui montrent que le rendement le plus élevé à partir de la plante médicinale Artemisia *herba* a été obtenu par la méthode d'extraction à l'eau chaude.

Plusieurs travaux montrent que les rendements sont plus élevés pour l'extrait aqueux que l'hydro-méthanolique **(Bonnaillie et *al*., 2012)**. Cela peut s'expliquer par le fait que l'eau est un solvant fortement polaire connu pour extraire une large gamme de molécules dont une quantité importante de composés non phénoliques. En effet, l'eau est le solvant universel utilisé pour l'extraction **(Scalbert, 1992 ; Cowan, 1999).**

Selon **Békro et *al.,* (2007)**, les substances solubles dans l'eau sont présentes en quantité importante. Elles sont l'une des causes essentielles de l'augmentation du rendement correspondant à la méthode d'extraction à l'eau chaude ou par décoction. Ces substances peuvent être de nature protéique ou glucidiques. Il a été démontré que l'extraction par solvants à température élevée permet d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs qu'à température ambiante et aussi plus élevés pour les extraits aqueux que méthanolique **(Majhenic et *al*., 2007).**

Le rendement d'extraction varie non seulement d'une plante à une autre de la même famille. La diversité structurale de chaque plante est aussi responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols **(Koffi et *al*., 2010 ; Mahmoudi et *al.,* 2013).**

Le rendement de l'extraction varie également en fonction de l'espèce végétale, des propriétés génétiques des plantes, de l'organe utilisé dans l'extraction, des conditions, de la durée de séchage ainsi que de la période de récolte **(Mohammedi, 2013 ; Chaouch, 2013).**

Selon **Perva-Uzunalic et *al.* (2006), Penchev (2010) et Michel (2011)**, le rendement d'extraction varie en fonction de plusieurs paramètres, tels que les paramètres de l'extraction

solide- liquide des polyphénols, la nature du solvant et de sa polarité, la température, le temps de contact du matériel végétal avec le solvant d'extraction ainsi que la diminution de la taille des particules pour augmenter le coefficient de diffusion du solvant et le degré d'agitation.

Selon **Albu et *al.,* (2004),** le choix d'un solvant d'extraction dépend de plusieurs paramètres incluant sa polarité et sa nature chimique, la composition des extraits et les propriétés physiques de ces composés tels que la densité et la viscosité qui, à leur tour, peuvent influer sur la diffusion et le taux d'extraction. En effet, l'eau est le solvant universel utilisé pour les extractions **(Scalbert ,1992 ; Cowan, 1999).** Les solvants alcooliques aqueux notamment l'acétone, l'éthanol, et le méthanol sont les plus couramment utilisés dans l'extraction des composés phénoliques à partir des espèces végétales **(Naczk &Shahid, 2004).**

Plusieurs travaux antérieurs ont montré que le rendement d'extraction augmente de manière significative avec l'utilisation d'éthanol aqueux ou de méthanol aqueux par rapport à des extractions aux solvants organiques purs **(Vazquez et *al*., 2008 ; Mussatto et *al*., 2011).** Plus précisément, l'addition d'eau aux solvants polaires améliore l'extraction des composés phénoliques en particulier à l'éthanol, au méthanol ou à l'acétone **(Trabelsi et *al.,* 2010)**. Ce comportement peut-être expliqué par le fait que la présence de l'eau déstabilise les parois cellulaires. Par conséquent, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer en contact avec une quantité plus grande de soluté, favorisant ainsi l'extraction **(Penchev et *al.,* 2010).**

II.2. Analyse phytochimique qualitative et quantitative

II.2.1. Analyse qualitative

Le screening phytochimique effectué a pour objectif la mise en évidence de familles de composés phénoliques existant dans les extraits. Les résultats de ce criblage phytochimique sont reportés dans le tableau 08**.** Il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires.

Tableau 08 : Résultats de la phytochimie qualitative des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* par macération et décoction.

Partie de la plante	Extraits	Composés phénoliques caractérisés						
		FLV	**Tn**	**SAP**	**ANTHR**	**ALCA**	**STÉR et TRITE**	**GLUC CARDIO**
Feuille (Fe)	Fe Aq M	+++	++	-	+-	++	++	+++
	Fe MeTH M	+++	+++	-	+-	++	++	+++
	Fe Ac M	++	+++	-	+-	++	+-	+++
	Fe ETOH M	+++	+++	-	+-	++	+	+++
	Fe Aq D	+++	++	-	-	++	+++	+++
	Fe MeTH D	+++	+++	-	-	++	+++	+++
	Fe Ac D	+	+++	-	-	++	-	+++
	Fe ETOH D	+	+++	-	-	++	++	+++
Tige (T)	T Aq M	+++	++	-	-	++	+	+++
	T MeTH M	+++	+++	-	-	++	+	+++
	T Ac M	++	++	-	-	++	-	+++
	T ETOH M	++	+++	-	-	++	+	+++
	T Aq D	+++	+++	-	+-	++	++	+++
	T MeTH D	+	+++	-	+-	++	++	+++
	T Ac D	++	+++	-	+-	++	-	+++
	T ETOH D	+	++	-	+-	++	+++	+++
Fleurs (Fr)	Fr Aq M	++	++	-	-	++	+	+++
	Fr MeTH M	+++	+++	-	-	++	+	+++
	Fr Ac M	++	+++	-	-	++	+	+++
	Fr ETOH M	++	+++	-	--	++	+	+++
	Fr Aq D	++	++	-	-	++	+++	+++
	Fr MeTH D	+++	+++	-	-	++	+++	+++
	Fr Ac D	++	+++	-	-	++	++	+++
	Fr ETOH D	++	++	-	-	++	+++	+++

- **FLV** : Flavonoïdes, **Tn** : Tanins, **SAP** : Saponosides, **ANT** : Anthraquinone, **ALCA :** Alcaloïdes, **STÉR et TRITE** : Stérols et triterpènes, **GLUC CARDIO** : Glucosides cardiotoniques.
- **(+++) :** Réaction très positive, **(++) :** Réaction positive ; **(+) :** Réaction moyennement positive ;**(+-) :** Réaction douteuse **; (-) :** Réaction négative.

Les résultats phytochimiques préliminaires réalisés sur les extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenus par macération et décoction, a révélé la présence de cinq groupes de composés bioactifs dans tous les extraits : la présence remarquable des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des stérols, des triterpènes, et des glucosides cardiotoniques. Seuls les flavonoïdes sont présents en faible quantité (une réaction moyennement positive) dans l'extrait hydroacétonique et hydroéthanolique des feuilles et dans l'extrait hydro-méthanolique et hydroéthanolique des tiges obtenus par décoction. On note aussi une réaction douteuse pour les anthraquinones dans les différents extraits de feuilles par macération et les extraits de tiges par décoction ainsi qu'une réaction négative pour le reste des extraits. Cependant, dans les différents extraits, nous observons une absence totale de saponosides.
Les travaux de **Syed Muhammad et *al*., (2011)**, montrent que les fleurs de *Silybum marianum* sont riches en flavonoïdes, en phénols et en tanins, alors que les saponines et les alcaloïdes n'ont pas été détectés.

Shah et son équipe **(2011)** ont rapporté la présence de flavonoïdes, de phénols et de tanins au cours d'une analyse qualitative de l'extrait aqueux de cette plante.

John & Koperuncholan (2012) ont analysé les extraits hydro-éthanoliques des feuilles. Ils signalent la présence d'acides aminés, de sucres et de tanins et l'absence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des phénols, des saponines et des stéroïdes.

L'analyse qualitative de l'extrait hydroéthanolique obtenu à partir des graines de *Silybum marianum*, révèlent la présence des différents groupes de substances bioactives telles que les flavonoïdes, phénols, terpènes, tanins, et les glucosides. Un résultat négatif indique l'absence des saponosides, anthraquinone et les alcaloïdes **(Al Atraqchi & Al Shaikh, 2014).**

Une analyse faite par **Puri** et ses collaborateurs en **2015**, sur les extraits hydro-éthanoliques et aqueux de la plante de *Silybum marianum* obtenue par macération et Soxhlet, rapporte la présence de flavonoïdes, de tanins, de stérols, de triterpènes, de glucosides cardiotoniques et d'alcaloïdes qui restent absents dans l'extrait aqueux. Ces mêmes travaux affirment l'absence de saponosides dans les mêmes extraits.

Le travail mené par **Akhtar** et son équipe sur 61 espèces collectées au Pakistan **(2015)** montrent que les résultats du screening chimique effectué sur l'extrait aqueux obtenu par macération des parties aériennes de la plante *Silybum*, montrent la présence de tanins et d'alcaloïdes et l'absence des terpènes, des glucosides, des saponines et des coumarines.

Les résultats précités, prouvent que la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires varie selon les parties de la plante. Pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités dépendent aussi de la teneur de la substance ou des substances biologiquement actives **(Mohammedi, 2013).** L'ensemble des groupes chimiques ainsi identifiés, ont des propriétés pharmacologiques remarquables **(Ouedraogo, 2001).** Le potentiel d'une plante médicinale est attribué à l'action de ses constituants phytochimiques qui pourraient justifier ses multiples indications thérapeutiques **(Konkon et *al*., 2006).**

II.2.2. Analyse quantitative de composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules bioactives qui font l'objet de nombreux travaux puisqu'ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies et sont largement recherchés pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, etc.).

Afin de caractériser quantitativement les extraits préparés à partir des différentes parties étudiées de *Silybum marianum*, des dosages de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins ont été effectués par des méthodes spectrophotométriques, en se référant à des équations de régression linéaire des courbes d'étalonnage.

II.2.2.1. Courbes d'étalonnages

1) Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE /g MS), en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique ($y = 0.0011 x - 0.0151$), avec un coefficient de détermination ($R^2 = 0.9845$) (Figure 27).

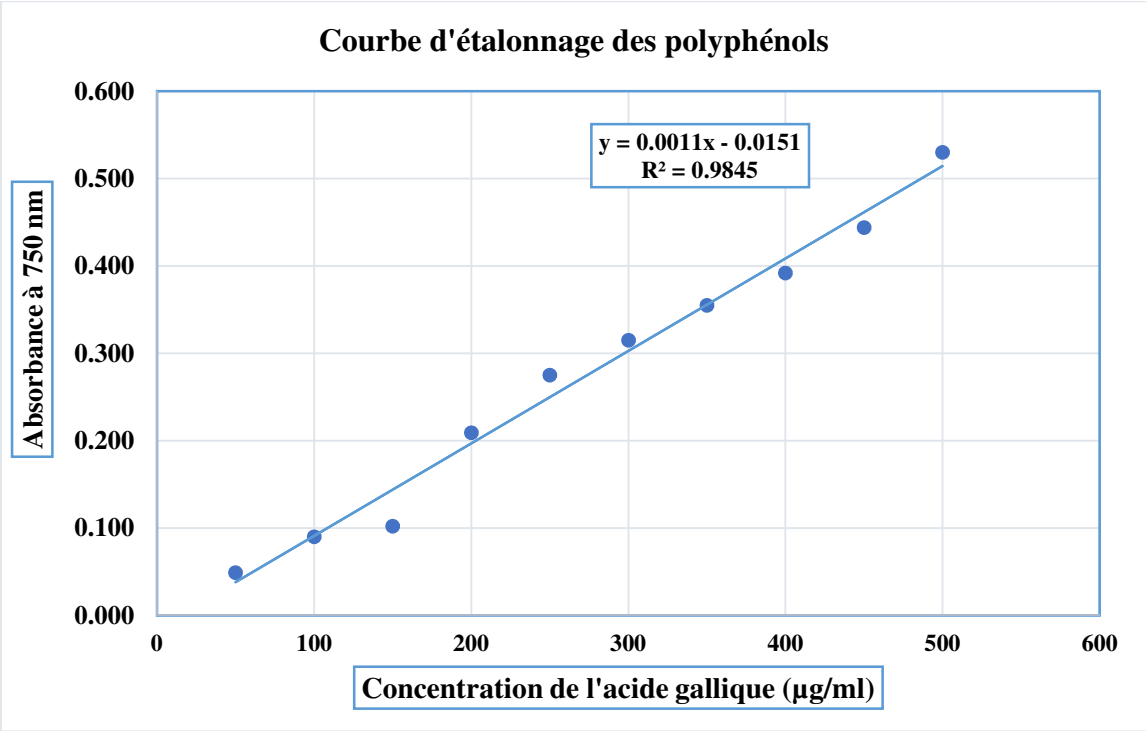


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

2) Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

Les résultats obtenus pour le dosage des flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EC/g MS) en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la catéchine (y= 0.0024 *x* + 0.2213), avec (R^2 = 0.9806) (Figure 28).

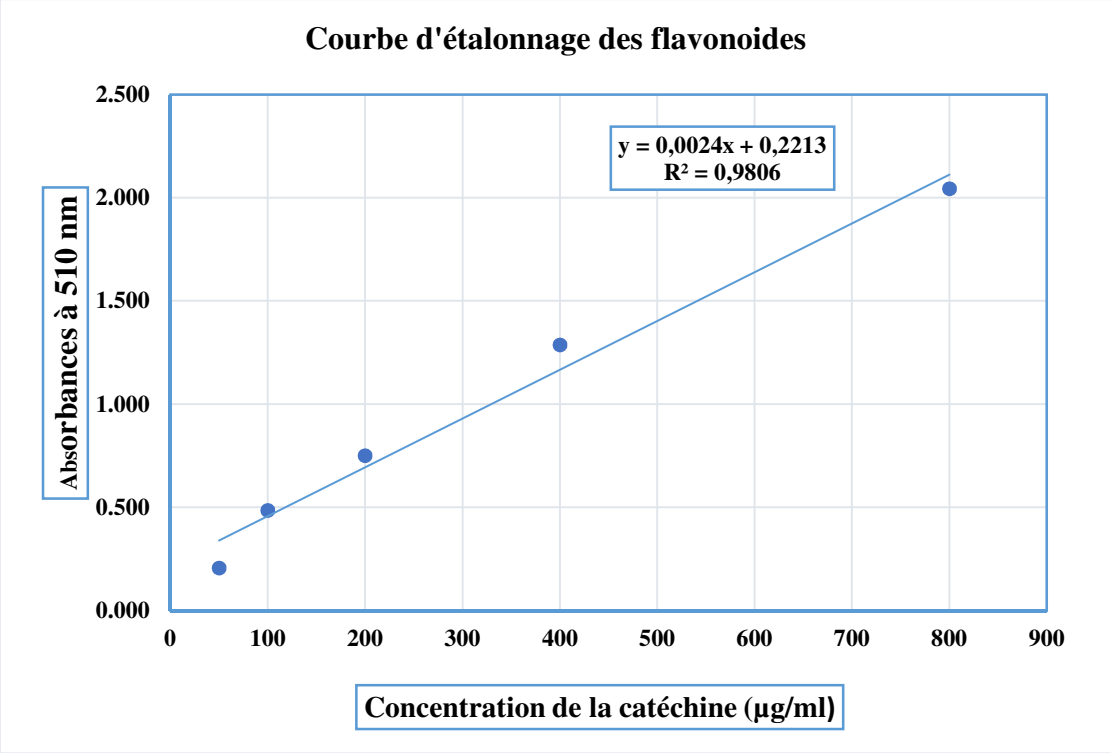


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

3) Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins

Les teneurs en tanins condensés ont été exprimées par référence à la courbe d'étalonnage de l'acide tannique (y= 0.9967 x- 0.0004) avec un coefficient de détermination (R^2 = 0.9894). Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide tannique par gramme de matière végétale sèche (mg EAT/g MS) (Figure 29).

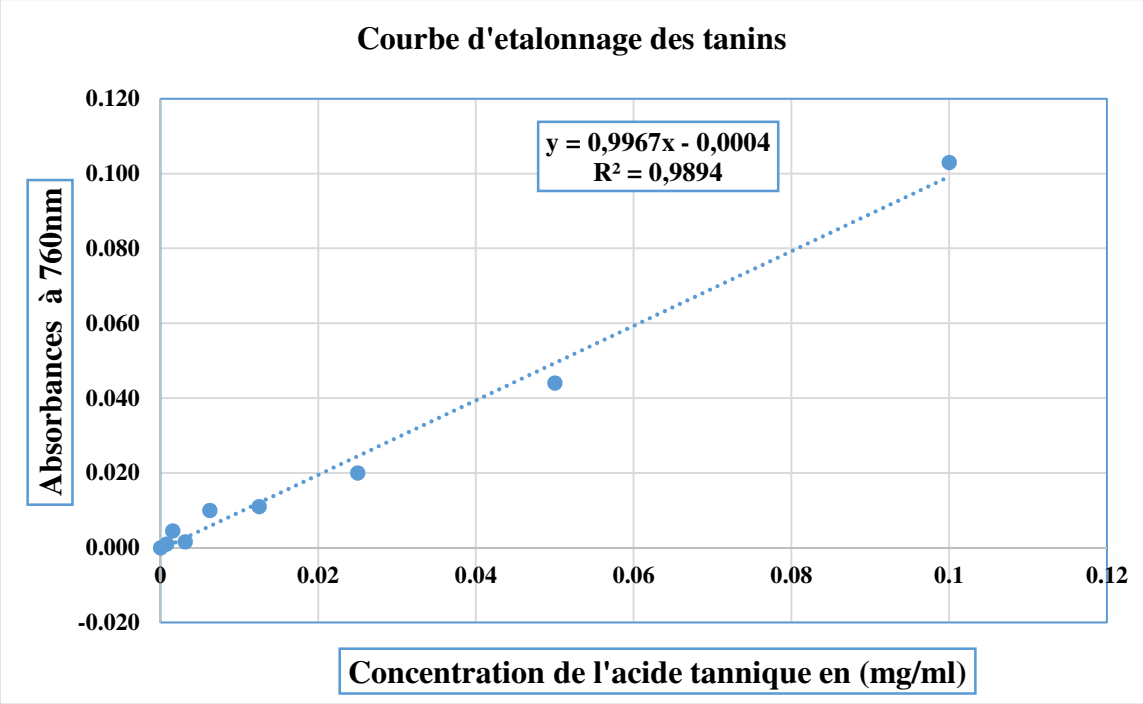


Figure 29 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins condensés.

II.2.2.2. Dosages de polyphénols totaux

Les résultats du dosage de polyphénols totaux (Tableau 09) révèlent que les teneurs les plus élevées en polyphénols ont été enregistrées dans les extraits obtenus par macération : Fe MeOH M, Fe Ac M avec des valeurs de l'ordre de 18.75± 0.55 et 16.97 ± 5.46 mg EAG/g MS respectivement suivi par l'extrait Fe ETOH D avec un taux de 16.12 ± 2.50 mg EAG/g MS.

Une importante teneur en polyphénols a été aussi observée dans l'extrait hydro-méthanolique Fe MeOH D avec un taux de (15.31 ± 0.78 mg EAG/g MS). Tandis que l'extrait T Ac D est le plus faible en composés phénoliques avec un taux de 04.24± 0.70 mg EAG/g MS. Pour le reste des échantillons, les teneurs en composés phénoliques sont intermédiaires et restent appréciables.

Les résultats présentés dans le tableau 09 montrent que les extraits des différentes parties, obtenus par macération et par décoction possèdent des teneurs en composés phénoliques significativement différentes (P <0.05) en relation étroite avec la nature du solvant et la méthode d'extraction.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Mahmoudi et *al.*, (2013)** qui ont montré que la macération est la meilleure méthode d'extraction des polyphénols totaux soit en moyenne 19,88 contre 17,53 mg EAG/g MS pour la décoction.

Tableau 09 : Teneurs en polyphénols totaux dans différentes parties de *Silybum marianum* extraits par macération et décoction (mg EAG/g MS).

Parties de la plante	Solvants d'extraction	Polyphénols totaux (mg EAG/g MS)	
		Macération	**Décoction**
Feuilles (Fe)	Eau	07.52 ± 0.24	10.93± 2.78
	Méthanol	**18.75± 0.55**	**15.31 ± 0.78**
	Acétone	**16.97 ± 5.46**	12.18 ± 3.89
	Éthanol	11.95 ± 1.76	**16.12 ± 2.50**
Tige (T)	Eau	07.46 ±0.83	10.88 ± 3.19
	Méthanol	09.01 ±0.47	07.44± 0.42
	Acétone	09.28 ±1.18	**04.24± 0.70**
	Éthanol	08.10 ± 2.06	05.06 ± 0.89
Fleurs (Fr)	Eau	04.70 ± 0.27	06.10 ± 1.11
	Méthanol	07.76 ± 2.12	07.13 ± 0.38
	Acétone	08.10 ± 0.32	09.24 ± 1.13
	Éthanol	09.04 ± 0.25	13.00 ± 5.67

La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint **(Handa,2008).**

L'extraction par macération est l'une des méthodes d'extraction la plus simple et la plus utilisée pour la détermination du contenu des plantes médicinales en métabolites secondaires **(Chaouch, 2013)** et la seule méthode utilisable dans l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles **(Ben Amor, 2008).** Elle permet de préserver les métabolites ainsi que leur structure, contrairement à l'extraction par décoction où la chaleur est susceptible de dégrader certains

composés chimiques thermosensibles **(Garcia-Salas et *al*., 2010).** Toutefois, cela n'empêche pas que la décoction reste efficace pour l'extraction des composes phénoliques car c'est une opération qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide nécessitant des temps de contact de l'ordre d'une dizaine de minutes.

En effet, indépendamment du système de solvant et du type d'extraction, et en fonction de la partie de la plante, les feuilles des *Silybum marianum* donnent les teneurs les plus élevées en polyphénols (13.80 mg EAG/g MS en moyenne) suivi par les fleurs et la tige avec des valeurs de l'ordre de 8.13 et 7.68 mg EAG/g MS en moyenne respectivement. La répartition inégale des polyphénols dans les différents organes d'une même plante a été aussi rapportée par plusieurs auteurs **(Guessan et *al*.,2009 ; El-haci , 2012 ; Bourgou et *al*., 2016).**

Parmi les quatre systèmes de solvants utilisés, le méthanol offre un extrait dont la teneur la plus élevée en polyphénols a été enregistrée dans l'extrait Fe MeOH M, avec une valeur de l'ordre de 18.75± 0.55 mg EAG/g MS.

Les travaux de **Gamil et *al*., (2013)** montrent que la quantité maximale de composés phénoliques totaux (30,28 mg EAG / g MS) a été obtenue à partir des feuilles d'artichaut en utilisant du méthanol comme solvant d'extraction. D'autres études portant sur les différentes parties de *Silybum marianum* (feuilles, fleurs et tiges) originaire de la région Sidi Thabet située à une soixantaine de kilomètres au nord-ouest de Tunis, rapportent respectivement les teneurs de polyphénols suivants : 32.17±1.39 ; 22.19±0.36 et 35.60±0.85 mg EAG/g de l'extrait brut obtenu par macération dans le MeOH à 70% (**Salem et *al*. ,2016).** Ces valeurs sont nettement supérieures aux nôtres car nous avons trouvé respectivement (18.75± 0.55 ; 07.76 ± 2.12 et 09.01 ±0.47 mg EAG/g MS), dans les feuilles, les fleurs et la tige.

Les quantités de polyphénols totaux observées par **Salem et *al*., (2016)** dans les extraits acétoniques de feuilles sont de l'ordre de : 1.09±0.24 mg EAG/g MS, de 6.39±0.29 mg EAG/g MS pour les fleurs et de 1.80±0.20 mg EAG/g MS mg pour la tige. Ces valeurs sont nettement inférieures à celles que nous avons trouvées respectivement dans les feuilles, les fleurs et la tige (16.97 ± 5.46 ; 08.10 ± 0.32 et 09.28 ±1.18 mg EAG/g MS).

Les extraits éthanoliques à 70% montrent des teneurs de 11.95 ± 1.76 et 08.10 ± 2.06 mg EAG/g MS respectivement dans les feuilles et la tige. Ils sont proches de ceux obtenus par **Sun et *al.,* (2016)** avec des valeurs de l'ordre 11.84±0.21 et 9.80±0.13 mg EAG/g MS respectivement dans les feuilles et les tiges, utilisant le solvant éthanol à 60%.

Des études réalisées par **Gamil et *al*., (2013)** sur les feuilles d'artichauts, indiquent des teneurs en polyphénols totaux obtenues par macération aqueux, plus élevées que les nôtres, de l'ordre de 20.00 mg EAG / g MS.

En revanche, le travail mené par **Akhtar et *al.,* (2015)** sur 61 espèces collectées du Pakistan montre que l'extrait aqueux obtenu par macération des parties aériennes de la plante *Silybum marianum* donne des teneurs en polyphénols totaux de l'ordre de 5.5±2 .0 mg EAG/g MS.

Ces résultats sont proches de ceux que nous avons trouvés pour les extraits aqueux avec des valeurs de l'ordre de 07.52 ± 0.24 mg EAG/g MS pour les feuilles, de 07.46 ±0.83 mg EAG/g MS pour la tige et de 04.70 ± 0.27 mg EAG/g MS pour les fleurs. Ceci peut être dû à la variation du contenu de chaque espèce en métabolites ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions, à la durée du séchage et à la période de la récolte **(Mohammedi, 2013 ; Chaouch, 2013).**

Les résultats indiquent que les teneurs en polyphénols varient selon le solvant utilisé, un effet bénéfique a été obtenu par l'addition de 30% d'eau à ces solvants (éthanol, acétone et méthanol), ce qui a permis une meilleure extraction quantitative des composés phénoliques **(Bettaieb et *al*., 2016)**.Il a été rapporté dans la littérature que la combinaison méthanol-eau dans les proportions 70 : 30 en volume donnait le meilleur rendement d'une macération et que cette même combinaison a donné la teneur la plus élevée en composés phénoliques des feuilles de *Tamarix aphylla* L. par rapport à d'autres solvants comme l'éthanol-eau, l'acétone-eau et l'eau distillée **(Mohammedi & Atik, 2011).**

En outre, mis à part le méthanol, l'addition de 30 % d'eau distillée à l'acétone et à l'éthanol a augmenté de façon remarquable leurs pouvoirs extractants **(Bourgou et *al*., 2016)**. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont démontré que les solvants mixtes sont très efficaces à extraire les polyphénols.

Selon **Mohammedi & Atik (2011)**, l'utilisation de solvants mixtes aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols. La supériorité des solvants mixtes est due à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits obtenus par des solvants mixtes comparés à ceux obtenus par des solvants purs**.**

II.2.2.3. Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes, composés les plus importants des polyphénols sont aussi déterminés dans les trois parties choisies (feuilles, tiges et fleurs) de la plante *Silybum marianum*.

Les résultats des flavonoïdes ont révélé la présence de ces composés avec des quantités différentes selon la méthode d'extraction, la partie de la plante et le type du solvant (Tableau 10).

Tableau 10 : Les teneurs en flavonoïdes (moyenne+ écart type) des différentes parties de *Silybum marianum* par macération et décoction.

Parties de la plante	**Solvants d'extraction**	**Flavonoïdes (mg EC/g MS)**	
		Macération	**Décoction**
Feuilles (Fe)	Eau	04.23 ± 0.37	02.63± 0.39
	Méthanol	02.70 ± 0.32	04.09 ± 0.60
	Acétone	0.95 ± 0.06	**05.06 ± 0.44**
	Éthanol	03.04 ± 0.45	**05.08 ± 0.57**
Tiges (T)	Eau	02.53 ± 0.14	03.84 ± 0.24
	Méthanol	02.32 ± 0.44	03.75 ± 0.32
	Acétone	03. 60 ± 0.13	02.23 ± 0.15
	Éthanol	03.02 ± 0.51	04.12 ± 0.52
Fleurs (Fr)	Eau	02.86 ± 0. 74	04.18± 0.88
	Méthanol	**04.80 ± 0.06**	04.50 ± 0.56
	Acétone	04.35 ± 0.89	03.81 ± 0.56
	Éthanol	03.25 ± 0.05	04.60± 0.55

Selon la méthode d'extraction, indépendamment du solvant et de la partie de la plante utilisée, nous avons observé que les différents extraits présentent des teneurs variées en flavonoïdes. En effet, la teneur la plus élevée est enregistrée pour la décoction (5.08 ± 0.57mg EC/g MS).

La décoction semble être la meilleure méthode d'extraction des flavonoïdes par apport à la macération qui suggère que la température jouerait un effet positif améliorant l'extraction de principes actifs non thermolabiles

Par contre les travaux de **Mahmoudi et *al.*, (2013)** montrent que la macération est préférable pour extraire les flavonoïdes à partir de différentes parties de *Cynara Scolymus* L.

Les teneurs les plus élevées en flavonoïdes ont été enregistrées pour les deux extraits hydro-éthanolique (Fe ETOH D) et hydro-acétonique (Fe Ac D) obtenu par décoction, avec respectivement des valeurs de l'ordre de 5.08 ± 0.57 mg EC/g MS et 05.06 ± 0.44mg EC/g MS. L'extrait qui a présenté la teneur la plus faible était l'extrait hydroacétonique obtenu par macération : Fe Ac M (0.95 ± 0.06 mg EC/g MS).

En ce qui concerne le solvant d'extraction, l'éthanol est le meilleur extracteur des flavonoïdes par décoction dans les trois parties de la plante qui représentent les valeurs les plus élevées : Fe ETOH D (5.08 ± 0.57mg EC/g MS) ; T ETOH D : (04.12 ± 0.52mg EC/g MS) et Fr ETOH D (04.60± 0.55mg EC/g MS).

Les résultats présentés dans le tableau (10) montrent que les extraits des feuilles par macération possèdent des teneurs en flavonoïdes significativement différentes ($P < 0.05$) en relation étroite avec la nature du solvant et la méthode d'extraction utilisée tandis que pour les autres extraits, la concentration en flavonoïdes est non significative ($P > 0.05$).

L'étude de **Sun et *al.*, (2016)**, révèle des teneurs en flavonoïdes dans l'extrait hydroéthanolique de l'ordre de 9.82±0.32 mg EC/g MS pour les feuilles et 6.64±0.43 mg EC/g MS pour la tige, par contre nos résultats sont nettement inférieurs avec des valeurs de l'ordre de 04.23 ± 0.37 mg EC/g MS pour les feuilles et 02.53 ± 0.14 mg EC/g MS pour la tige.

Dans une autre étude portant sur les feuilles, la tige et les fleurs de *Silybum marianum*, les auteurs rapportent des teneurs variables en flavonoïdes, dans l'extrait brut obtenu par macération dans le MeOH 70% et Ac 70% **(Salem et *al*., 2016).** Les résultats donnent les teneurs suivantes : Fe MeOH M : (3.90 ± 0.54 mg EC/g MS), Fr MeOH M : (3.82 ± 0.87 mg EC/g MS) ; TMeOH M (8.31±1.03 mg ECg /MS). Comparés à nos résultats, on remarque que les teneurs des flavonoïdes dans les deux parties : Fe MeOH M :(02.70 ± 0.32 mg EC/g MS) et Fr MeOH M (04.80 ± 0.06 mg EC/g MS) sont proches. Par contre le taux de flavonoïdes dans la tige est nettement supérieur au nôtre (T MeOH M : 02.32 ± 0.44mg EC/g MS).

Cependant pour l'extrait hydroacétonique, ces chercheurs ont trouvé que le taux des flavonoïdes dans la feuille est de l'ordre : 0.42 ±0.11 mg EC/g MS, nos résultats sont deux fois supérieurs avec une valeur de Fe Ac M : 0.95 ± 0.06 mg EC/g MS.
Concernant les extraits hydro-acétoniques obtenus à partir de la tige et des fleurs, le taux des flavonoïdes est respectivement comme suit : T Ac M : 03. 60 ± 0.13 ; Fr Ac M 04.35 ± 0.89 mg EC/g MS. Ces valeurs sont très largement supérieures à celles obtenus par **Salem et *al.*, (2016**) avec des teneurs de : Fr Ac M (0.97±0.20 mg EC/g MS), T Ac M : (0.65±0.10 mg EC/g MS).

Le travail mené par **Akhtar et *al*., (2015)** sur 61 espèces collectées du Pakistan montrent que l'extrait aqueux obtenu par macération des parties aériennes de la plante *Silybum marianum* L donne des teneurs en flavonoïdes de l'ordre de 5.9±1.00 mg EAG/g MS. Ces résultats sont un peu plus élevés que les résultats obtenus avec nos extraits aqueux : Fe Aq M : 04.23 ± 0.37 mg EAG/g MS ; Fr Aq M : 02.86 ±0. 74 mg EAG/g MS ; T Aq M : 02.53 ± 0.14. Une telle différence peut-être due au fait que ces chercheurs ont travaillé sur la partie aérienne entière, alors que nos résultats se rapportent aux trois parties séparées (feuilles, tiges et fleurs) de la partie aérienne. De plus l'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. La diminution de leur extractibilité dans le solvant pourrait affecter aussi leur quantification.

En fonction de la partie de la plante utilisée et indépendamment du système de solvant et du type d'extraction, les fleurs de *Silybum marianum* donnent la teneur la plus élevée en flavonoïdes suivi par les feuilles et la tige. Selon les travaux de **Mahmoudi et *al*. (2013)** les fleurs de *Cynara scolymus L* enregistrent un maximum de flavonoïdes par rapport aux différentes parties étudiées. Cela confirme les résultats que nous avons obtenus dans la présente étude.

Les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal, ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, graines, bois, pollens, l'écorce et les fleurs des plantes **(Verhoeyen et *al.*, 2002).** Aujourd'hui, plus de 4000 composés de flavonoïdes sont identifiés et se trouvent localiser particulièrement dans les pigments floraux ou dans les feuilles. La grande distinction entre les parties apparait au niveau de la richesse de certaines en flavonoïdes et la pauvreté des autres **(Mahmoudi et *al*., 2013).** Il a été prouvé que les teneurs en flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante

n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et de survivre **(Hammoudi, 2015).**

II.2.2.4. Teneur en tanins

Les teneurs en tanins des différentes parties de *Silybum marianum* issus des deux méthodes d'extraction (macération et décoction) sont moins importantes que celles des flavonoïdes (Tableau 11). Les extraits issus par décoction présentent des teneurs en tanins supérieurs à celle des extraits obtenus par macération.

Tableau 11 : Teneurs en tanins (moyenne + écart type) des différentes parties de *Silybum marianum* par macération et décoction.

Parties de la plante	**Solvants d'extraction**	**Tanins (mg EAT/g MS)**	
		Macération	**Décoction**
Feuilles (Fe)	Eau	02.30 ± 0.22	**03.86± 0.22**
	Méthanol	00.75 ± 0.05	00.73 ± 0.18
	Acétone	01.66 ± 0.23	01.15 ± 0.20
	Éthanol	00.54 ± 0.06	01.04 ± 0.26
Tige (T)	Eau	00.79 ± 0.23	**04.14 ± 0.82**
	Méthanol	00.92 ± 0.06	01.48 ± 0. 23
	Acétone	01.17± 0.05	01.56 ± 0.09
	Éthanol	00.67 ± 0.12	01.45 ± 0.26
Fleurs (Fr)	Eau	00.79 ± 0. 27	01.03 ± 0.17
	Méthanol	01.16 ± 0.11	00.83 ± 0.06
	Acétone	01.38 ± 0.07	02. 46 ± 0.07
	Éthanol	01.76 ± 0.16	01.15± 0.07

Ces résultats révèlent que la décoction est plus efficace que la macération, pour l'extraction des tanins.

Al farsi & Lee (2007) ont indiqué que la température élevée peut stimuler l'extraction des tanins condensés dans le solvant d'extraction. La chaleur intense du solvant semble permettre la libération des composés phénoliques de la paroi cellulaire par décomposition des constituants cellulaires. Par conséquent, elle permet d'augmenter le rendement en polyphénols.

D'ailleurs, **Juntachote et *al.,* (2006)** ont indiqué que la température d'extraction élevée augmentait, d'une part, le transfert de masse de tanins condensés, et d'autre part, permettait de réduire la viscosité et la tension superficielle du solvant ce qui favorise l'extraction des composés phénoliques.

Selon les résultats obtenus (Tableau 11), quel que soit l'organe étudié et la méthode d'extraction nous avons observé des teneurs variées en tanins dans les différents extraits étudiés. Nous avons remarqué que l'extraction à l'eau donne les teneurs les plus élevées en tanins condensés (T Aq D : 04.14 ± 0.82 mg EAT/g MS et Fe Aq D : 03.86± 0.22 mg EAT/g MS) suivie par l'extraction à l'acétone (Fe Ac D : 02. 46 ± 0.07mg EAT/g MS) et enfin à l'éthanol (Fr ETOH M : 01.76 ± 0.16 mg EAT/g MS). La teneur la plus faible en tanins condensés était celle de l'extraction à l'éthanol (Fe ETOH M : 00.54 ± 0.06mg EAT/g MS).

L'analyse statistique a montré qu'il existe un effet significatif de la polarité du solvant d'extraction ($P < 0.05$) sur la concentration en tanins condensés pour les extraits de feuilles par macération, par décoction aussi et sur les extraits de tiges par macération.

Ces résultats sont en accord avec de nombreux résultats de chercheurs qui ont indiqué que l'extrait aqueux enregistre des teneurs plus élevées en tanins condensés suivies par l'extrait hydroéthanolique. Par contre, le méthanol extrait faiblement les tanins quelle que soit la méthode d'extraction. L'inconvénient est que l'eau extrait des substances indésirables comme les protéines et les colorants non phénoliques qui provoquent des interférences lors du dosage des tanins **(Chavan *et al.*, 2001).**

Selon **Bruneton et *al.,* (2009)**, l'extraction des tanins condensés est en règle générale, réalisée par un mélange d'eau et d'acétone. **Uma et *al.*, (2010)** ont justifié l'efficacité de l'acétone à extraire les tanins condensés par son poids moléculaire qui est relativement élevé par rapport aux autres solvants. **Collin & Crouzet (2011)** ont démontré que les solvants moyennement polaires tels que l'acétone, et l'éthanol sont recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire tels que les pro-anthocyanidines.

Les faibles teneurs en tanins condensés dans les différentes parties de la plante étudiée, comparées avec celles des polyphénols totaux et des flavonoïdes, sont probablement dues au fait que le méthanol n'est pas le solvant approprié à l'extraction de ces composés. Cette probabilité est soutenue par plusieurs travaux qui ont montré que les tanins condensés sont mieux extraits par un mélange acétone/eau (70/30) **(Chavan et *al*., 2001 ; Macheix et *al.*, 2005 ; Trabelsi et *al*., 2010).**

Selon **Meyre-Silva et *al*., (2005)**, les teneurs en tanins condensés peuvent être variables en raison de plusieurs facteurs tels que la sensibilité des tanins à de plusieurs voies de dégradation (l'oxydation, la lumière...), le stade de maturité des fruits, les conditions de cultures et de climat. Elles dépendent aussi de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires.

En fonction de la partie de la plante utilisée et indépendamment du système de solvant et de la méthode d'extraction, nous avons remarqué des teneurs variées en tanins, la tige de *Silybum marianum* donne la teneur la plus élevée en tanins (04.14 ± 0.82 mg EAT/g MS) suivi par les feuilles et les fleurs avec respectivement des valeurs de l'ordre de 03.86± 0.22 et 02. 46 ± 0.07mg EAT/ g MS.

Les résultats de **Salem et *al*., (2016)** montrent que l'extrait brut hydro-méthanolique des feuilles de *Silybum marianum* présentent une concentration importante en tanins (15.72±1.47mg EAT/g MS). Cette concentration est nettement supérieure à la nôtre (00.75 ± 0.05 mg EAT/g MS). Le taux de tanins dans la tige signaler par cette étude (2.46±0.76mg EAT/g MS) est trois fois supérieur à nos résultats. Cependant les résultats de **Salem et *al*., (2016)** sur les fleurs (1.97±0.44mg EAT/g MS) sont proches de ceux obtenu dans notre étude pour cette même partie végétale.

Si on compare les teneurs en tanins condensés de notre extrait hydroacétonique des feuilles à celles de **Salem et *al*., (2016)** , on remarque qu'il y a une différence importante , et que notre extrait présente une teneur inférieur (01.66 ± 0.23mg EAT/g MS). Par contre le resultat obtenu par ses travaux rapporte une teneur superieur (3.20±0.05 mg EAT/g MS). Par contre nos résultats sur le taux des tanins dans la tige (01.17± 0.05 EAT/g MS) rejoignent ceux de **Salem et *al*., (2016**) avec une teneur de (1.05±0.22mg EAT/g MS).

Concernant les extraits hydro-acétoniques des fleurs, la concentration des tanins de notre extrait (01.16 ± 0.1105 mg EAT/g MS) est proche des résultats de Salem avec une teneur de (1.05±0.22mgEAT/g MS).

L'extraction de ces composés à partir des différents échantillons végétaux est fortement influencée d'une part par la nature et la concentration des solvants d'extraction et de pénétration dans la matière végétale, et d'autre part par la capacité de l'échantillon végétal à se solubiliser dans les solvants.

Au vu des résultats présentés ci-dessus, il ressort que l'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs. Elle dépend à la fois du solvant d'extraction, de la méthode d'extraction et de la nature de l'organe étudié.

II.3. Pouvoir antioxydant des extraits des différentes parties de *Silybum marianum*

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de composés bioactifs tels que les composés phénoliques antioxydants naturels. Ces dernières décennies, les tests d'activité antioxydante ont été largement développés pour évaluer l'efficacité de nouveaux composés.

De nombreuses méthodologies sont disponibles, permettant d'évaluer les différents aspects physico-chimiques du potentiel antioxydant dans différentes conditions.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits a été évaluée in vitro par deux techniques chimiques (la capacité antioxydante totale, radical libre DPPH).

II.3.1. Capacité antioxydante totale (Total Antioxidant Capacity : TAC)

La capacité antioxydante totale est une méthode spectroscopique pour la détermination quantitative de la capacité antioxydante, par la formation d'un complexe de phosphomolybdène (PPM). Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de molybdène présent sous la forme d'ions molybdate $MoO4^{2-}$ à molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait ou l'antioxydant pour former un complexe vert de phosphate dans un milieu acide **(Prieto et *al.,* 1999).** Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait- antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM) **(Prieto et *al.,* 1999).** Le processus se base sur l'auto-oxydation par la chaleur (95°C) et nécessitent de longues périodes d'incubation (90 minutes).

Les résultats de la capacité antioxydante totale sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de l'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS), à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acide gallique comme référence ($y=0.1199\ln(x)-0.2731$, $R^2=0.998$). La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale est représentée dans la figure 30.

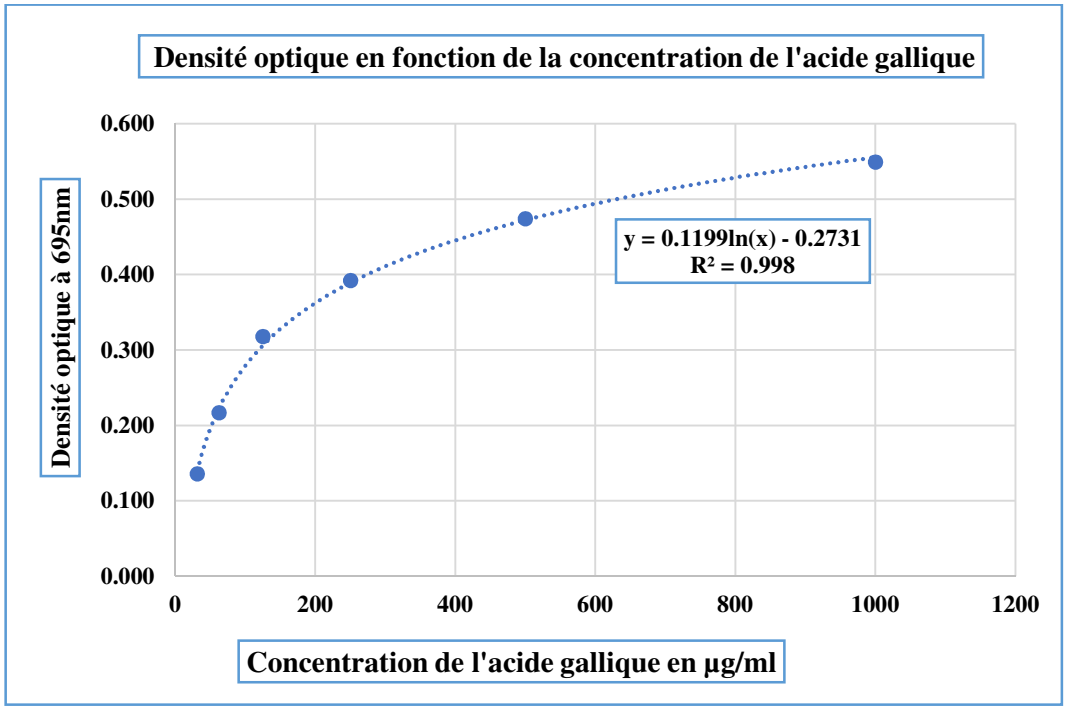


Figure 30 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour la détermination de la capacité antioxydante totale.

Les résultats présentés (Figure 31) montrent que les extraits des différentes parties (feuilles, tiges et fleurs) de la plante *Silybum marianum* issus de deux méthodes d'extraction (macération et décoction), avec utilisation de quatre solvants eau, méthanol (70%), acétone (70%), éthanol (70%)) présentent des capacités antioxydantes totales différentes.

L'estimation de la capacité antioxydante totale des extraits bruts a montré une importante variabilité en fonction de la partie de la plante étudiée, de la nature du solvant utilisé et du mode d'extraction.

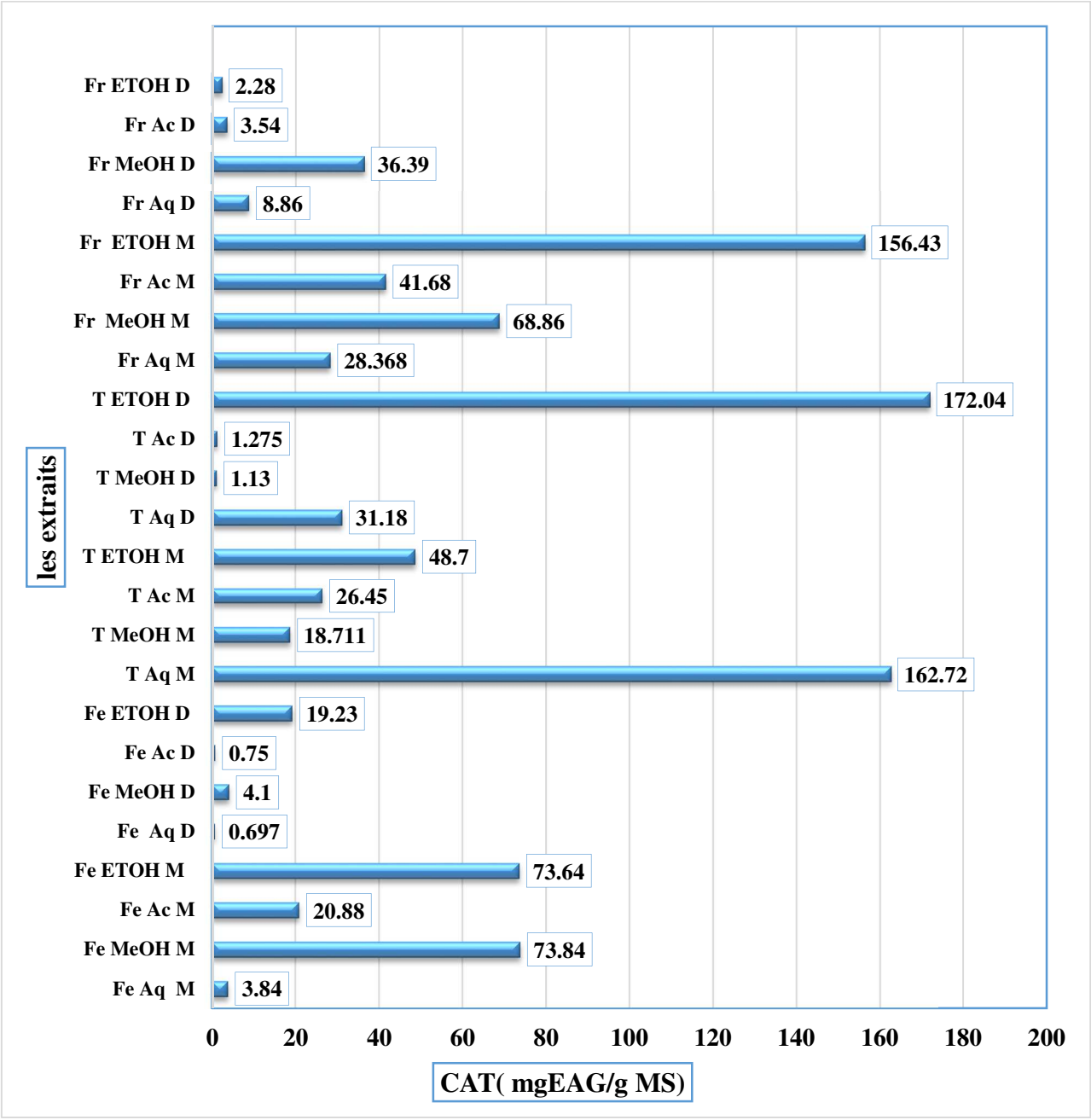


Figure 31 : Comparaison de la capacité antioxydante totale des extraits des différentes parties de la plante *Silybum marianum.* (Fe : Feuille ; T : tige ; Fr : Fleur).

Les résultats de cette activité indiquent que l'extrait hydroéthanolique de la tige obtenu par décoction (TETOH D) possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de 172.04 ±26.06 mg EAG/g MS par rapport aux autres extraits. Mais cela n'empêche pas de remarquer un effet antioxydant de l'extrait aqueux de la tige acquis par macération et de l'extrait

hydroéthanolique des fleurs par macération avec respectivement des valeurs importantes de (T Aq M : 162.72±5.56 mg EAG/g MS) et (Fr ETOH M : 156.23 ±26.29 mg EAG/g MS).

Les deux extraits hydro-méthanolique et hydroéthanolique des feuilles obtenus par macération, présentent presque la même valeur (73.84± 5.90 mg EAG/g et 73.64± 5.93mg GAE/g. Les autres extraits montrent une activité considérable à l'exception de l'extrait hydro –acétonique et aqueux des feuilles par décoction qui sont moins actifs avec respectivement une très faible capacité antioxydante totale de : Fe Aq D : 0.69±0.041 ; Fe Ac D : 0.75±0.04 mg EAG/g MS).

L'étude statistique a révélé que la nature du solvant et la méthode d'extraction ont un effet significatif sur la capacité antioxydante totale des extraits des tiges obtenues par macération et par décoction, une différence significative ($p<0.05$) pour les extraits des feuilles par décoction et une différence significative ($p<0.05$) pour les extraits des fleurs par décoction.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 12, nous remarquons que la capacité antioxydante totale des extraits bruts varie d'une méthode d'extraction à une autre, l'extraction par macération a donné des extraits qui présentent une bonne capacité antioxydante par rapport à la décoction. Ceci peut-être dû essentiellement à la richesse de ses extraits en molécules, particulièrement les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins qui sont doués d'activité antioxydante importante. L'explication de ces activités est due à leurs fortes propriétés redox sur leur capacité à absorber les radicaux libres et aussi aux structures chimiques des molécules bioactives **(Ferrari, 2002 ; Nawaz *et al*., 2006 ; Bourgou et *al*., 2016).**

Pour les quatre solvants d'extraction, les extraits hydro-éthanoliques présentent une bonne capacité antioxydante par rapport aux autres extraits, suivis par les extraits aqueux. Les teneurs varient de 48.70 à 156.43 mg EAG g/MS pour les extraits éthanoliques (70%) et 3.84 à 162.72 mg EAG g/MS pour les extraits aqueux obtenus respectivement par macération et de 02.28 à 172.04 mg EAG g/MS et 0.69 à31.18mg EAG g/MS pour les mêmes extraits obtenus respectivement par décoction.

Wannes et *al.,* (2010) et **Aleksic & knezevic (2014)** ont prouvé que les extraits aqueux présentent des fortes capacités antioxydantes totales par rapport aux extraits hydro-méthanoliques.

Les travaux de **Salem et *al*., (2016)**, ont confirmé que les extraits hydro-méthanoliques (feuilles, fleurs et tige) par macération ont une capacité antioxydante plus importantes comparées à ceux extraits par l'acétone. Le méthanol permet l'extraction de plusieurs composés comme les acides phénoliques, les anthocyanidines, les flavanones, les flavanols, les flavones, les procyanidines et la catéchine.

Plusieurs études ont prouvé que l'addition d'eau à de faibles taux au solvant améliore l'extraction des antioxydants puissants **(Turkmen et *al.*, 2006 ; Zhao et *al.*, 2006).**

L'extraction par macération a donné des extraits qui présentent une bonne capacité antioxydante par rapport à la décoction. Les résultats de ce dosage montrent que la capacité antioxydante varie d'une partie à une autre et que l'extrait hydro-éthanolique des tiges possède la meilleure capacité antioxydante par rapport aux extraits des fleurs. Les extraits des feuilles ont une capacité antioxydante totale considérable. Ceci peut-être essentiellement dû à la richesse de l'extrait de tige en certaines molécules, particulièrement les tanins condensés doués d'activités antioxydantes importantes **(Schmelzer & Gurib-Fakim, 2013).** D'autre part**,** les extraits des feuilles ont une capacité antioxydante totale considérable. Il est à signaler, que le règne végétal reste une source importante d'une variété de molécules bioactives **(Ferrari, 2002).** Le mode d'action le plus communément admis est à rechercher dans leur structure : les nombreux cycles insaturés qui sont capables de capturer les radicaux libres.

Tableau 12 : Capacité antioxydante totale des extraits des différentes parties de la plante *Silybum marianum* issu par macération et décoction.

Parties de la plante	Solvants d'extraction	Capacité antioxydante totale (mg EAG /g MS)	
		Macération	Décoction
Feuilles (Fe)	Eau	3.84±0.066	0.69±0.041
	Méthanol	73.84±5.90	04.10±0.82
	Acétone	20.88±1.39	0.75±0.04
	Éthanol	73.64±5.93	19.23±7.59
Tige (T)	Eau	**162.725 ±5.56**	31.18±4.40
	Méthanol	18.71 ±2.29	01.13±0.27
	Acétone	26.45±3.83	01.27±0.12
	Éthanol	48.70±4.26	**172.04±26.06**
Fleurs (Fr)	Eau	28.36±8.77	8.89±0.41
	Méthanol	68.86±19.97	36.39±6.74
	Acétone	41.68±1.56	03.54±1.72
	Éthanol	**156.43± 26.29**	02.28±0.06

II.3.2.Capacité de piégeage du radical DPPH•

Le test DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. L'objectif du protocole mis en œuvre est d'évaluer la capacité de chaque échantillon à réduire le radical stable qu'est le DPPH•. En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables (**Brand-Williams et *al*.,1995**).

La réduction du radical DPPH• par un antioxydant peut-être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 515-518 nm provoquée par la

présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet. Il se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits **(Molyneuxs, 2004).**

Plusieurs concentrations d'extraits ont été testées pour leurs activités antioxydantes in vitro. Les absorbances mesurées à 515 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH· qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon.

Le pourcentage d'inhibition (PI%) du radical stable (DPPH•) enregistré par les différents extraits et l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique) sont portés dans les figures (32,33 et 34).

Les résultats sont illustrés sous formes de courbes ayant des allures logarithmiques avec un R^2 compris entre 0.96 à 0.99 dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonné l'activité antioxydante en pourcentage. À partir de ces profils, nous avons déduit la valeur correspondant à l'CI_{50}. Elle est définie par la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du radical DPPH• en solution. L'IC_{50} est le paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante.

La lecture de ces résultats montre que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente significativement ($p \leq 0,05$) avec l'augmentation de la concentration.

Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits de la plante sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique. L'acide ascorbique ou vitamine C est un agent antioxydant majeur capable de piéger ou de neutraliser à des concentrations très faibles d'espèces réactives d'oxygène. Ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton **(Valko*et al*., 2006)**. En revanche, l'extrait hydro-acétonique obtenu par décoction des feuilles a présenté une très faible activité antioxydante traduite par un pourcentage d'inhibition de 43.65 % à la même concentration.

Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence de la substance de référence (acide ascorbique) sont supérieurs à ceux des différents extraits de la plante avec une valeur de 92.06%.

Les travaux de **Salem et *al*., (2016)** montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre (DPPH•) augmente avec l'augmentation de la concentration. Leurs travaux montrent que les extraits hydro-méthanoliques et les extraits hydro-acétoniques des trois parties utilisées (feuilles, fleurs et tiges) de *Silybum marianum* provenant de Tunisie ont une grande capacité à réduire les radicaux libres et peuvent être utilisés comme antioxydants remarquables.

Nisar et *al*., (2013) rapportent que le pourcentage d'inhibition (PI%) du radical stable (DPPH•) enregistré par les extraits hydro-éthanoliques pour les différentes parties de *Silybum marianum* est comme suite : Feuilles (52%) **;** tiges (52%). Les travaux de **Jing Sun (2016)** ont montré que l'extrait hydroéthanolique des feuilles et des tiges de la plante *Silybum marianum* enregistre respectivement des taux d'inhibition du DPPH de l'ordre (56.82%) et (42.11%). Ces résultats sont un peu inférieurs par rapport à nos extraits avec des valeurs de l'ordre (68,88%) pour les feuilles et (69,76%) pour les tiges.

Les mêmes travaux de **Nisar et *al*., (2013b)** révèlent que le pourcentage d'inhibition (PI%) du radical stable (DPPH•) des fleurs est de 55,1%.Cette valeur est proche de nos résultats avec un pourcentage d'inhibition égale à 49,89%.

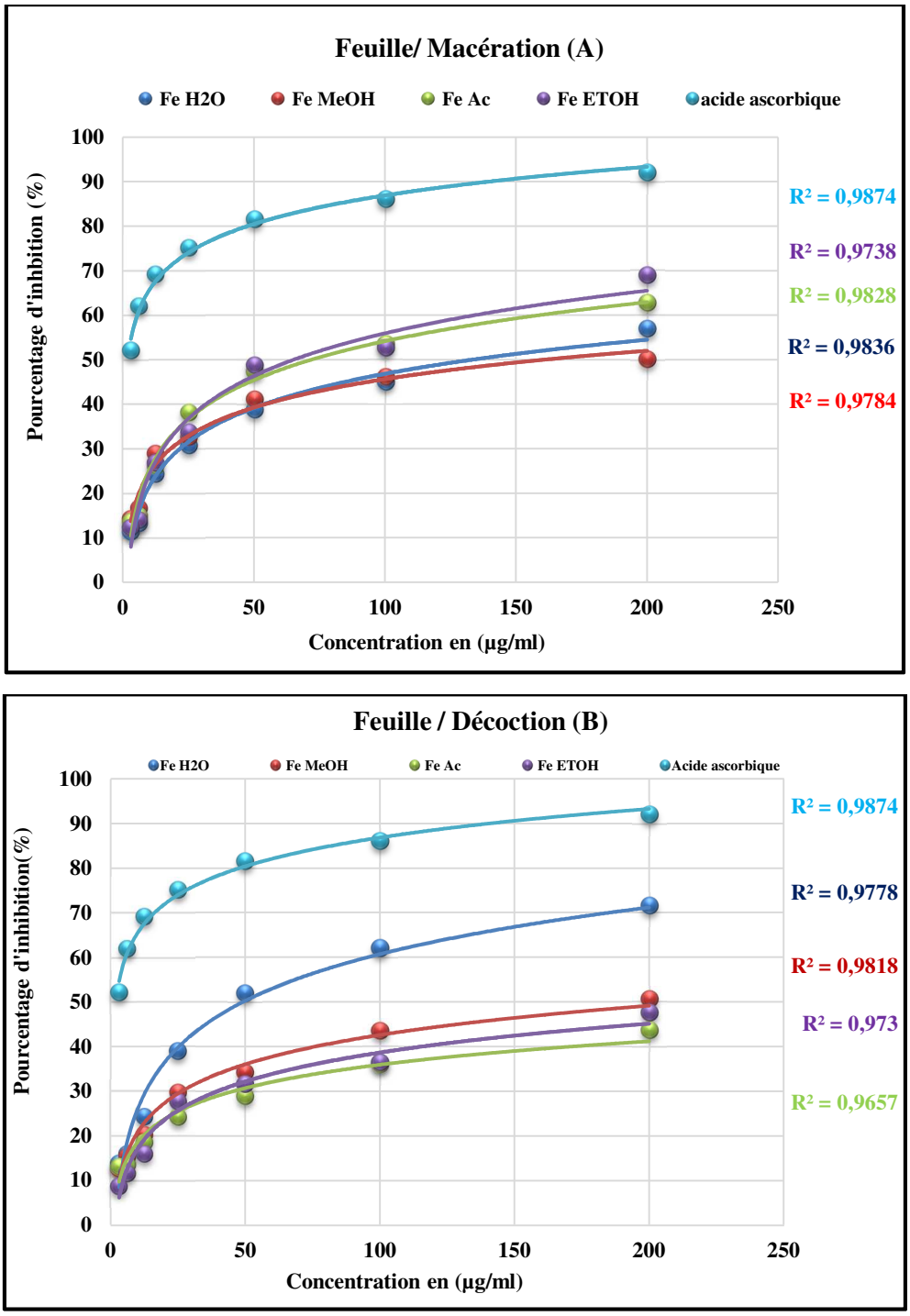
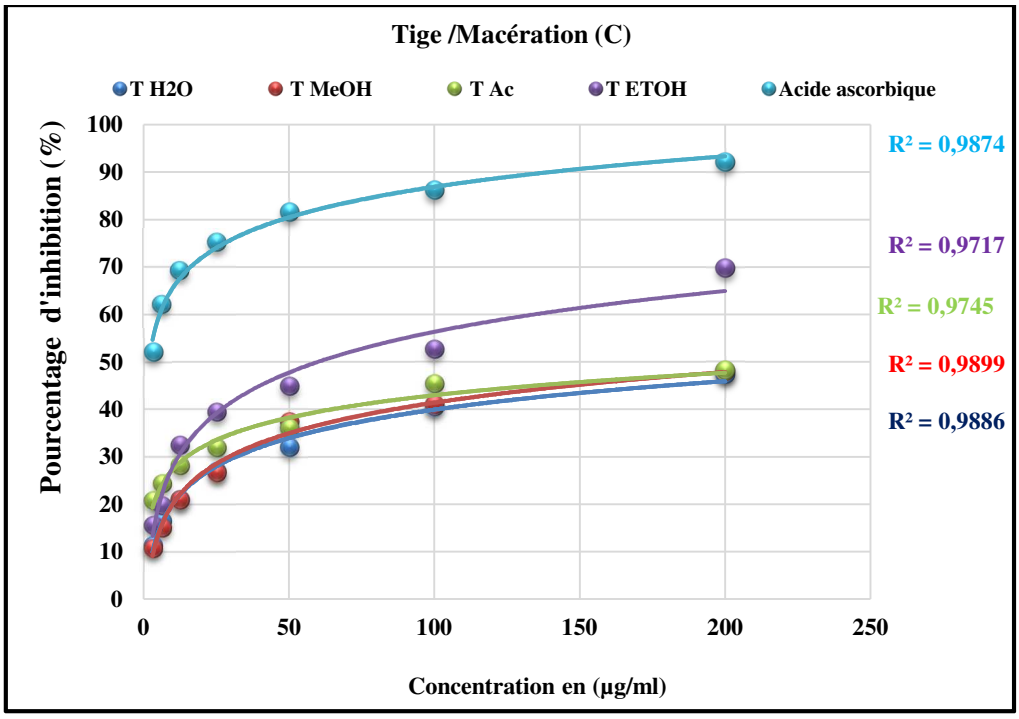


Figure 32 : Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH par l'acide ascorbique et par les extraits des feuilles de *Silybum marianum* obtenus par macération **(A)** et décoction **(B).**



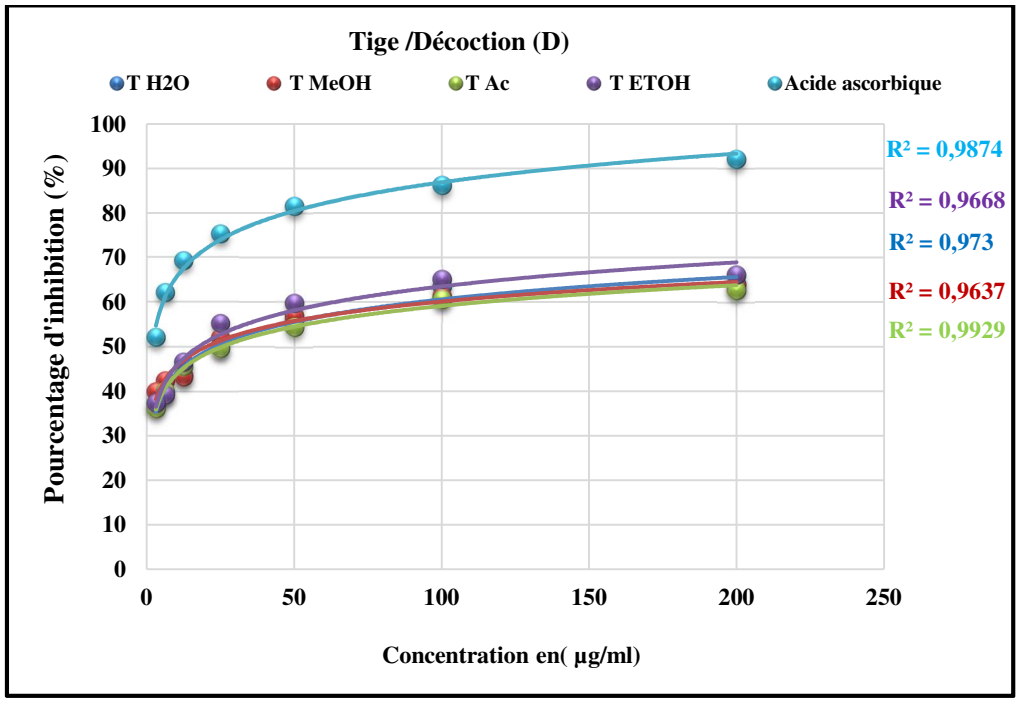
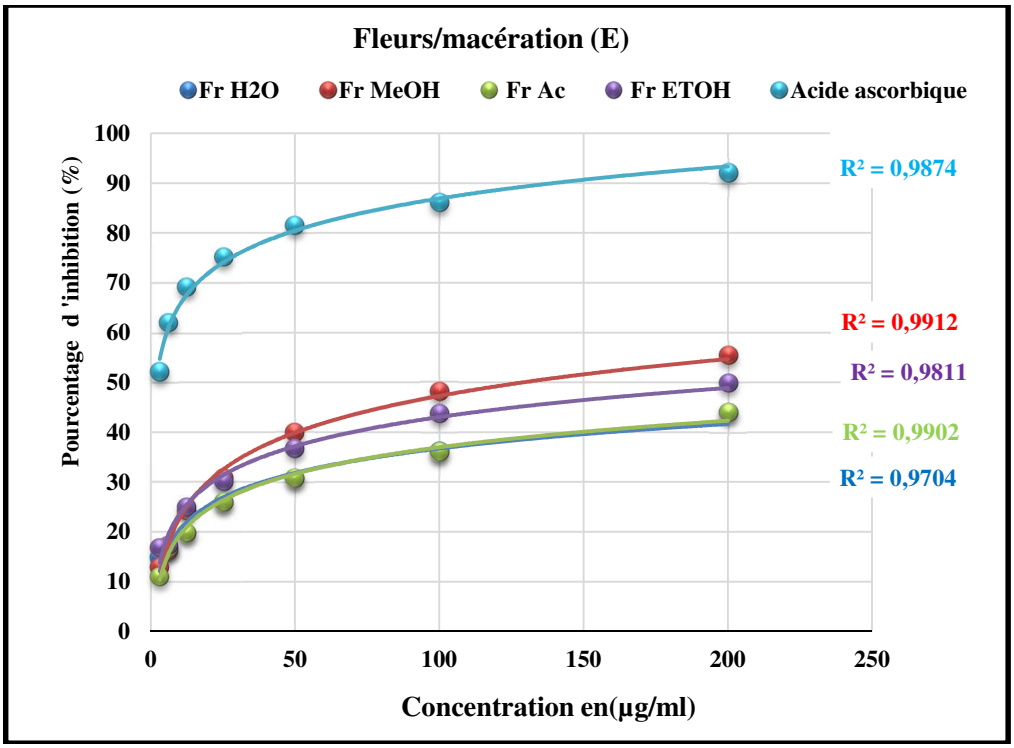


Figure 33 : Pourcentages d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique et par les extraits des tiges de *Silybum marianum* obtenus par macération **(C)** et décoction **(D).**

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).



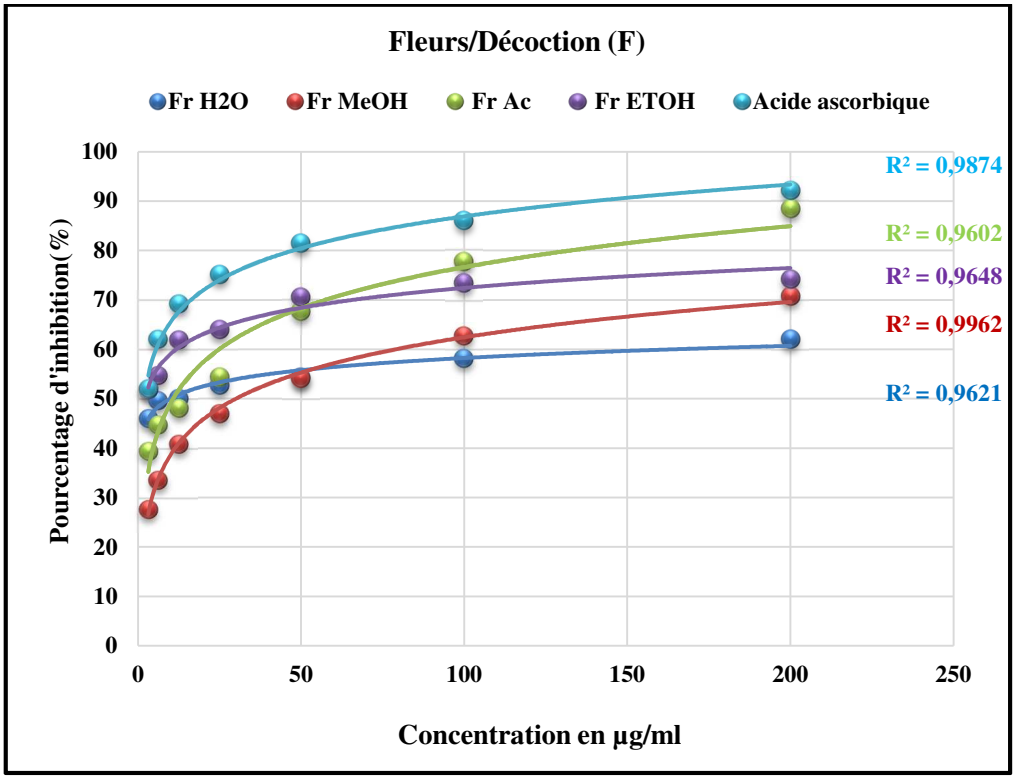


Figure 34 : Pourcentages d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique et par les extraits des fleurs de *Silybum marianum* obtenus par macération **(E)** et décoction **(F)**.

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

Les résultats mentionnés ci-dessus montrent que l'ensemble des extraits étudiés révèlent des propriétés antioxydantes différentes et que les IC_{50} varient en fonction du mode d'extraction, de la nature du solvant utilisé et de la partie de la plante étudiée.
Indépendamment de la nature du solvant, les extraits des fleurs de *Silybum marianum* obtenus par décoction révèlent des propriétés antioxydantes intéressantes ce qui se manifeste par des faibles valeurs de IC_{50} par rapport aux autres extraits.

Selon **Brand-Williams et *al*., (1995)** et **Pokorny et *al*., (2001)** plus la valeur d'IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée. Nous remarquons clairement le fort pouvoir antioxydant de contrôle positif utilisé qui est de l'ordre de 2.179 ± 0.018 µg/ml (Figures 32,33 et 34).

Les résultats présentés dans les histogrammes de la figure 35 révèlent que l'activité antiradicalaire est influencée par la nature du solvant d'extraction. L'extrait hydroéthanolique des fleurs de *Silybum marianum* obtenu par décoction a une capacité à piéger le radical DPPH importante comparé à celui du contrôle positif, qui se traduit par un IC_{50} assez bas de l'ordre de 2.099 µg/ml, très proche même de ceux du composé standard (l'acide ascorbique : 2.179 ± 0.018 µg/ml), suivi par l'extrait aqueux des fleurs par décoction avec une IC_{50} de l'ordre de 09.59 µg/ml. Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'extrait hydroacétonique des feuilles par décoction avec un IC_{50} de l'ordre de 644.05 µg / ml.
Les résultats indiquent que l'éthanol (70%) est le meilleur solvant, suivi par l'acétone (70%). Par ailleurs, l'extrait hydro-méthanolique et l'extrait aqueux ont montré une activité antiradicalaire moins importante pour les trois parties de la plante et les deux méthodes d'extraction.
Les résultats de l'analyse statistique révèlent que l'activité antiradicalaire des extraits des feuilles et des fleurs obtenus par macération et décoction est significativement influencée par la méthode et la nature du solvant d'extraction.

Les résultats de la présente étude sont similaires à ceux de **Mohsen & Ammar (2009)** ; **Bourgou et *al.,* (2016)** et **Bettaieb Rebey et *al.,* (2016)** qui ont étudié l'influence de différents solvants sur l'activité antiradicalaire où l'éthanol est le plus actif, en raison de sa polarité et de sa bonne solubilité pour ces composés. Ces résultats sont en accord avec nos premiers tests, qui nous permettent de conclure que les extraits obtenus à l'aide de solvants polaires ont une activité plus efficace que de ceux de moindre polarité.

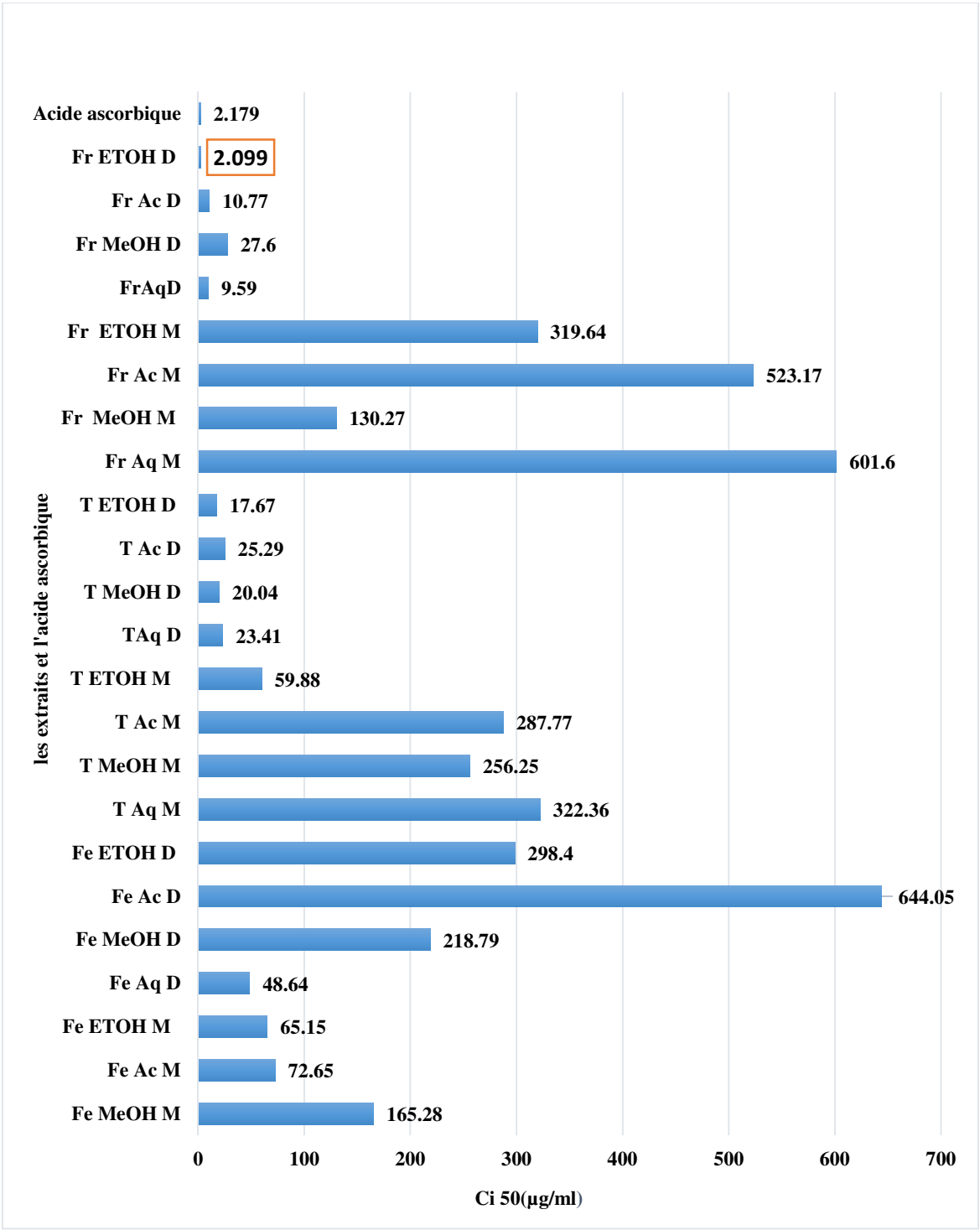


Figure 35 : Concentrations minimales inhibitrices 50 (CI_{50}) des extraits testées et du standard (acide ascorbique) par la méthode de piégeage du radical libre ($DPPH^{\bullet}$).

Pour mieux évaluer l'activité antioxydante et comparer l'efficacité des extraits, les valeurs de l'IC_{50}, présentés dans le tableau 13 peuvent être classés en trois groupes :

Le premier groupe d'extraits ayant des valeurs d'IC_{50} comprises entre 2.099 et 10.77 µg / ml qui ont montré une très forte capacité à piéger le radical DPPH, ce qui indique une meilleure activité antioxydante. Il regroupe les extraits suivants par ordre d'efficacité :

Fr ETOH D (2.099 µg / ml)> Fr Aq D (09.59 µg / ml) > Fr Ac D (10.77 µg / ml).

Le deuxième groupe est celui des extraits des plantes ayant les valeurs d'IC_{50} comprises entre 17.67 à 72.65 µg / ml, qui ont une activité antioxydante modérée, c'est le cas de :

T ETOH D (17,67 µg / ml) > T MeOH D (20,04 µg / ml)>T Aq D (23,41 µg / ml)>T Ac D (25,29 µg / ml)>Fr MeOH D (27.60 µg / ml)>Fe Aq D (48.64 µg / ml) >T ETOH M (59,88 µg / ml) >Fe ETOH M (65.15 µg / ml) et enfin l'extrait Fe Ac M (72.65 µg / ml).

Le troisième groupe est constitué des extraits qui ont montré une très faible capacité à piéger le radical DPPH, ayant des valeurs d'IC_{50} supérieure à 130.27 µg / ml. C'est le cas de tous les extraits des tiges et des fleurs obtenus par macération y compris les extraits de feuilles sauf l'extrait aqueux par décoction et l'extrait hydro-éthanolique, hydro-acétonique par macération.

Nous constatons que les extraits des fleurs, des tiges et des feuilles obtenus par décoction en utilisant les quatre solvants d'extraction sont plus efficaces à piéger le radical DPPH, comparés à ceux obtenus par macération. Par ailleurs, la plupart des extraits des différentes parties de la plante obtenus par macération ont montré une activité antiradicalaire moins importante.

En comparaison avec l'acide ascorbique, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs, à l'exception de l'extrait hydroéthanolique des fleurs de *Silybum marianum* obtenus par décoction. La supériorité du décocté par rapport au macérât indique que la température joue un effet positif améliorant l'extraction et respectivement l'activité antioxydante.

L'étude de **Jing Sun et *al.,* (2016)** sur la même plante à montrer des IC_{50} de 69,99 µg / ml et 35,18 µg / ml pour la tige et les feuilles respectivement lorsque l'extraction a été menée par l'éthanol. Ceci est en parfaite concordance avec l'IC_{50} de notre extrait obtenu à partir de la tige (59,88 µg / ml). Par contre l'extrait hydroéthanolique des feuilles présente un IC_{50} supérieur avec une valeur de 65.15 µg / ml.

Tableau 13 : Valeurs de CI_{50} des extraits des différentes parties de la plante *Silybum marianum* obtenu par macération et décoction.

Parties de la plante	Solvants d'extraction	IC_{50} (µg/ml)	
		Macération	**Décoction**
Feuilles	Eau	133,75±0,75	48,64 ± 1,50
	Méthanol	165,28±4,35	218,79 ± 2,36
	Acétone	72.65 ± 1,07	644.05±30,69
	Éthanol	65.15 ± 1.04	298.40 ± 4,64
Tige	Eau	322.36 ±23.25	23.41 ± 0.42
	Méthanol	256.25 ±19.36	20.04 ± 0.34
	Acétone	287.77 ±13.86	25.29± 0.53
	Éthanol	59,88 ± 6.61	17.67 ± 0.62
Fleurs	Eau	601.60 ± 26.41	09.59 ± 0.14
	Méthanol	130.27 ± 0.79	27.60 ± 4.15
	Acétone	523.17 ± 65.49	10.77± 0,13
	Éthanol	319.64 ± 128.36	**2.099 ± 0,08**

Selon nos résultats, l'extrait aqueux des feuilles par macération a donné une IC_{50} de 133,75 µg / ml. Cette valeur est quatre fois supérieure à celle trouvée par **Gamil et *al.,* (2013)** indiquant une valeur de'IC_{50} de 30.34 µg /ml. Par contre notre extrait aqueux de feuilles par décoction a donné une valeur d'IC_{50} de 48,64 µg / ml. En revanche les mêmes travaux montrent que l'extrait méthanolique des feuilles présente un effet anti radicalaire important (IC_{50} de 16.48 µg / ml), comparativement à notre extrait méthanolique (IC_{50} de 165,28 µg /ml).

Akhtar et *al*., (2015) rapportent un pouvoir antioxydant assez intéressant de l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante *Silybum marianum* avec un IC_{50} de 25 µg / ml. Cette différence entre les résultats peut-être due à la méthode d'extraction ou expliquée par la composition, la teneur en composés phénoliques et respectivement l'activité antioxydante qui varient selon les organes de la plante, l'origine géographique et à la période de la récolte.

D'une manière générale, ces résultats sont en accord avec la littérature qui suggère que l'activité antioxydante des extraits de la plante dépend du type du solvant d'extraction et de sa polarité.

La décoloration du DPPH en présence de l'antioxydant est réalisée en acceptant un électron ou un atome d'hydrogène cédé par un composé antioxydant **(Apostolou *et al.,* 2013).**

Ainsi, la capacité antioxydante des composés phénoliques est associée à la disponibilité de ces derniers qui agissent en tant que piégeurs des radicaux pour les donneurs d'hydrogène **(Proestos et *al.*, 2013).** Plusieurs études ont démontré que la capacité antioxydante des extraits de plantes est fortement liée au contenu phénolique. Cette activité qui semble ne pas être la propriété d'un composé phénolique simple, mais plutôt répartie entre les constituants phytochimiques phénoliques, en particulier, les anthocyanes, les flavonoïdes et les acides phénoliques qui sont responsables de la capacité antioxydante **(Belmimoun, 2016).**

Selon **Turkmen et *al*., (2007)**, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH en raison de leur chimie structurale idéale. Il a été démontré par **De Pooter et *al.,* (1986)**, que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène.

Les flavonoïdes sont généralement de puissants antioxydants. Certains de ces composés présentent en effet une activité antioxydante jusqu'à 200 fois supérieure à celle de la vitamine E **(Massaux, 2012).** Les flavonoïdes en général et les flavan-3-ols en particulier sont de bons piégeurs des radicaux libres. Ces derniers possèdent des propriétés antioxydantes puissantes. Le nombre et/ ou la position des groupes hydroxyle sur les noyaux de ces molécules (la présence de 3',4'-dihydroxy, la présence du groupe *o*-dihydroxy sur le noyau aromatique B ; et la présence du 3-OH du cycle C), substitution sur les cycles B et A avec la présence de la double liaison C_2-C_3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C renforcent l'activité antioxydante des flavonoïdes **(Cai et *al.*,2006 ; Tuberoso et *al.,* 2010).**Cette caractéristique structurale peut-être observée dans les flavonols comme le kaepmoférol et la quercétine où l'activité antioxydante est croissante en fonction du nombre des groupements OH dans la molécule **(Le et *al*., 2007).** Il existe quelques flavonoïdes qui réagissent rapidement avec le radical $DPPH^{\bullet}$. Cela peut-être expliqué par la présence des groupes hydroxyles dans la structure de ces molécules, en particulier les substitutions 3_OH **(Sharififar et *al.,* 2009)**

La polarité de ces solvants leur confère un pouvoir extractant important vis-à-vis des molécules polaires actives, telles que certains composés phénoliques, qui peuvent libérer des hydrogènes ou des électrons **(El-Haci, 2014).** De plus, les tanins sont doués d'une grande capacité antioxydante due à leur noyau phénol **(Peronny, 2005),** ils ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation des lipides **(Perret, 2001). Vermerris & Nicholson (2006)** signalent que la forte activité antioxydante est liée à la complexité des extraits bruts en substances polyphénoliques y compris les flavonoïdes, les tanins et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante.

Bourgou et *al*., (2008), expliquent que les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, parce que la synergie entre les différents produits chimiques doit être prise en considération dans l'activité biologique.

II.4. Corrélation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en composés phénoliques des différents extraits de *Silybum marianum*

Vu qu'il existe un grand nombre de composés antioxydants qui pourraient contribuer à la capacité antioxydante, nous ne pouvons pas savoir quels sont les composants responsables de la capacité antioxydante observée sans procéder par des études analytiques plus approfondies. Plusieurs auteurs ont annoncé dans la littérature que le potentiel d'activité antioxydante d'un extrait dépend de sa teneur en composés phénoliques. Pour explorer l'influence des constituants phytochimiques sur la capacité antioxydante, nous avons déterminé la corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par macération et décoction.

Pour les extraits obtenus par macération, les résultats portés dans le tableau (14) montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en flavonoïde et la capacité antioxydante totale (R^2 =0.0054) des extraits de feuilles ; cependant cette relation est faible avec les polyphénols avec R^2 = 0.2446. Par contre, l'activité réductrice est fortement liée à la teneur en tanins condensés avec R^2 =0.9712.

Pour les extraits des tiges une corrélation forte a été établie entre les teneurs en polyphénols et la capacité antioxydante totale (R^2 =0.787), mais cette relation n'existe pas entre les teneurs en flavonoïdes (R^2 =0.1318) et les teneurs en tanins condensés (R^2 =0.1825). Une corrélation linéaire modérée a été établie entre les teneurs de polyphénols contenues dans les

extraits de fleurs et la CAT (R^2 =0.519) et une forte réponse avec les tanins condensés (R^2=0.7148) mais pas de corrélation avec les flavonoïdes (R^2 =0.0259).

Tableau 14 : Relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et les tanins condensés des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par macération.

Macération	**Feuille**	**Tige**	**Fleur**
	CAT	CAT	CAT
Polyphénols	0.2446	**0.787**	0.519
Flavonoïdes	0.0054	0.1318	0.0259
Tanins condensés	**0.9712**	0.1825	**0.7148**

L'examen de ces résultats par la méthode décoction permet de mettre en évidence une corrélation linéaire forte entre les polyphénols et la CAT avec un R^2=0.6193, et il n'y a pas de relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en tanins condensés et en flavonoïdes dans les extraits des feuilles avec un R^2 = 0.1607et un R^2 =0.2621 respectivement (Tableau 15).

Des corrélations importantes ont été observées entre les teneurs en polyphénols (R^2=0.5144) et une forte corrélation en tanins condensés (R^2=0.9379) avec la CAT dans les extraits des tiges de *Silybum marianum.* Pour les flavonoïdes, le coefficient de corrélation est égale à 0.0044.

Nous remarquons la présence d'une faible corrélation entre les teneurs en phénols totaux (R^2=0.2773) et en tanins condensés (R^2=0.2916). Par contre une meilleure corrélation existe entre la capacité antioxydante totale et les flavonoïdes (R^2=0.8442) dans les extraits de fleurs.

Tableau 15 : Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tanins) et la CAT des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par décoction.

Décoction	**Feuille**	**Tige**	**Fleur**
	CAT	**CAT**	**CAT**
Polyphénols	0.6193	0.5144	0.2773
Flavonoïdes	0.2621	0.0044	**0.8442**
Tanins condensés	0.1607	0.9379	0.2916

Au regard de ces résultats, il est à suggérer que les polyphénols contenus dans les extraits de tiges et de fleurs obtenues par macération soient responsables de la capacité antioxydante totale avec respectivement un coefficient de corrélation (R^2 =0.7840) et (R^2 =0.5190).

Les tanins condensés des extraits de feuilles et de fleurs obtenues par macération sont responsables de la capacité antioxydante totale avec respectivement une corrélation très forte (R^2 =0.9712) et (R^2 =0.7148). Par contre dans la méthode de décoction, les tanins condensés et les polyphénols contenus dans les extraits des tiges sont responsables de cette activité avec des R^2=0.9379 et R^2=0.5144. Ainsi les polyphénols des feuilles présentent une fort capacité antioxydante totale (R^2=0.6193). Les flavonoïdes interviennent seulement dans les extraits de fleurs (R^2=0.8442).

Les flavonoïdes contenus dans les différentes parties utilisées à l'exception des extraits de fleurs (R^2=0.8442) par décoction, ne présentent pas une corrélation avec la capacité antioxydante totale avec des coefficients de corrélation compris entre : 0.0044 et 0.2621, ce que révèle la présence d'autres molécules antioxydantes actives qui appartiennent aux polyphénols totaux **(Moulay, 2012).**

II.5. Corrélation entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tanins) et les IC50

Les coefficients de corrélations entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante par la méthode DPPH sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Corrélations linéaires entre le pouvoir antiradicalaire (IC_{50}) et les composés phénoliques des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par macération.

Macération	**Feuille**	**Tige**	**Fleur**
	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}
Polyphénols	0.0146	0.0108	0.3302
Flavonoïdes	0.1933	**0.5476**	0.3587
Tanins condensés	0.0139	0.0211	0.1293

Les résultats (Tableau16) révèlent la présence d'une corrélation linéaire entre le pouvoir anti- radicalaire et la teneur en flavonoïdes (R^2=0.5476) des extraits des tiges obtenus par macération. Par contre, la corrélation entre le pouvoir anti- radicalaire de ces extraits et la

teneur en polyphénols totaux et les tanins condensés, ne présente pas de relation avec respectivement des coefficients de 0.0108 et 0.0211. Aucune corrélation n'a été constatée entre les composés phénoliques et l'activité antiradicalaire des extraits de feuille obtenus par macération.

La corrélation entre les IC_{50} et les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de la fleur sont faibles, avec des coefficients de corrélation R^2 de 0.3302 et 0.3587 respectivement. Cette corrélation est encore plus faible avec les tanins condensés (R^2=0.1293).

Les résultats obtenus dans le tableau (17) ont révélé qu'il n'existe aucune corrélation (R^2 =0.0004) entre les composés phénoliques contenus dans les extraits des feuilles obtenus par décoction et l'activité antioxydante mesurée par la méthode du test DPPH. Mais cette relation est faible avec les tanins condensés (R^2=0.3565). Par contre cette activité est fortement liée à la teneur en flavonoïdes avec R^2=0.6489**.**

La capacité de piégeage du radical libre de DPPH des extraits de tiges est fortement corrélée aux teneurs des polyphénols totaux et des flavonoïdes avec respectivement des coefficients de corrélation R^2de 0.7652 et 0.7220, mais cette relation est faible avec les tanins condensés (R^2=0.4251).

Il existe une corrélation linéaire importante entre le pouvoir antiradicalaire des extraits de fleurs et les teneurs en flavonoïdes (R^2 =0.6586). Par contre la corrélation est faible en fonction de la teneur en polyphénols (R^2 =0.3940) et, est absente en fonction de la teneur en tanins condensés (R^2 =0.080).

Tableau 17 : Corrélations linéaires entre les teneurs (phénols totaux, flavonoïdes, tanins) et les IC_{50} des extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenu par décoction.

Décoction	**Feuille**	**Tige**	**Fleur**
	IC_{50}	**IC_{50}**	**IC_{50}**
Polyphénols	0.0004	0.7652	0.3940
Flavonoïdes	0.6489	0.7220	0.6586
Tanins condensés	0.3565	0.4251	0.080

Pour les différents extraits des trois parties de la plante utilisée (feuille, tige et fleur), les flavonoïdes présentent une bonne corrélation avec les valeurs d'IC_{50} du test DPPH. Ce qui confirme que les flavonoïdes sont les antioxydants majoritairement responsables de l'activité antioxydante. Cela s'explique par un mécanisme de transfert d'électrons qui augmente la capacité de réagir comme réducteurs **(Chaouch, 2014).**

On remarque que les polyphénols et les tanins des trois parties, ne présentent pas une corrélation avec les valeurs d'IC_{50} du test DPPH, les coefficients de corrélation sont compris entre (0.004-0.394) pour les polyphénols, et entre (0.0139-0.3565) pour les tanins condensés.

Le potentiel antioxydant peut-être attribué de manière générale, aux composés phénoliques des trois parties utilisées de la plante *Silybum marianum*, ce qui a été confirmé par certains travaux qui ont montré que les teneurs en composés phénoliques sont responsables des activités antioxydantes élevées **(Liu et *al*., 2008 ; Benhammou et *al.,* 2008 ; Turumtay et *al.*, 2014).**

Les flavanolignanes principalement la silandrine, la 3-deoxysilychristine, la silibinine, la silymonine, la silydianine et le quercétol sont les principaux composants responsables de cette activité antioxydante **(Hikino, et *al.,* 1984).**

Omar et *al*., (2012) ont déjà identifié la présence des différents composés phénoliques comme la silychristine, la silydianine, la silybine et la taxifoline dans les extraits de feuilles.

Les travaux de **Ghafor et *al*., (2014)** révèlent la richesse de l'extrait de tige en acides phénoliques (l'acide coumarique, acide ferrulique, acide gentisique, acide chlorogénique ...), et en flavonoïdes comme : le kaepmoférol, iso-quercétine et léotolin. Les flavonolignanes restent à des proportions différentes.

La partie aérienne renferme des flavonoïdes : apigénine, kaempférol, lutéolol et leurs hétérosides **(Charrié et *al*., 2017).** Ces composants expliquent leurs propriétés antioxydantes et leur capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène.

Les travaux de **Moure et *al*., (2001),** ainsi que ceux de **Sun et *al*., (2005)**, indiquent qu'une activité antioxydante puissante n'est pas due nécessairement à la forte teneur en polyphénols.

Selon **Rice-Evans et *al*., (1997),** la seule explication de l'absence de corrélation est due à la synergie des composés phénoliques dans les extraits et que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration mais aussi de la structure de ces molécules.

Les activités antioxydantes sont plus variables chez les espèces de la plante (inter-espèce) que dans la même espèce (intra-espèce) **(Ksouri et *al.*,2008).**

Toutes ces activités sont peut-être dûes à l'influence de la répartition des composés phénoliques dans la plante (aux niveaux tissulaires, niveaux cellulaires et subcellulaires). Les phénols insolubles sont les composants des parois cellulaires, tandis que les composés phénoliques solubles sont cloisonnés dans les vacuoles des cellules végétales. Les plantes contiennent plus de composés phénoliques au niveau des couches externes que dans leurs parties intérieures.

II.6. Évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits

II.6.1. Évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des différents extraits de *Silybum marianum* contre des micro-organismes de référence est évaluée qualitativement par la méthode de diffusion de disques sur milieu solide. Cette technique permet de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis des extraits.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits sont repris dans les tableaux 18,19 et 20, qui comportent les valeurs en (mm) zones ou diamètres d'inhibitions de l'activité antimicrobienne des extraits, du DMSO et des antibiotiques. Les extraits qui semblent être efficaces et puissants révèlent l'apparition de zones d'inhibitions importantes. Les résultats du témoin négatif testé (DMSO) n'ont aucun effet sur les souches étudiées. Cependant toute action inhibitrice observée est donc due à la présence des molécules actives dans les extraits testés.

II.6.1.1. Le pouvoir antibactérien des différents extraits des feuilles de *Silybum marianum*

Le pouvoir antibactérien des différents extraits de feuilles de *Silybum marianum* obtenu par macération et décoction, en utilisant quatre solvants d'extraction est plus ou moins important selon la nature de la souche. Ce test a montré une grande hétérogénéité dans les résultats. Ainsi, on peut classer la sensibilité des bactéries cibles envers les différents extraits selon les diamètres des halos d'inhibition (Tableau 18).

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles obtenus par macération et décoction ne révèlent aucune activité sur la souche *Salmonella abony* qui montre une totale résistante (6 mm) sauf pour l'extrait : Fe ETOH M qui présente une sensibilité (8 mm). De plus, tous les extraits de feuilles obtenus par décoction ont réagi négativement sur la *souche Pseudomonas aeruginosa* (6 mm) à l'exception de l'extrait Fe Ac D qui présente une activité inhibitrice avec un diamètre de 10 mm.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les extraits : Fe Ac M, Fe ETOH M, Fe ETOH D et Fe Aq D sur la *souche Staphylococcus* aureus. L'extrait : FeAq D, ne montre aucune activité antibactérienne vis-à-vis *de Bordetella branchiseptica*

Les autres souches se comportent différemment vis –à-vis de tous les extraits testés avec des diamètres compris entre 8-11mm. Celles qui ont une certaine sensibilité à ces extraits, ont des diamètres compris entre 9 et 14mm. L'activité la plus élevée a été observée pour l'extrait hydro-éthanolique des feuilles obtenu par décoction contre la souche *Bordetella branchiseptica* avec une zone d'inhibition assez grande (14 mm), sauf qu'elle est très sensible à l'érythromycine (17 mm) et la gentamycine (30 mm).

Tableau 18 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits des feuilles de *Silybum marianum* et des contrôles.

Bactéries	Diamètres d'inhibition (Ø mm)										
	Fe Aq M	**Fe MeOH M**	**Fe Ac M**	**Fe ETOH M**	**Fe Aq D**	**Fe MeOH D**	**Fe Ac D**	**Fe ETOH D**	**Érythromycine (15µg/disque)**	**Gentamycine (15µg/disque)**	**DMSO (5 µl)**
Bactéries Gram +											
Bacillus subtilis ATCC 6633	8	6	10	8	9	9	6	6	30	20	6
Micrococcus luteus ATCC 10240	10	9	11	8	8	11	11	11	31	22	6
Staphylococcus aureus ATCC 6538	10	9	6	6	6	10	7	6	15	11	6
Bactérie Gram –											
Salmonella abony ATCC 6017	6	6	6	8	6	6	6	6	31	20	6
Escherichia coli ATCC 8739	8	9	11	9	9	9	8	11	28	20	6
Bordetella branchiseptica ATCC 4617	9	8	9	9	6	10	7	**14**	30	17	6
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	10	11	10	8	6	6	10	6	11	19	6

II.6.1.2. Le pouvoir antibactérien des différents extraits de la tige de *Silybum marianum*

Les résultats illustrés dans le tableau (19) montrent que les trois souches *Salmonella abony*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, se sont montrées résistantes envers tous les extraits de tige, à l'exception de la souche *Salmonella abony* qui présente une sensibilité (8mm*)* à l'extrait hydro-éthanolique obtenu par macération (T ETOH M).

La souche *Bacillus subtilis* et la souche *Microccocus luteus* sont résistantes (6 mm) aux extraits hydro-éthanoliques des tiges obtenus par décoction et macération.

Toutes les souches bactériennes testées se sont montrées totalement résistantes à l'extrait aqueux de la tige obtenu par macération (T Aq M) et décoction (TAq D), avec des zones d'inhibition comprise entre 6 à 7 mm, à l'exception de la souche *Bordetella branchiseptica* qui présente une forte sensibilité (11 mm) à l'extrait aqueux de tiges obtenu par décoction (T Aq D).

Les deux souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont sensibles à l'extrait hydro-acétonique obtenu par décoction (T Ac D) avec un diamètre d'inhibition de 11mm. La souche *Bordetella branchiseptica* révèle une sensibilité vis-à-vis de l'extrait hydro-acétonique obtenu par macération de tiges (12 mm).

Les deux extraits hydro-méthanolique (T MeOH M) et hydro-acétonique (T Ac M) de tiges obtenus par macération exercent une certaine activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis et Microccocus luteus* (11 mm).

L'activité la plus élevée a été observée pour l'extrait hydro-méthanolique (T MeOHD) vis-à-vis de *Microccocus luteus* avec une zone d'inhibition assez grande (15 mm) mais inférieure à celles enregistrées par la gentamycine (22 mm) et l'érythromycine (31mm).

Un autre effet remarquable des deux extraits hydro-acétoniques obtenus par macération et décoction *vis-à-vis d'Escherichia coli,* dévoile des diamètres d'inhibition de 14 et 13 mm respectivement, la souche *Escherichia coli* reste beaucoup plus sensible à la gentamycine (20 mm) et l'érythromycine (28 mm).

Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits des tiges de *Silybum marianum* des contrôles.

Bactéries	Diamètres d'inhibition (Ø mm)										
	T Aq M	**T MeOH M**	**T Ac M**	**T ETOH M**	**T Aq D**	**T MeOH D**	**T Ac D**	**T ETOH D**	**Érythromycine (15µg/ disque)**	**Gentamycine (15µg/disque)**	**DMSO (5 µl)**
Bactérie Gram +											
Bacillus subtilis ATCC 6633	6	11	11	7	6	9	10	6	30	20	6
Micrococcus luteus ATCC 10240	7	11	11	6	6	**15**	7	6	31	22	6
Staphylococcus aureus ATCC 6538	7	6	6	7	6	6	11	6	15	11	6
Bactérie Gram –											
Salmonella abony ATCC 6017	6	6	6	8	6	6	6	6	31	20	6
Escherichia coli ATCC 8739	6	9	**14**	9	6	9	**13**	9	28	20	6
Bordetella branchiseptica ATCC 4617	7	11	12	8	11	9	9	10	30	17	6
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	6	6	6	6	6	6	11	6	11	19	6

II.6.1.3. Le pouvoir antibactérien des différents extraits des fleurs de *Silybum marianum*

Les résultats obtenus, illustrés dans le tableau 20 montrent que la souche *Salmonella abony* est totalement résistante aux extraits de fleurs mais sensible aux extraits hydroacétonique (Fr Ac D) et hydroéthanolique (Fr ETOH D) obtenus par décoction et par macération (Fr ETOH M) avec respectivement des zones d'inhibition de 10 et 9 mm. La souche *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance (6 mm) pour les extraits : Fr Ac M, Fr ETOH M, et Fr

ETOH D. La souche *Staphylococcus* aureus s'est montré résistant (6 mm) pour les extraits : Fr Aq M et Fr Ac M.

Les souches qui ont une certaine sensibilité à différents extraits ont des diamètres d'inhibition compris entre 8 et 16mm. Les plus sensibles sont :

- La souche *Staphylococcus* aureus vis à vis de l'extrait hydroacétonique de fleurs (Fr Ac D) et hydroéthanolique (Fr ETOH D) obtenu par décoction avec un diamètre (12 mm). La réaction est plus importante que celle de la gentamycine (11 mm) et inférieure à celui-ci enregistrée par l'action d'érythromycine (15 mm).
- La souche *Pseudomonas aeruginosa* vis –à- vis de l'extrait hydro-méthanolique de fleurs, obtenu par décoction, qui se traduit par la plus grande zone d'inhibition enregistrée de 15 mm. Elle est supérieure au diamètre donné par l'action d'érythromycine (11 mm), mais inférieure à celui enregistrée par la gentamycine (19 mm).
- La souche *Micrococcus luteus* vis à vis de l'extrait hydroéthanolique de fleurs obtenu par décoction avec une plus grande zone d'inhibition (16 mm). Mais elle est inférieure au diamètre donné par l'action d'érythromycine (31 mm) et l'action de la gentamycine (22 mm).

Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des différents extraits des fleurs de *Silybum marianum* et des contrôles.

Bactéries	**Diamètres d'inhibition (Ø mm)**										
	Fr Aq M	Fr MeOH M	Fr Ac M	Fr ETOH M	Fr Aq D	Fr MeOH D	Fr Ac D	Fr ETOH D	Éryt (15µg/ disque)	Gen (15µg/ disque)	DMSO (5 µl)
Bactérie Gram +											
Bacillus subtilis ATCC 6633	9	10	9	10	7	9	7	10	30	20	6
Micrococcus luteus ATCC 10240	9	10	10	10	11	7	10	**16**	31	22	6
Staphylococcus aureus ATCC 6538	6	10	6	9	9	10	12	12	15	11	6
Bactérie Gram –											
Salmonella abony ATCC 6017	6	6	6	9	6	6	10	9	31	22	6
Escherichia coli ATCC 8739	9	9	9	10	9	7	11	10	28	20	6
Bordetella branchiseptica ATCC 4617	11	11	10	11	8	8	11	12	30	17	6
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	11	12	6	6	9	**15**	10	6	11	19	6

Ces dernières années, plusieurs travaux ont été réalisés portant sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne d'extraits issus de divers plantes médicinales. Les résultats montrent que tous les extraits possèdent une activité antimicrobienne sur au moins une des souches bactériennes testées. Cependant, selon **Hassan et *al.*, (2006)** seules les zones d'inhibition supérieures à 10 mm sont considérées comme positives**.**

L'étude phytochimique des différents extraits de trois parties de *Silybum marianum* a permis de déterminer les principaux groupes chimiques présents qui peuvent être à l'origine de l'activité antibactérienne des extraits actifs. Le screening phytochimique nous permet également d'observer des variations dans la composition chimique des extraits telle la présence remarquable de flavonoïdes, de tanins, d'alcaloïdes, de stérols et triterpènes, et de

glucosides cardiotoniques. Ces composés phénoliques sont doués d'activité antimicrobienne importante, et possèdent des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes, cette activité est probablement due à leurs diversités structurales **(Cowan ,1999).**

L'activité des flavonoïdes est probablement due à leur capacité de se complexer aux protéines solubles ainsi qu'aux parois cellulaires des bactéries. Cependant, les flavonoïdes à caractère lipophile peuvent détruire les membranes microbiennes en augmentant la fluidité des lipides membranaires **(Daglia, 2012),** alors que les tanins exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie. Ceci permet ainsi de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes **(Hilliard, 1995 ; Cowan, 1999).**

Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Plusieurs travaux ont mis en évidence la sensibilité des bactéries Gram+ par rapport au Gram$^-$, ceci peut-être prêté à la différence dans la structure et la composition de leurs parois cellulaires. En effet les bactéries Gram– possèdent une membrane externe plus rigide, riche en phospholipides, en lipopolysaccharides et en protéines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaires, alors que les bactéries à Gram+ ont une couche externe plus perméable riche en peptidoglycanes.

D'après nos résultats, on remarque que certains extraits sont actifs sur les bactéries Gram+ et Gram$^-$, ce qui est en accord avec les travaux de **Hassan et *al., (*2009).** Ses résultats montrent que l'extrait aqueux obtenu par décoction et l'extrait hydroéthanolique acquis par macération de graines de *Silybum marianum* sont actifs envers les bactéries Gram négatives et Gram positives.

Plusieurs travaux antérieurs, ont déduit que la nature du solvant et la méthode d'extraction influent directement sur la composition des extraits et que par conséquent sur leur activité antimicrobienne **(Chaouch, 2014).**

Koperuncholan et *al.,* (2012), ont montré que l'extrait éthanolique des feuilles exerce une activité inhibitrice sur les bactéries Gram négatives et Gram positives. Les résultats de **Belmimoun (2016)** sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de *Zygophyllum album* et

Myrtus communis, suggèrent que les composés de ces extraits endommagent la fonction de la paroi cellulaire des bactéries Gram+ et Gram-. De même, les résultats de **Yala (2016)** montrent que l'extrait aqueux *d'Eryngium foetidium* présente une meilleure activité sur les bactéries Gram+ que sur les Gram-.

Le mécanisme d'action impliquée dans la destruction des bactéries peut-être expliqué par plusieurs hypothèses, telles les interactions entre le composé antimicrobien avec la membrane cellulaire, l'inhibition des enzymes qui participent dans la production d'énergie cellulaire et l'inhibition de synthèse d'ARN.

Les travaux de **Hassan et *al*., (2009)**, montrent que l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux obtenu par décoction et l'extrait hydroéthanolique par macération des graines de *Silybum marianum* sont actifs contre *Bacillus subtils, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus et Salmonella.*

Les travaux de **Koperuncholan et *al.,* (2012)** ont montré une activité inhibitrice remarquable de l'extrait éthanolique de feuilles de 7 à 13 mm contre *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* (Gram positif), de 8 à 14 mm contre les bactéries *Salmonella paratyphi* (Gram négatif) et une zone d'inhibition allant de 8 à 12 mm contre les bactéries Gram négatives telles que : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait hydro-éthanolique des feuilles obtenu par macération et décoction n'a aucune activité antibactérienne sur les souches *Salmonella abony, Pseudomonas* a*eruginosa et Staphylococcus aureus.* Par ailleurs, *Bacillus subtilis et Escherichia coli* sont plus sensibles avec une zone d'inhibition allant de 8 à 11 mm.
Une étude réalisée par **Syed Muhammad *et al.,* (2013)** sur l'effet antibactérien de l'extrait hydro-méthanolique des fleurs sur les deux bactéries Gram + *: Staphylococcus aureus* et Bacillus *subtillis*, a donné un effet respectivement remarquable avec une zone d'inhibition plus grande comprise entre (19 et 22 mm) et (17-22 mm). Par contre cet extrait est inactif sur des germes Gram négatifs testés (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi)*. L'inefficacité de certains extraits contre les souches testées peut-être expliquer par la faible capacité des composés antibactériens présents dans les extraits, et leur diffusion de manière uniforme à travers l'agar.

Les résultats d**'Oshaghi & Roya (2016)** rejoignent celle de **Syed Muhammad et *al*., (2013)** où l'extrait méthanolique de *Silybum marianum* exerce une action négative sur plusieurs

bactéries Gram- tel que : *Salmonella sp, E. coli.* Par ailleurs l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique de *Silybum marianum* vis-à-vis d'*Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de 25 mm a été également rapporté par **Al-Obaidi (2017).**

Nos résultats révèlent l'action modérée de l'extrait hydro-méthanolique des fleurs sur la croissance d'Escherichia *coli, de Staphylococcus aureus et de Bacillus subtilis* avec des diamètres respectifs d'inhibition de (9, 10 et 10mm), mais sans aucun effet sur *Salmonella abony*. Par contre cet extrait a une activité antibactérienne assez remarquable sur la souche *Pseudomonas aeruginosa*, avec une zone d'inhibition plus grande comprise entre (12 et 15 mm) respectivement.

Les résultats de **Puri et *al.,* (2015)** ont montré que l'extrait hydroéthanolique de la plante entière de *Silybum marianum* obtenu par une extraction au Soxhlet a des effets antimicrobiens plus importants sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Escherichia coli* (ATCC 25922*)* avec respectivement des zones d'inhibition de 11mm, 7mm et 5mm.

Les résultats de **Kumar & Mishra (2015)** ont indiqué que les extraits obtenus par l'utilisation des différents solvants d'extraction (éthanol, méthanol, éther de pétrole, acétone et eau) à partir des graines de *Silybum marianum* ont un effet antimicrobien sur les bactéries Gram positif (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* et *Staphylococcus aureus*) et que l'extrait éthanolique a montré une activité antibactérienne maximale.

Notre résultat est en parfaite concordance avec ceux de **Kumar et Mishra (2015),** ou l'extrait hydroéthanolique des fleurs par décoction a donné une zone d'inhibition de 16 mm).

Une autre étude réalisée par **Akhtar (2015)** sur l'effet antibactérien de 61 espèces collectées au Pakistan montrent que l'extrait aqueux obtenu par macération des parties aériennes de la plante *Silybum* n'a aucun effet sur les six souches bactériennes testées (*Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 15224) *et Bordetella bronchiseptica* (ATCC 4617). Alors que l'extrait méthanolique obtenu par le chloroforme a donné un effet remarquable vis-à-vis d'*Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de 9.5 mm.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Adejare et *al.* (2013) ; Chaouch (2014) et Yala et *al*. (2016)**, qui ont déduit que la nature du solvant et la méthode d'extraction influent directement sur la composition des extraits, par conséquent sur leur activité. Il est important

de souligner que la méthode utilisée (choix des solvants), les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid) affectent le contenu total en polyphénols et flavonoïdes, et par conséquent les activités biologiques de ces métabolites.

Le solvant est un facteur majeur qui détermine la nature et la concentration des composés actifs présents dans l'extrait brut. La solubilisation des composés dépend de leur affinité avec le solvant. Les différences de polarité entre les divers solvants permettent donc de cibler des groupes de molécules spécifiques. Les substances naturelles, dans certains cas, ne sont pas distribuées de façon homogène dans la plante. En effet, on trouve dans la plante une fraction de solutés facilement accessibles et une fraction non accessible contenue dans les cellules intactes de la plante et dans la plupart des cas, l'extraction est alors limitée par la diffusion **(Perrut ,2008).**

II.6.2. Étude de la CMI des différents extraits bruts par méthode de dilution sur milieu gélosé

L'ensemble des extraits bruts des différentes parties de *Silybum marianum* a fait l'objet d'une étude sur l'évaluation de leur activité antibactérienne par le biais de la méthode des dilutions sur milieu solide ou CMI en milieu solide.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration de l'extrait qui ne montre pas de culture visible. L'activité inhibitrice des extraits a été identifiée dans une plage de concentration de 6.25 à 200 mg/ml pour les différents extraits qui se sont montrés efficaces sur des germes testés.

Pour les souches bactériennes qui se sont montrées les plus sensibles (12 - 16 mm) par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, des valeurs de CMI ont été déterminées puis rapportées dans le tableau (21).

→ Pour *Bordetella branchiseptica* (Gram-), la concentration minimale inhibitrice de l'extrait hydro-éthanolique des feuilles par décoction, l'extrait hydro-acétonique de tiges par macération et l'extrait hydro-éthanolique des fleurs par décoction est à partir de 25 mg/ml.

→ Pour *Microccocus luteus* (Gram+), la concentration minimale inhibitrice de l'extrait hydro-méthanolique de tiges et l'extrait hydro-éthanolique de fleurs par décoction commence respectivement à partir de 6.25 et 12.5mg/ml.

→ La CMI pour *Escherichia coli* (Gram-), est à partir d'une concentration de 6.25 mg/ml et de 25 mg/ml pour les deux extraits hydro-acétoniques de tiges obtenus par décoction et par macération.

→ Pour l'extrait hydro-méthanolique des fleurs obtenu par macération et par décoction, la concentration minimale inhibitrice de *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), est respectivement à partir de 12.5 et 25 mg/ml.

→ La CMI pour *Staphylococcus aureus* (Gram+), commence à partir de 12.5 et à partir de 25 mg/ml pour l'extrait hydro-éthanolique de fleurs et l'extrait hydro-acétonique par décoction. Pour *Bordetella branchiseptica* (Gram-), la concentration minimale inhibitrice de l'extrait hydroéthanolique de feuilles obtenu par décoction, l'extrait hydroacétonique de tiges obtenu par macération et l'extrait hydroéthanolique de fleurs obtenu par décoction est à partir de 25 mg/ml.

Tableau 21 : La CMI de certains extraits bruts de *Silybum marianum.*

Concentration (mg/ml)	Fe ETOH D	T Ac M		T Ac D	T MeOH D	Fr ETOH D			Fr METOH M	Fr METOH D	Fr Ac D
	Diamètres d'inhibition (Ø mm)										
	Bactérie Gram-	*Bactérie Gram-*	*Bactérie Gram-*	*Bactérie Gram-*	*Bactérie Gram+*	*Bactérie Gram+*	*Bactérie Gram+*	*Bactérie Gram-*	*Bactérie Gram-*	*Bactérie Gram-*	*Bactérie Gram+*
	Bordetella branchiseptica	*Bordetella branchiseptica*	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*	*Micrococcus luteus*	*Micrococcus luteus*	*Staphylococcus aureus*	*Bordetella branchiseptica*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*
6.25	**-**	**-**	**-**	**7**	**7**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
12.5	**-**	**-**	**-**	8	7	7	-	-	7	-	7
25	7	7	8	9	8	7	8	7	9	7	7
50	7	7	9	9	9	8	10	8	10	7	9
100	9	9	12	12	10	11	11	9	11	9	11
200	12	12	14	13	15	16	12	12	12	15	12

Les résultats de CMI ont montré des valeurs relativement élevé (6.25 jusqu'à 25 mg/ml), qui ne reflète pas la réelle efficacité antibactérienne d'un composé déterminer par la méthode de diffusion de disque. Ce qui est en accord avec les suggestions de **Cimanga et *al*., (2002)** et **Hadouchi et *al*., (2014).**

Cette variabilité d'efficacité des extraits végétaux peut dépendre du type de micro-organismes (Gram+ et Gram-), du type d'extrait, de sa concentration, de leur composition chimique, et

peut-être liée à la polarité des substances bioactives. **Cowan (1999)** supposait que l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés, les moins polaires dépourvus des groupements hydroxyles (OH) libres sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant des groupements hydroxyles.

À travers les résultats, on pourrait déduire que les différents extraits obtenus à partir de *Silybum marianum* possèdent des effets intéressants par rapport aux souches bactériennes testées. Des études complémentaires sont nécessaires pour l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

II.7. Analyses par HPLC des extraits de *Silybum marianum*

La composante phénolique des végétaux est constituée d'une variété de structures représentant la majorité des classes phénoliques. La combinaison des différentes structures, leurs proportions relatives ainsi que leurs interactions (synergisme ou antagonisme) sont à l'origine de la diversité de leurs activités biologiques **(Balasundram et *al*. ,2006).**

Les conditions expérimentales utilisées lors des analyses chromatographiques permettent d'envisager un ordre d'élution possible des composés polyphénoliques. Les composés les plus polaires sont moins retenus par la colonne C18 alors que ceux possédant un caractère apolaire se verraient plus retenus par celle-ci. L'ordre d'élution des molécules étant aussi déterminé par la nature et le gradient des solvants utilisés **(Rezaire, 2012).**

Le profil d'élution des composés issus de ces extraits a été suivi à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques. En effet, tous les phénols sont détectés dans la région des ultra-violets avec un pic d'absorption maximum à 280 nm dû à la présence du cycle phénolique (**Merken &Beecher, 2000).**

Les différents composés à analyser ont été identifiés par comparaison des temps de rétention des différents constituants des extraits avec ceux des différents standards en se référant à la littérature **(Wollgast & Anklam, 2000).**

Nos analyses réalisées par HPLC en phase inverse ont été effectuées sur les extraits de feuilles et de tiges (hydro-acétonique et hydro-éthanolique obtenus par macération et

décoction) et les extraits de fleurs (hydro-méthanolique obtenus par macération et décoction) montrent la richesse de ces trois parties en composés phénoliques.

II.7.1. Analyse des extraits obtenus de la tige

II.7.1.1 Analyse de l'extrait hydro- éthanoïque /décoction de tige

Le profil chromatographique de l'extrait hydro-éthanolique de la tige obtenu par décoction est représenté au niveau de la figure 36.

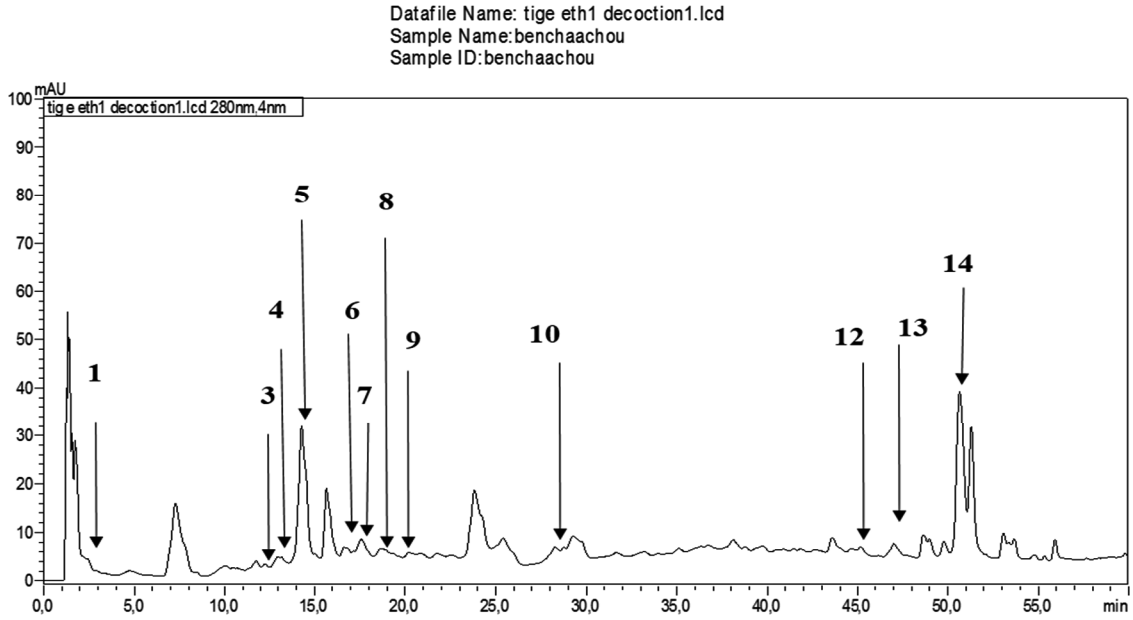


Figure 36 : Chromatogramme de l'extrait hydro- éthanolique /décoction de tige.

1 : acide tannique ; **3** : isosilychristine ; **4** : silychristine ; **5** : silydianine ; **6** : silybine A ; **7** : silybine B ; **8** : isosilybine A ; **9** : isosilybine B ; **10** : acide coumarique ; **12** : quercétine

13 : kaepmoférol ; **14** : apigenine.

Nous observons sur le chromatogramme de l'extrait hydro-éthanolique de la tige obtenu par décoction, la présence de quelques pics majoritaires à 280 nm qui laisserait supposer l'existence de certains composés phénoliques avec les aires suivantes : l'acide tannique (0.916 %), les flavonolignanes (isosilychristine (0.255%), silychristine (0.617%), silydianine (10.040%), silybine A (0.439 %), silybine B (2.70 %), isosilybine A (2.148%) et isosilybine B (0.903 %), d'autres flavonoïdes telles que : le kaepmoférol (0.118 %), l'apigenine (10.312) et la quercétine (0.476 %)et un acide phénolique : l'acide coumarique (0.542%).

Nous notons la présence dans le même profil d'autres molécules qui ont été fractionnées mais non identifiées, avec des temps de rétention de 1.320, 1.736,7.273, 15.66,

23.82 et 51.29 qui présentent respectivement des pics majoritaires avec des aires (%) : 5.137, 5.295, 6.352, 5.022, 8.179 et 6.072 %.

II.7.1.2. Analyse de l'extrait hydro- acétonique de la tige obtenue par macération

La séparation de l'extrait hydro-acétonique de tiges obtenu par macération, par la chromatographie liquide à haute performance HPLC en phase inverse est illustrée dans le spectre suivant :

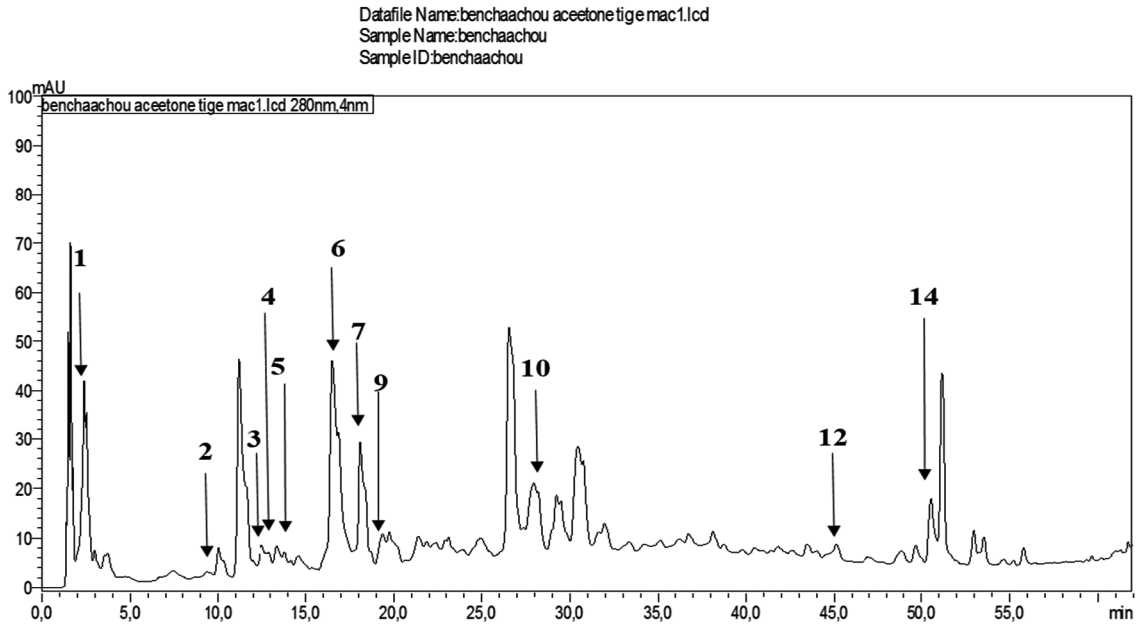


Figure 37 : Chromatogramme de l'extrait hydro- acétonique de la tige obtenue par macération.

1 : acide tannique ; **2** : taxifoline ; **3** : isosilychristine ; **4** : silychristine ; **5** : silydianine ; **6** : silybine a ; **7** : silybine b ; **9** : isosilybine b ; **10** : acide coumarique ; **12** : quercétine : **14** : apigenine.

Le chromatogramme obtenu pour l'extrait hydro-acétonique par macération de la tige de *Silybum marianum* présente des pics marqués tout au long de la ligne, qui suggère une forte hétérogénéité en nombre et en composition de l'extrait. Il montre aussi la présence de différentes familles polyphénoliques sur un chromatogramme de 60 min.

En se référant au temps de rétention des standards avec ceux des composés de l'extrait, il en ressort de la présence probable de certains composés phénoliques avec des aires dont le pourcentage est différent : l'acide tannique (un polyphénol de la famille des tanins : les

flavonolignanes (isosilychristine (1.090%), silychristine (0.531%), silydianine (0.566%), silybine A (4.093 %), **silybine B (5.122 %),** isosilybine B (1.200%). Il existe également d'autres flavonoïdes telles que : la taxifoline (0.302%), la quercétine (0.608%) et l'apigenine (2.122) et un acide phénolique : l'acide coumarique (1.427%).

Nous notons la présence dans le même profil, d'autres molécules qui ont été fractionnées avec des temps de rétention variables jusqu'à 61.722 min.

La comparaison entre les deux profils chromatographiques des extraits de tiges (hydroacétonique et hydroéthanolique obtenus respectivement par macération et décoction) montre la présence remarquable de la silydianine (aire % :10.040%) et l'apigenine (aire % : 10.312%) et l'absence de la taxifoline dans l'extrait hydro-éthanolique obtenu par décoction. Tandis que l'extrait hydroacétonique obtenu par macération présente des concentrations en acide tannique (aire % :4.095 %), en silybine A (aire % :4.093 %)et en silybine B (5.122 %), avec des aires (%)plus importantes que l'extrait hydroéthanolique obtenu par décoction.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Ghafor et *al*., (2014),** ils ont montré que l'extrait de tige est riche en acides phénoliques (acide coumarique, acide ferrulique, acide gentisique, acide chlorogénique ...), des flavonoïdes (le kaepmoférol, iso-quercétine, et léotolin) et de flavonolignanes (isosilychristine, silychristine, silydianine, silybine A, silybine B, isosilybine A et isosilybine B) avec des proportions différentes. Selon **Charrié et *al*., (2017)** ces molécules sont doués d'une bonne activité de piégeage des radicaux libres.

II.7.2. Analyse des extraits obtenus à partir des feuilles

II.7.2.1 Analyse de l'extrait hydro-éthanolique de la feuille obtenue par décoction

L'analyse de chromatogramme de l'extrait hydro-éthanolique de feuilles obtenu par décoction, représenté sur la figure 38, présente des pics marqués tout au long de la ligne, qui nous ont permis l'identification probable de certains composés phénoliques dans l'extrait.

Les résultats montrent la présence de l'acide tannique (1.463 %), l'isosilychristine (0.686 %), la silydianine (0.505 %), l'isosilybine A (5.896 %), l'isosilybine B (2.331 %), la quercétine (0.548%), la taxifoline (0.212 %), l'acide coumarique (0.467 %), la kaepmoférol (0.680 %) et la naringine (7.874%).

Nous notons la présence dans le même profil d'élution, de certains pics non identifiés obtenus avec des aires dont les pourcentages sont beaucoup plus importants (11.48 min : 3.243%), (33.82 min : 6.028%), (36.39 min : 3.081%), (37.304 :9.247%), et (45.087 : 1.479%).

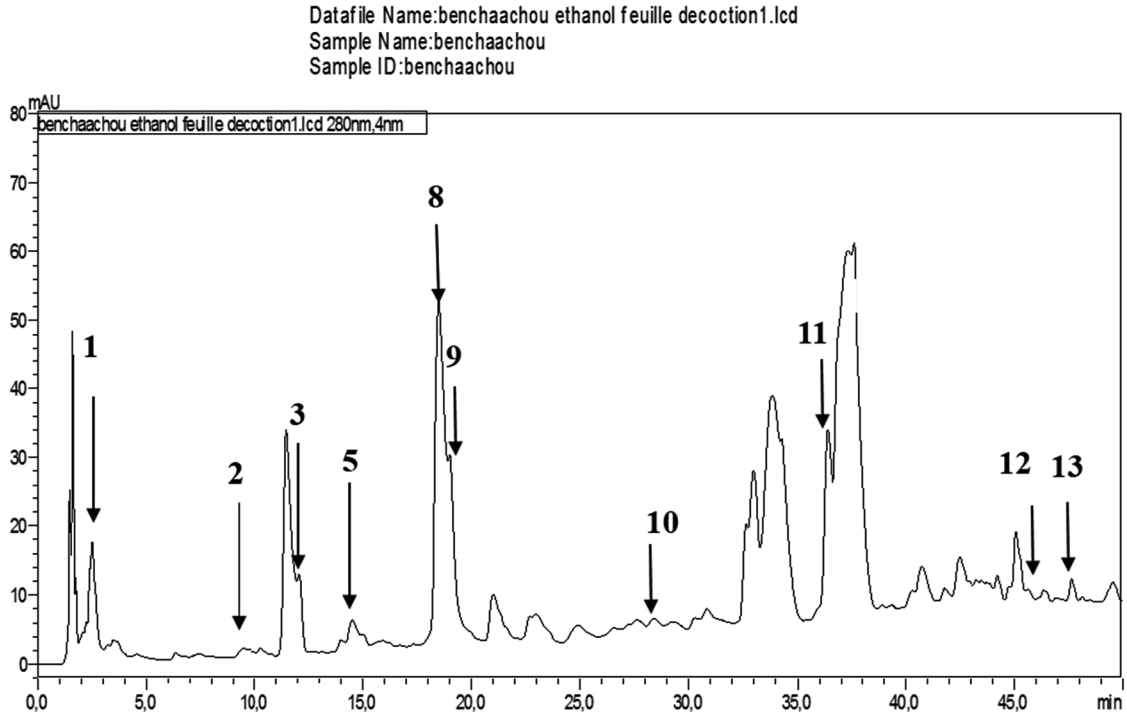


Figure 38 : Le profil chromatographique de l'extrait hydro-éthanolique de feuille obtenue par décoction.

1 : acide tannique ; **2** : taxifoline ; **3** : isosilychristine ; **5** : silydianine ; **8** : isosilybine A ; **9** : isosilybine B ; **10** : acide coumarique **; 11** : naringine, **12** : quercétine ; **13** : kaepmoférol.

II.7.2.2 Analyse de l'extrait hydro-acétonique de la feuille obtenue par macération

Le chromatogramme (Figure 39) obtenu pour l'extrait hydro -acétonique de feuille obtenu par macération de *Silybum marianum* présente des pics marqués tout au long de la ligne, qui nous a permis de suspecter la présence de différentes composées phénoliques : l'acide tannique (0.372), les flavonolignanes (isosilychristine (1.171 %), silydianine (0.714 %), silybine A (0.056 %), isosilybine A (10.482%) , isosilybine B (1.089%) ,taxifoline (0.162%) , la quercétine (2.468 %) ,l'acide coumarique(0.469 %) et la naringine (3.468%).

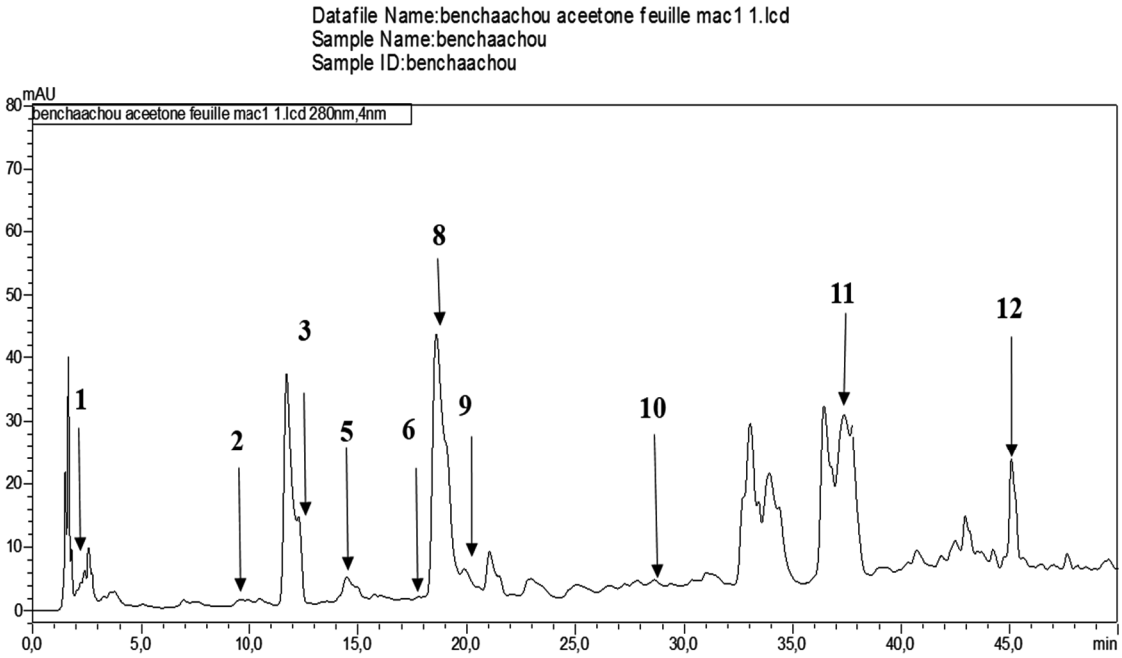


Figure 39 : Chromatogramme de l'extrait hydro-acétonique de la feuille obtenue par macération.

1 : acide tannique ; **2** : taxifoline ; **3** : isosilychristine ; **5** : silydianine ; **6** : silybine A ; **8** : isosilybine A ; **9** : isosilybine B ; 10 : acide coumarique ; **11** : naringine ; **12** : la quercétine.

En comparant les deux profils chromatographiques on constate que l'extrait hydro-acétonique de la feuille obtenue par macération est plus riche en isosilybine A (10.482%) et quercétine (2.468 %), alors que l'extrait hydro-éthanolique obtenu par décoction, présente un pic avec une aire en pourcentage important qui indique la naringine (7.874%).

Nos résultats sont en accord avec **Omar et *al*., (2012),** qui ont déjà identifié la présence des différents composés phénoliques comme la silychristine, la silydianine, la silybine A, la silybine B, l'isosilybine A, l'isosilybine B et la taxifoline dans les extraits de feuilles de *Silybum marianum.*

II.7.3. Analyse des 'extraits obtenus à partir des fleurs

II.7.3.1. Analyse de l'extrait hydro-méthanolique de la fleur obtenue par macération

Les résultats de la séparation des différents extraits des fleurs (hydro-méthanolique obtenue par macération et décoction par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans la figure suivante :

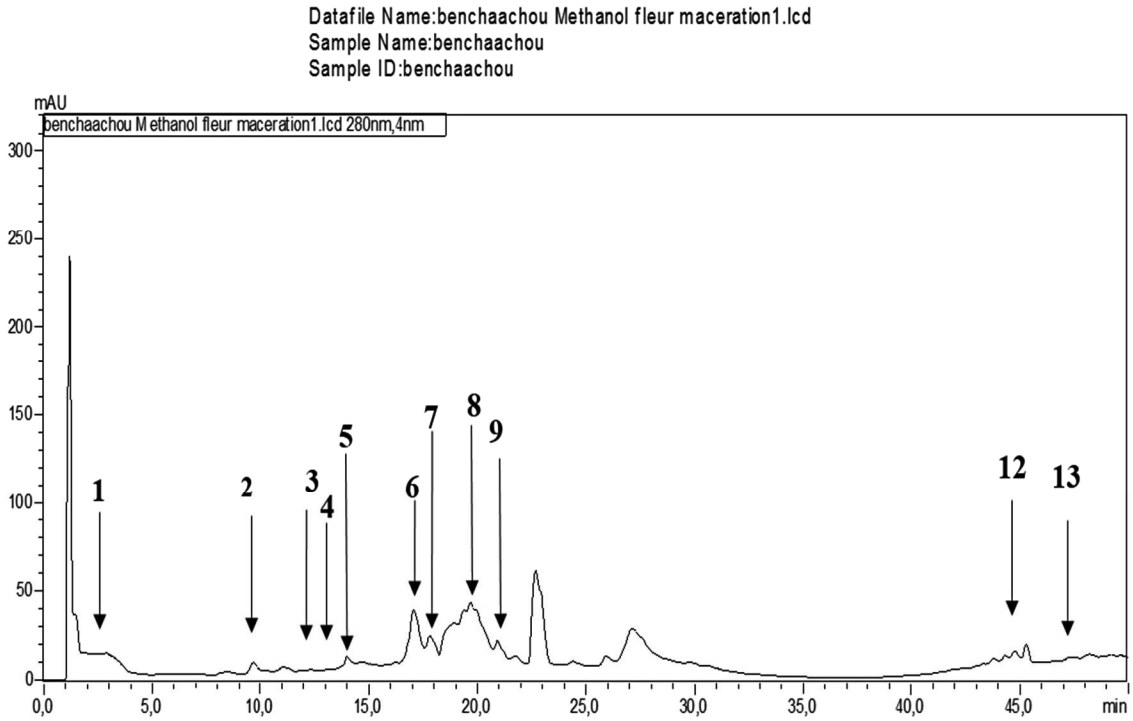


Figure 40 : Chromatogramme de l'extrait hydro-méthanolique de fleur obtenue par macération.

1 : acide tannique ; **2** : taxifoline ; **3** isosilychristine ; **4** : silychristine ; **5** : silydianine ; **6** : silybine A ; **7** : silybine B ; **8 :** isosilybine A ; **9** : isosilybine B ; **12** : la quercétine ; **13** : kaepmoférol.

L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait hydro-méthanolique des fleurs obtenu par macération montre la présence des pics avec des aires (%) dont l'acide tannique (1.165%), les flavonolignanes (isosilychristine (0.266%), silychristine (0. 241%), silydianine (1.338 %), silybine A (4.631 %), silybine B (2.233 %), isosilybine A (4.006%) et isosilybine B (2.467 %), d'autres flavonoïdes telles que : la quercétine (0.550 %), la taxifoline (0.765 %) et la kaepmoférol (0.113 %).

II.7.3.2. Analyse de l'extrait hydro-méthanolique de la fleur obtenue par décoction

Le chromatogramme (Figure 41) obtenu montre la présence de quelques pics majoritaires à 280 nm avec des aires en pourcentages, qui nous ont permis de soupçonner la présence de certains composés phénoliques : l'acide tannique (1.077%) , les flavonolignanes (isosilychristine (0.644 %) , silydianine (0.525 %), silybine A (0.247 %), isosilybine A (3.774%) et isosilybine B (1.232 %)) , d'autres flavonoïdes telles que : la

quercétine (7.244%) , la taxifoline (0.204%), l'acide coumarique (0.770 %) , la kaepmoférol (0.073 %) et la naringine (10.384%).

Nous notons la présence dans le même profil d'élution à 280 nm, une sérié de quelques pics non identifiés obtenus avec des aires dont les pourcentages sont beaucoup plus importants et qui ont été fractionnées avec des temps de rétention comprise entre 29.28 et 49.72.

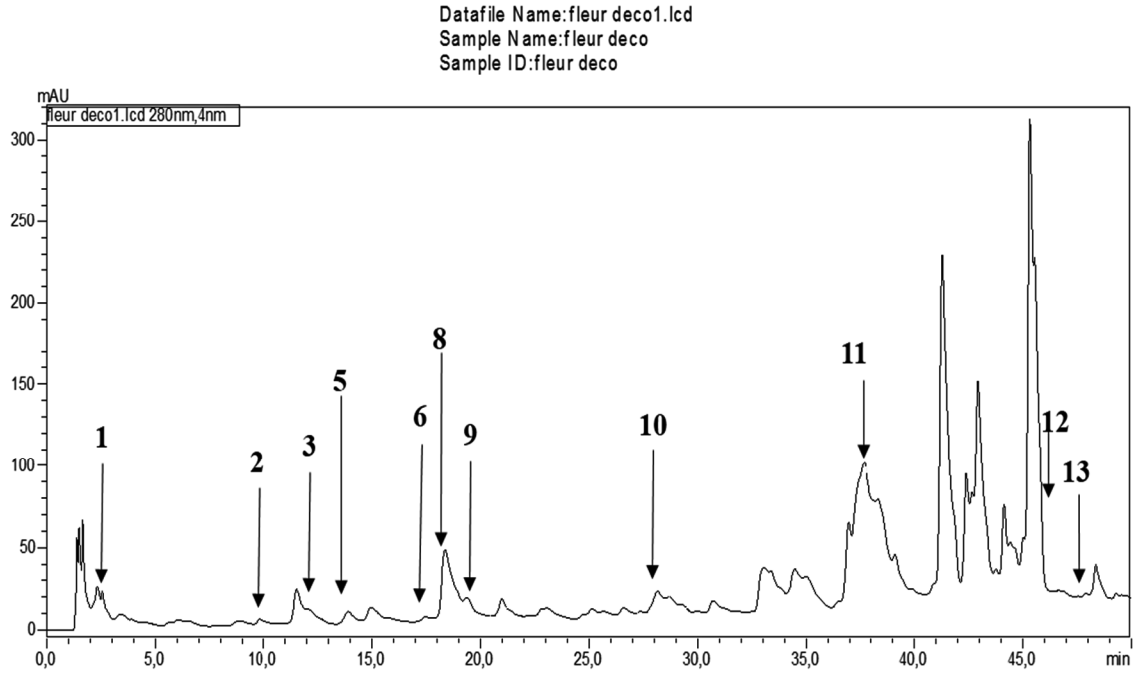


Figure 41 : Chromatogramme obtenu à 280 de l'extrait hydro-méthanolique de fleur obtenue par décoction.

1 : acide tannique ; **2** : taxifoline ; **3** : isosilychristine ; **5** : silydianine ; **6** : silybine A ; **8** : isosilybine A ; **9** : isosilybine B ; **10** : acide coumarique ; **11** : naringine ; **12** : la quercétine ; **13** : kaepmoférol.

La comparaison entre les résultats de la séparation chromatographiques des deux extraits de fleurs (hydro-méthanolique obtenus par macération et décoction révèle une composition qualitative en composés phénoliques mais différente d'un point de vue quantitatif.

Nous constatons que l'extrait hydro-méthanolique des fleurs obtenu par macération présente certains pics avec des aires dont les pourcentages sont plus importants : silydianine (1.338 %), silybine A (4.631 %), silybine B (2.233 %), isosilybine A (4.006%) et isosilybine B (2.467 %) comparativement à celui de l'extrait hydro-méthanolique obtenu par décoction,

par contre ce dernier semble riche en quercétine (7.244%) et en naringine (10.384%) représentés par des pics traduisant des pourcentages élevés.

L'extrait des fleurs de *Silybum marianum* a une très forte capacité à piéger le radical DPPH et indique une meilleure activité antioxydante. Ceci est sans doute dû à sa composition riche en flavonoïdes (la quercétine, la naringine et la silybine) **(Wang et *al*., 2010).**

L'analyse qualitative des différents extraits par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (HPLC-RP), a révélé leur richesse en composés phénoliques. Selon **Macheix *et al.*, (2005),** les composés phénoliques d'origine naturelle ont la propriété d'être solubles dans les solvants polaires. Ce qui rend possible l'utilisation de la phase inverse en HPLC pour leur analyse**.**

L'analyse des résultats des différents profils chromatographiques des principaux composés phénoliques obtenus à partir des extraits testés, nous a permis d'identifier certains composés phénoliques dont l'acide tannique, les flavonolignanes (isosilychristine, silychristine, silydianine, silybine A, silybine B, isosilybine A, et isosilybine B) et d'autres flavonoïdes telles que : la quercétine, taxifoline, l'acide coumarique, kaepmoférol, la naringine et l'apigenine. Ainsi, la méthode d'identification par chromatographie vient-elle confirmer les premiers résultats obtenus par dosages spectrophotométriques UV-Visible des composés phénoliques.

Certains pics de ces profils présents des aires dont les pourcentages sont beaucoup plus importants. Ces derniers ne sont pas identifiés, par manque de standards. D'autre part, l'analyse comparative des profils chromatographiques des extraits testés obtenu par macération et décoction, montre l'effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des différentes parties de *Silybum marianum* (feuilles, tiges et fleurs). Les aires des pics obtenus montrent que les quantités diffèrent en fonction de la méthode d'extraction, le solvant utilisé et la partie de la plante étudiée.

Plusieurs études ont montré que les extraits des fleurs de *Silybum marianum* contiennent la plus grande quantité de composés phénoliques **(Shibano et *al*., 2007, Abouzid, 2012, Elwekeel et *al*., 2013, Bijak, 2017).**

De plus, ces valeurs peuvent donner des informations pour une meilleure sélectivité des molécules à extraire et nous mènent à comprendre la bonne activité antioxydante des extraits de feuilles, de tiges et de fleurs.

Les travaux de **Kren et *al*., (2005)** montrent la richesse de *Silybum marianum* en silymarine. La silymarine : Il s'agit de la substance reconnue active dans le chardon Marie **(Brès, 1992).** Elle est constituée d'un mélange de 6 flavonolignanes : la silychristine, la silydianine, la silibinine A, la silibinine B, l'isosilybine A et l'isosilybine B, présente dans toute la plante, est particulièrement concentrée dans les graines mures. La silybine neutralise efficacement différents radicaux libres incluant le radical hydroxyle et peroxyle ainsi que l'ion hypochlorite **(Mira *et al*., 1994).**

La silymarine contient également de la quercétine et de la taxifoline. Ces flavonolignanes présentent des propriétés antioxydantes par inhibition des radicaux libres. La silymarine contient également de la quercétine et de la taxifoline. Ces flavonolignanes présentent des propriétés antioxydantes par inhibition des radicaux libres.

Plusieurs auteurs ont prouvé l'efficacité de la méthode d'extraction par macération **(Liu et *al*., 2013).** Des études antérieures ont montré que le méthanol est le solvant le plus fréquemment utilisé pour extraire la silymarine à partir des graines de *Silybum marianum* **(Benthin et *al*., 1999 ; EL-Samaligy et *al*.,2006).** En effet, il a été utilisé afin d'obtenir des extraits riches en flavanones, flavones, flavone-glycosides, méthoxyflavones et flavones dimères **(Escribano-Bailôn & Santos-Buelga, 2003**).

Les travaux de **Çağda et *al.*, (2011),** montrent que le profil chromatographique de l'extrait hydro-méthanolique par macération révèle la présence de six pics. Ces pics identifient les 6 flavonolignanes de la silymarine. **Jahan et *al*., (2016)** ont confirmé que l'extrait hydro-méthanolique par macération a montré une plus grande quantité de silymarine, et ont prouvé que l'augmentation de temps d'extraction augmente le rendement en silymarine. Cependant, l'éthanol est aussi un bon solvant qui peut être utilisé pour l'extraction de silymarine. Il a aussi donné d'excellents rendements car son potentiel d'extraction est très proche du méthanol dans certaines procédures.

Une autre étude réalisée par **Grigoraş (2012)** montre que le méthanol extrait préférentiellement les composés les plus polaires correspondant aux solutés élués avec les temps de rétention les plus faibles, de même l'éthanol est capable de solubiliser des composés

ayant une plus large gamme de polarité car c'est un solvant de polarité intermédiaire extrait toutes les familles de composés. Cependant les résultats de **Duan et *al.*, (2004)** montrent que l'augmentation de la température influe sur le rendement d'extraction du principal constituant actif de la silymarine et de la taxifoline. Cela est probablement dû à une dégradation de ces composés. Au contraire, **Wallace et *al*., (2005)** ont prouvé que le rendement en silymarine augmente avec l'augmentation de la température. Aussi dans la plupart des cas, l'éthanol à 60 °C récupérait les plus grandes quantités de silymarine.

L'analyse chromatographique (HPLC), réalisé par **Wang et *al*., (2010)** sur les différentes parties de *Silybum marianum* montre une relation étroite entre la composition des extraits et la nature du solvant d'extraction. En effet, la solubilité des flavonoïdes dépend en grande partie de la nature et du nombre de substituants : plus le nombre d'hydroxyles libres est élevé, plus ils sont solubles dans les solvants polaires **(Harborne et *al*., 1975 ; Saidman et *al*. 2002).** Cependant, les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile d'estimer la solubilité d'un composé dans un solvant **(Abou El Hassan et *al*., 2000).**

Cependant, les différences structurales au sein d'une même famille sont tellement importantes qu'il est difficile d'estimer la solubilité d'un composé dans un solvant **(Abou El Hassan et *al*., 2000).**

Conclusion générale et perspectives

Les plantes médicinales produisent une large gamme de substances chimiques actives, de métabolites secondaires qui constituent une grande source de principes actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques. Leur utilisation est en progression constante, étant donné la toxicité et les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse. Ainsi, le besoin établi à l'implication du stress oxydatif dans plusieurs maladies et la résistance aux antimicrobiens, a mené plusieurs chercheurs à la valorisation de certaines plantes médicinales.

L'objectif de notre étude a consisté essentiellement à évaluer la meilleure technique d'extraction des composés phénoliques dans les différentes parties de la plante *Silybum* marianum (feuilles, tiges et fleurs) par deux méthodes d'extraction différentes (macération et décoction), en employant quatre solvants d'extraction puis voir l'influence de ces paramètres sur l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne.

D'après nos résultats, nous constatons en premier que les différentes parties étudiées de *Silybum marianum* renferment des teneurs variables en composés phénoliques et par conséquent elles ont des activités antioxydantes différentes. Les meilleures moyennes de rendements d'extraction des deux méthodes utilisées sont enregistrées pour la décoction dont l'extrait aqueux des feuilles enregistre le rendement le plus élevé à savoir 24.71 ± 4.68 %.

En fonction de la méthode d'extraction et indépendamment du système de solvant et de la partie de la plante, la macération a donné des extraits avec des teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et une bonne capacité antioxydante totale par rapport au décoction qui semble être la meilleure méthode d'extraction des flavonoïdes, des tanins et qui a révélé des extraits avec de meilleures activités anti-radicalaires.

Les composés phénoliques sont diversement répartis dans les quatre systèmes de solvants utilisés. On note que le méthanol offre un extrait de teneur très élevée en polyphénols (18.75± 0.55 mg EAG/g MS), et que l'eau donne la teneur la plus forte en tanins condensés (04.14 ± 0.82 mg EAT/g MS). L'éthanol quant à lui, est le meilleur extracteur de flavonoïdes avec une teneur de 5.08 ± 0.57 mg EC/g MS. Néanmoins, l'acétone s'avère le solvant le moins riche en composés phénoliques.

Indépendamment du système de solvant et du type d'extraction, les extraits des feuilles contiennent de fortes teneurs en polyphénols et ont une capacité antioxydante totale considérable.

Les extraits des fleurs renferment en moyenne les plus importantes concentrations en flavonoïdes et ont la plus forte activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical DPPH• libre avec une valeur de IC_{50} assez basse de l'ordre 2.099 ± 0,08 µg/ml, même par rapport au antioxydant de synthèse. Les extraits des tiges, donnent en moyenne les teneurs les plus élevées en tanins condensés et la plus grande capacité antioxydante totale (172.04 ±26.06 mg EAG/g MS).

Pour les différents extraits des trois parties de la plante (feuille, tige et fleur), on remarque une bonne corrélation linéaire entre les teneurs en composés phénoliques et la capacité antioxydante totale, ainsi que des corrélations fortes entre les teneurs en flavonoïdes et les valeurs d'IC_{50} du test DPPH. D'autres tests devraient être appliqués pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant de ces extraits et valoriser ainsi les différentes parties de *Silybum marianum*, notamment les feuilles et les tiges afin de pouvoir les utiliser dans certaines maladies liées au stress oxydatif.

Le screening phytochimique permet également d'observer des variations dans la composition chimique des extraits. Cette diversité structurale est probablement responsable de leurs activités antimicrobiennes. Les résultats montrent que tous les extraits possèdent une activité antimicrobienne sur au moins une des souches bactériennes testées.

Les tests de l'activité antibactérienne ont révélé quelques résultats intéressants. En effet, l'extrait hydro-éthanolique par décoction des feuilles et l'extrait hydro-acétonique des tiges par macération exercent une activité inhibitrice sur la souche *Bordetella branchiseptica.*

Micrococcus luteus est plus sensible à l'extrait hydro-méthanolique des tiges et l'extrait hydro-éthanolique des fleurs par décoction avec des valeurs respectives de CMI de 6.25 mg/ml et 12.5mg/ml. Les deux extraits hydro-acétoniques des tiges par décoction et par macération, ont montré une efficacité contre *Escherichia coli* avec une CMI à partir de 6.25 mg/ml et 25 mg/ml respectivement. Pour l'extrait hydro-méthanolique des fleurs par macération et par décoction, la concentration minimale inhibitrice de *Pseudomonas aeruginosa* est à partir de la concentration de 12.5 et de 25 mg/ml respectivement. La CMI pour *Staphylococcus aureus est* respectivement de 12.5 et de 25 mg/ml pour l'extrait hydro-éthanolique de fleur et l'extrait hydro-acétonique par décoction.

L'analyse par HPLC en phase inverse de certains extraits de feuilles et de tiges (hydro-acétonique et hydro-éthanolique obtenus par macération et décoction respectivement) et

extraits de fleurs (hydro-méthanolique obtenus par macération et décoction), a révélé la richesse de ces trois parties en composés phénoliques. En se référant au temps de rétention des standards, il en résulte la présence probable de certains flavonolignanes (la silychristine, la silydianine, la silibinine A, la silibinine B, l'isosilybine A et l'isosilybine B), des flavonoïdes (taxifoline, naringine, kaepmoférol et apigenine), des tanins comme l'acide tannique ; et des dérivés phénoliques comme l'acide coumarique. Cette composition des extraits peut significativement varier, en fonction de la partie de la plante utilisée pour l'extraction, la nature du solvant et la méthode d'extraction.

Cette étude a révélé l'importance du choix de la méthode d'extraction à tester, tels que le Soxhlet, la sonication, les micro-ondes…

Compte tenu des résultats, nous pouvons conclure que la plante *Silybum marianum* appartenant aux astéracées d'Algérie, peut constituer une nouvelle source de composés actifs doués d'un potentiel antioxydant et antimicrobien important.

Cependant, de futurs travaux seraient nécessaires afin de purifier et de quantifier ces composés phénoliques pour pouvoir tester leur activité biologique. Une analyse qualitative des extraits par des méthodes performantes comme l'HPLC/MS et RMN est indispensable. Ces travaux permettront d'une part de mettre en évidence le principe actif et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques et d'autre part, de confirmer que les extraits riches en composés phénoliques pourraient bien rivaliser avec les produits chimiques synthétiques. Par ailleurs, la détermination de la toxicité de ces molécules, demeure une exigence très importante pour leur utilisation future.

Références bibliographiques

A

1. **Abou El Hassan MAI., Touw DJ., Wilhelm AJ., Bast A., Van Der Vijgh WJF.** Stability of monoher in an aqueous formulation for i. v. administration. International Journal of Pharmaceutics **2000;** 211: 51-56.
2. **Abouzid SF., Shao-Nong C., Guido FP.** Silymarin content in *Silybum marianum* populations growing in Egypt Industrial Crops and Products **2016;** 83: 729.737.
3. **Achat S.** Polyphénols de l'alimentation, extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec les ions métalliques. Thèse de doctorat. Université A. MIRA-BEJAIA **2013**.P22.
4. **Adejare OY., Oduyebo OO., Oladele RO., Nwaokorie FO., Ogunsola FT.** In-vitro antifungal effect of Garcinia Lola and Garlic (Alliums sativu) on vaginal isolates of Candida. African journal of clinical and experimental microbiology **2013**; 14 (3):140-145.
5. **Akhtar N., Ihsan UH., Bushra M.** Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species, Arabian Journal of Chemistry **2015**; 1-13.
6. **Al Atraqchi NH., Wafaa M., Al Shaikh H.** Preliminary phytochemical screening and in-vitro evaluation of antioxidant activity of Iraqi species of *Silybum marianum* seeds. International Research Journal of Pharmac **2014** ; 5 (5) : 378-383.
7. **Alaoui IS.** Valorisation de deux plantes marocaines *Melia azedarach* et *Silybum marianum*. Thèse de doctorat. Université Mohamed V **2016**: 15p.
8. **Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer JP., Mason TJ.** Potential for the use of Ultrasound in the Extraction of Antioxidants from Rosmarinus officinalis for the Food and Pharmaceutical. Industry, Ultrasonic Sonochemistry **2004**: p11, 261.
9. **Aleksic V., Knezevic P.** Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of Myrtus communis L. Microbiol Res **2014** ; 169(4):240-54.
10. **Al-Farsi MA., Lee CY.** Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. Food Chemistry **2008**; 108 (3):977-85.
11. **Allan de Jesus DRA., Patrícia Maria de Freitas ES., Ana Lúcia Furtado de Almeida C., Fábio Correia S.** Polyphenols as a Source of Antimicrobial Agents against Human Pathogens. Nova Science Publisher **2013**; 275-294.
12. **Altorjay I., Dalmi L., Sári B., Imre S., Balla G.** The effect of silibinine (Legalon) on the the free radical scavenger mechanisms of human erythrocytes in vitro. Acta Physiologica Hungarica **1992**; 80(1-4):375-80.
13. **Amrani O**. Valeur nutritive du chardon marie (*Silybum marianum* (1) Gaerthn) "Tawra". Mémoire Magister Université Batna **2006** : 14p.

14. **Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D.** Sample preparation in the analysis of phenolic compounds in fruits. Analyst **2000** ; 125 : 989-1009.
15. **Arraki K.** Les stilbénoïdes chez les Cypéracées : Isolation, identification et étude de leurs activités biologiques. Identification et dosage des stilbènes dans des vins Tunisiens. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux **2014:** 10p.
16. **Asghar Z., Masood** Z. Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxyl radicals in vitro. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences **2008;** 21(3):249-54.
17. **Awad AB., Von Holtz RL., Cone JP., Fink CS., Chen YC.** 1998. Beta -Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. Anticancer Research **1998**; 18:471-473.
18. **Awad AB., Downie AC., Fink CS.** Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. International Journal of Molecular Medicine **2000;** 5: 541-5.
19. **Azmir ISM., Zaidul MM., Rahman KM., Sharif A., Mohamed F., Sahena MHA., Jahurul Norulaini NAN., Ghafoor K., Omar AKM.** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. A review, Journal of Food Engineering **2013**;117: 426-436.

B

20. **Babuty D. Chantal B., Bijan G., Gervaise L., Florence P., Jane-Lise S**. Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. J*ohn Libbey Eurotext* Ed **2007**.p 12 .
21. **Badiaga M.** Étude ethnobotanique, phytochimique et l'activité biologique de *Nauclea Latifolia Smith,* une plante médicinale africaine récoltée au mali ». Thèse de doctorat, Université Bamako **2012:**76p.
22. **Bajaj KL., Devsharma AK.** A colorimetric Method for the determination of tannins in Tea. Microchimica Acta **1977** ; 68(3) : 249-253.
23. **Balasundram N., Sundram K., Samman S**. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry **2006**; 99: 199-203.
24. **Baud F., Philippe H., Hafedh T.** Intoxications aiguës, Springer **2013:** 91p.
25. **Bayer E., Finkenzeller JGR., Buller k.** Guide de la flore méditerranéenne: caractéristiques, habitats, distributions et particularités de 536 espèces. Paris : Edition. De la chaux et Nestlé **1990 :**222p.

26. **Békro YA., Békro MJA., Boua BB., TraBi FH., Ehile EE**. Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) *Herend*. Et *Zarucchi* (Caesalpiniaceae). Sciences et Nature **2007** ; 4 (2) : 217-225.
27. **Belmimoun A**. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales. Thèse de doctorat. Université Mustapha Stambouli- Mascara **2016** : 143p.
28. **Belouahem AD.** Biodiversité Floristique et Vulnérabilité des Aulnaies Glutineuses de la Numidie Algérienne (N.E Algérien). European Journal of Scientific Research **2009** ; 32 (3) p 345.
29. **Beloued A.** Plantes médicinales d'Algérie. 5Emme Edition, office des publications universitaires INA El-Harrach **2009** : 68p.
30. **Ben Amor B**. Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle. France **2008**: 187p.
31. **Benchaachoua A.** Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait à partir du chardon marie *Silybum marianum* et à partir de *Mucor mèche* isolé du sol de Sidi-Bel-Abbès. Mémoire de magister. Université Djillali LIABÈS 2010 : p 10-43
32. **Benhammou N**. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, thèse de doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen **2012** : p78-82.
33. **Benthin B., Danz H., Hamburger M.** Pressurized liquid extraction of medicinal plants. Journal Chromatography A **1999**; 837 (1-2): 211–219.
34. **Berruex JC**. La forme à votre portée, Edition Fitline séminaires 1998.P 57.
35. **Bettaieb Rebey IJ., Sriti B., Besbess K., Mkaddmini HI., Hamrouni SB., Marzouk RK.** Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgarae* Mill.). Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology **2016**; 27(4): 1478-1487.
36. **Bezanger BJ., Pinkas M0., Torck M., TROT F.** Plantes médicinales des régions tempérées. Edition. Vlaloine S.A. Paris **1980**: 416 P.
37. **Bijak M.** Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.), Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. Molecules **2017**; 22(11): 1-11.
38. **Boizot N., Charpentier JP.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'Inra **2006** : p 79-82.

39. **Bonnaillie C., Mathieu S., Elena V., Ilonka S.** Étude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (Arachis hypogaea L.). Revue de génie industriel **2012** ;7 :35-45.

40. **Bouras M.** Étude comparative et optimisation de prétraitements des écorces de bois pour l'extraction des composés phénoliques. Thèse de doctorat. Université de Technologie de Compiègne **2015** : 65p.

41. **Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa L.* shoots and roots. Comptes Rendus. Biologies **2008** ; 331 : 48–55.

42. **Bourgou S., Serairi Beji R., Medini F., Ksour R.** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology **2016**; 28(12): 1649-1655.

43. **Bourre JM**. Diététique du cerveau : la nouvelle donne, Edition Odile Jacob , Paris **2003** :215p.

44. **Bouzidi MA., Latrèche A., Attaoui I., Mehdadi Z., Benyahia M**. Caractérisation des matorrals et des garrigues à Urginea pancration (Steinh) Phil. Dans le djebel Tessala (Algérie occidentale). Physio-Géo **2009** ; 3 : 131-149.

45. **Bradly PR.** British herbal compendium: Ahand book of scientific information on widely used plants drugs **2006**: 409p.

46. **Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft and Technology**1995** ; 28 : 25–30.

47. **Brès J.** Pharmacocinétique : de la recherche à la clinique : quatrièmes Journée Méditerranéennes de Pharmacocinétique. Edition, Montrouge Libbey**1992** : p363-366.

48. **Bruneton J.** Pharmacognosie : phytochimie plantes médicinales. 3ème édition. Tec & Doc Lavoisier Ed Paris **1999** : 1120p.

49. **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie plante médicinale.4eme édition Tec & Doc Lavoisier Ed Paris **2009** : p 261, 263, 308,459.

50. **Bruneton J.** Pharmacognosie-phytochimie plantes médicinales. 5ème édition. Tec& Doc Lavoisier Ed Paris **2016** : p 339-402.

51. **Budic-Letoc I., Lovric T., Pezo I., Klujuzuric JG.** Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. Food Technology and Biotechnology **2005** ;43(1): 47-53.

C

52. **Çağdaş ECE., Seher K., Sezin G., Şebnem T.** Ultrasound-assisted extraction of silymarin components from milk thistle seeds (*Silybum marianum l.*). GIDA **2011**;36 (6): 311- 318.
53. **Cai YZ., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H**. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Science **2006**; 78: 2872-2888.
54. **Carole I., Hervé Q., Jean-Christophe O.** Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement. Springer-Verlag, France **2011**: 312p
55. **Castro L., Freeman BA**. Reactive oxygen species in human health and disease. Nutrition **2001** ;17 (2) : 295-307.
56. **Céline C.** Les secrets de santé des antioxydants : plus jeune, plus longtemps avec les antioxydants. Alpen Ed France **2004** : p16-17.
57. **Chaouch TM.** Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen (UABT) **2014** : p 18, 35.
58. **Charrié JC., Chastel B., Cieur C., Combe P., Damak M., Hedayat K., Saigne-Soulard C.** Plantes médicinales Phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique. Tec & Doc Lavoisier Ed Paris **2017** : 256p.
59. **Chatard JC**. Lutter contre le dopage en gérant la récupération physique, publications de l'Université de Saint-Etienne Amazon France **2005 :** 157p.
60. **Chavan UD., Shahidi F., Nazak M.** Extraction of condensed tannins from beachpea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. Journal Food Chemistry **2001**; (75)*:* 509-512.
61. **Cheynier W., Souquet JM., Fulcrand H., Sarni P., Moutounet M.** Stabilisation tanins – anthocyanes : données générales. Extrait de « Les composés phénoliques ». Journée Technique (compte-rendu). IPV-INRA**1998** : 4p.
62. **Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., Bruyne T., Hermans N., Totte J., Pieters L., Vlietinck AJ.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology **2002**; 79(2): 213-220.
63. **Ciulel I.** Methodology for analysis of vedetable drugs. Ed I.P.A.C. Romania **1982**. P67.
64. **Clérivet A., Ibrissam A., Frédéric B., Dominique G., Christine S** Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. Acta Botanica Gallica **1996** ; 143 (6) : 531-538 .

65. **Collin S ., Crouzet J .**Polyphénols et procèdes : transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Tec & Doc Lavoisier **2011** : p 12, 13, 50,305-337.
66. **Conan M.** Milk Thistle Heals and Protects the Liver and Acts as Poison Antidote, Epoch Times **2016**:2 p.
67. **Couplan F.** Reconnaitre facilement les plantes. Philippe Brunet Ed **2007 :** 98p.
68. **Cowan MM.** Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews **1999**; 12 (4): 564- 582.

D

69. **Daglia M.** Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology **2012**; 23(2):174-181.
70. **Darbyshire SJ.** Inventaire des mauvaises herbes du Canada. Agriculture et Agroalimentaire, Direction générale de la recherche, Ottawa Canada **2003** : 276 P.
71. **DE Moffarts B., Kirschvink N., Art T., Pincemail J., Michaux C., Cayeux K., Defraigne JO., Lekeux P.** Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. Equine and Comparative Exercise Physiology **2004;** 1: 211-220.
72. **De Pooter HL., Schamp N.** Comparaison of the volatils composition of some Calamintha satureja species. In: Progress in essential oil research. Brunk, Walter De Gruyter Ed Berlin **1986**: p139-150.
73. **De Reynal B.** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Tec & doc Lavoisier Ed, France **2009** : 17p.
74. **Decloître F.** Alimentation, environnement et cancer. Courrier de la Cellule Environnement de l'INRA**1992** *;* 17 : 45-59.
75. **Delattre J., Beaudeux JL., Bonnefont-Rousselot D.** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Tec & Doc Lavoisier Ed **2005**a: p1- 23.
76. **Densiov ET., Afanas'ev IB.** Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Taylor & Francis Group (U.S.A) Ed **2005**: p703- 861.
77. **Detsi A. , Maya M., Christos A. , Kontogiorgis D., Hadjipavlou L., Panagiotis K.** Natural and synthetic 2′-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry **2009**; 17(23):8073-8085.

78. **Dewanto V., Wu X., Adom KK., Liu RH.** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. Journal of Agriculture and Food Chemistry **2002** ; 50 (10) : 3010-3014.
79. **Deysson G.** Organisation et classification des plantes vasculaires 2éme partie. CUDSEDES Ed **1967**: p108-111.
80. **Ditomaso JT**. Weeds of California and other western states. California weed science society Ed **2007**: p 391-394.

E

81. **Edzard E., Max HP** . Médecines alternatives : le guide critique. Elsevier Masson **2005** : p 112-113.
82. **EL-HACI IA.** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales endémique de sud d'ALGERIE : *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., *Anabasis aretioides* Moq & Coss. ET Limoniastrum *feei* (Girard) Batt. Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen (UABT) **2016** : 160p.
83. **EL-Samaligy MS., Afifi NN., Mahmou EA.** Evaluation of hybrid liposomes encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance. International Journal of Pharmacy **2006:** 319, (1-2)121.
84. **Elwekeel A., Elfishawy A., Sameh A.** Silymarin content in *Silybum marianum* fruits at different maturity stages. Journal of Medicinal Plants Research **2013**; 17: 1665-1669.
85. **Emuri Ab., Stanilas GD., Alvarez JC**. Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés Liquid-liquid extraction : theory, applications and difficulties, Ann Toxicol Anal **2010** ; 22(2) : 51-59.
86. **Escribano B., Santos B.** Polyphenols extraction from foods. In Methods in polyphenol analysis. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge **2003**; p 1-16.
87. **Essaid A.** La lutte antiacridienne, John Libbey Eurotext, Amazon France **1991** : 275p.
88. **Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radical Biology *and* Medicine **1992** ; 13, p 341.
89. **Évrard CM. ,William GH.** Physiologie végétale, Bruxelles : De Boeck **2003** : 139 p. **F**
90. **Favier A.** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique **2003** : 108 p.

91. Ferrari J. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des *Thymelaeaceae* et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. Thèse de doctorat. Université Lausanne **2002** : 3p.

92. Floss HG. Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. Natural Product Reports **1997**;14: 433-434.

93. Foster S. Milk Thistle. *Silybum marianum.* Houston, TX: American Botanical Council; **1997**: p7

94. Fournier P. Encyclopédie Biologiques, éditeur Paul le chevalier **1947.**

95. Furukawa H. Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. Phytochemistry **2005**; 66(5): 567-572.

G

96. Gamil EI., Mohamed AE., Omayma AE., Ahmed MAS. Effect of extraction on phenolic content, silymarin and antiradical activities of artichoke leaves and roots, European Scientific Journal **2013**; 9(6):100-110.

97. Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules 2010;** 15: 8813-8826.

98. Gazengel JM., Orecchioni AM. Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique. Tec & doc-Lavoisier Ed Paris, **2013** : 1174p.

99. Ghafor Y., Nian NM., Dler MS. Extraction and Determination of Chemical Ingredients from Stems of *Silybum Marianum*. Chemistry and Materials Research **2014**; 6(4):26-32.

100. Ghedira K. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie **2005**; 4: 162-169.

101. Goupy P., Hugues M., Boivin P., Amoit MJ. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. Journal of the Science of Food *and* Agriculture **1999**; 79: 1625-1634.

102. Gouveia SC., Castilho PC. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke- based dietary supplements. Food Research International **2012**; (48): 712–724.

103. Gray AI., Waterman PG. Photochemistry. Edition Royal Society of Chemistry **1978**: p17, 845.

104. Grigoraş CG. Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composes bioactifs. École doctorale sciences et

technologies-Institut de Chimie Organique et Analytique- Université d'Orléans. Thèse de doctorat **2012** : 151 p.

105. Groubert A. Techniques d'extraction végétale. Montpellier, pharmacie **1984**.

106. Guessan KN., Kadja B., Zirihi GN., Traoré D., Aké-assi L. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). Sciences et Nature **2009** ; 6 (1) :1-15.

107. Guillaume M. Stabilisation chimique des électrolytes polymères pour pile à combustible. Thèse de doctorat, université de Grenoble **2012** : 40 p.

108. Guillot F. Apparition et évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Annale de Recherches Vétérinaires **1989** ; 20 : 3-16.

109. Guinard JL. Abrégé botanique. Masson Ed Paris **1996** : p 212-215.

110. Guinard JL., Dupont F. Abrégé botanique. Masson Ed Paris **2007** : 248 p.

111. Guingard JL. Biochimie végétale. Lavoisier Ed Paris **1996** : p175-192.

H

112. Hachoumi I. Analyse et dosage des résidus de carbamates dans la pomme par HPLC. Mémoire de master. Université Hassan II Mohammedia-Casablanca **2013** : 37p.

113. Haddad Y. Interventions thérapeutiques prometteuses dans un modèle in vivo de stéatose-hépatite non alcoolique. Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maîtrise des sciences (M. Sc.) en Pharmacologie. Université de Montréal **2008** : 124p.

114. Haddouchi F., Zerhouni K., Sidi-yekhelef A., Chaouche TM. Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. Rupestre Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège **2016**; 85: 152 – 159.

115. Haleng J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. Le stress oxydant. Revue Med Liège **2007**; 62(10): 628-638.

116. Halliwell B., Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press Ed Oxford, **2006**; 67p.

117. Halliwell B., Gutteridge JMC., Arnoma OL. The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. Analytical Biochemistry **1987** ; (1) : 215-219.

118. Hammoudi R. Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien.Thèse de doctorat. Universite Kasdi Merbah – Ouargla **2015** : 152 p.

119. Handa SS. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. *In*: Handa SS., Khanuja SPS., Longo G., Rakesh DD. Extraction Technologies, for

Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy **2008**; 21-54.

120. Harbome JB. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman & Hall Ed London **1998**: p15, 42, 203-214.

121. Harbone JB., Mabry TJ., Mabry H. The flavonoids. Chapman and Hall; London **1975.**

122. Harborne JB. Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology. New series (8): **1980**; 329-402.

123. Hasan Md., Kamrul, AK., Lutful K., Sabyasachy M. Chemical and Biological Investigation of Leaves of Polygonum plebejum. Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences **2009**; 2(2): 66-71.

124. Hassan A., Rahman S., Farah Deeba F., Shahid M. Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. Journal of Medicinal Plants Research **1992**; 3 (1):020-023

125. Hassan SW., Umar RA., Lawal M., Biblis LS., Muhammed BY., Dabai YU. Evaluation of antibacterial activity and phyto chemical analysis of root extracts of Boxia angustifolia. African Journal of Biotechnology **2006** ; 5. (18) : 1602-07.

126. Heratchian A. Le chardon-marie protecteur hépatique. Naturo **2007** *;* 43 : 18-20.

127. Hikino H., Kiso Y., Wagner H., Fiebig M. Antihepatotoxic Actions of Flavonolignans from *Silybum marianum* Fruits. Planta Medica **2007**; 50: 248–250.

128. Hilliard JJ., Krause HM., Bernstein JI. A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. Advances in Experimental Medicine and Biology**1995**: p390.

129. Hoffmann L. Étude du métabolisme des phénylpropanoïdes ; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxy Cinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur **2003** : p110.

130. Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B., Legrand M. Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. Plant cell **2004**; 16 (6): 1446-1465.

131. Huan D., Ou B., Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry **2005**; 53(6): 1841- 1856.

132. Hüseyin G., Umut T., James WL. Alemania: Springer Berlin Heidelberg **2011**: 538p.

I

133. Ignat I., Volf I., Popa VI. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry **2011**; 126:1821– 1835.

134. Ito C., Itoigawa M., Onoda S., Hosokawa A., Ruabgrungsi N., Okuda T., Tokuda H., Nishino H. Chemical constituents of. Murrayasiamensis: three coumarins and their anti-tumor promoting effect. Phytochemistry **2005** ; 66 :567-572.

J

135. Jahan N., Khalil URR., Shahzad MAB., Siddra S., Irfan A. Seed Enhancement of *Silybum marianum* and Optimization of Silymarin Extraction. International Journal of Agriculture & Biology **2016**;18: 464–470.

136. Jain K., Himanshu J. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. Journal of Applied Pharmaceutical Scienc*e* **2012**; 02 (06): 236-240.

137. Javanovic SV., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic MJ. Flavonoids as antioxidants. Journal of the American Chemical Society **1994**;116: 4846-4851.

138. Jing Sun l., Xinhua L., Xiaolei Y. Antioxidant Activities, Total Flavonoids and Phenolics Content in Different Parts of *Silybum Marianum* L. Plants, Chemical Engineering Transactions **2016** ; 55 : 37-42.

139. Jing Sun l., Xinhua L., Xiaolei Y. Polysaccharides, Total Flavonoids Content and Antioxidant, Activities in Different Parts of *Silybum Marianum* L. Plants, International Conference on Materials Science, Resource and Environmental Engineering **2016** ; p1-4.

140. John SA., Koperuncholan M. Direct root regeneration and indirect organogenesis in *Silybum marianum* and preliminary phytochemical, antibacterial studies of its callus. International Journal of Pharmacy **2012**; 2: 392-400.

141. Jorgensen JH., Turnidge JD., Washington JA. Antibacterial susceptibilitytests: dilution and disk diffusion methods. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American society for microbiology **1997**;1526-1543.

142. Jost JP. , Yan-Chim J. Stratégie de défense des plantes contre les maladies et les parasites, et quelques applications pratiques. Publibook., Amazon Ed France **2016** : 55 p .

143. Jost JP., Yan-Chim J. L'automédication chez les animaux dans la nature : et ce que nous pourrions encore apprendre. Connaissances et savoirs Ed **2015** : p 24.

144. Juntachote T., Berghofer E., Bauer F., Siebenhandl S. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy

basil and rosemary. International Journal of Food Science and Technology **2006;** 41: 121-133.

145. Justine O., Carole P. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse **2005** : p13-14.

K

146. Kamran AC., Syed MSSP., Muhammad AK., Arshad F. Evaluation of Phytochemicals and Antimicrobial Activity of White and Blue Capitulum and Whole Plant of *Silybum Marianum.* World Applied Sciences Journal **2011**;12 (8): 1139-1144.

147. Karmakar I., Dolai N., Saha P., Sarkar N., Bala A., Kanti P. Scavenging activity of *Curcuma caesiarhizome* against reactive oxygen and nitrogen species. Orient Pharmacology Experimental medicine **2011**;11: 221-228.

148. Katarzyna G., Sherine JD., Garry GD., Derek S., Stephen JL., Ian LM . Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope. Front Cardiovasc Med **2015** ; 2 (29): 1-22.

149. Kayser O., Kolodziej H. Antibacterial Activity of Extracts and Constituents of Pelargonium sidoides and Pelargonium reniforme. Planta medica **1997**;63(6): 508-510.

150. KaziTani CH., Le Bourgeois T., Munoz F. Aspects floristiques des adventices du domaine phytogéographique oranais (Nord-Ouest algérien) et persistance d'espèces rares et endémiques. Flora Mediterranea **2010** ; 20 : 5-22.

151. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Criticazl reviews in toxicology **1993**; 23 (1):21-48.

152. Khanbabaee K., Ree TR. Tannins: Classification and Definition. Journal of Royal Society of Chemistry **2001**; 18:641-649.

153. Khandelwal KR. Practical pharmacognosy: techniques and experiments. editeur: Maharashtra: Niral Prakashan Ed **2008**: 153p.

154. Kikken R. Géologie et stratigraphie des monts de Tessala. FOUQUET Ed 1962 : 220 p.

155. Kishan GR., Jean-Michel M. Bioactive Molecules and Medicinal Plants, Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2008** : p 126-127.

156. Knaggs AR. The biosynthesis of shikimate metabolites. Natural Product Reports **2003**; 20: 119–36.

157. Koen D., Chris P. L'impact de la nutrition sur la santé. Développements récents. Garant- Belgique Ed **1999** : 95 p.

158. Koffi E., Sea T., Dodehe Y., Soro S. Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty-three Ivorian plants. Journal of Animal and Plant Sciences **2010** ; 5: 550-558.

159. Koleva II., Van Beek TA., Linssen JPH., De Groot A., Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysais **2001**;13 : 08-17.

160. Konkon NG., Simaga D., Adjoungova AL., Guessan KE., Zirihi CN., Kon'e BD. Etude phytochimique de *mitragyna inermis* (willd.) o. ktze (rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. Pharmacopée ET médecine traditionnelle africaine **2006** ; 1 : 79p.

161. Koperuncholan M., Ahmed john S. Direct root regeneration and indirect organogenesis in *Silybum marianum* and preliminary phytochemical, antibacterial studies of its callus in 2012. International Journal of Pharmacy **2012**; 2(2): 395-396.

162. Kren V., Walter ova D. Silybin and silymarin - new effects and applications. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic **2005** ;149: 29-41

163. Kröncke KD., Suschek CV., Kolb-Bachofen V. Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. Antioxid Redox Signal **2000**; 2:585-605.

164. Krzesinski JM., André JS. La maladie rénale diabétique : prise en charge actuelle et perspectives d'avenir. Revue médicale suisse **2005** ; 11 :1534-42.

165. Ksouri R. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. Comptes Rendus Biologies. **2008**; 331: 865–873.

166. Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. Comptes Rendus Biologies **2008** ;331: 865- 873.

167. Kumar U., Mishra VK. Antioxidant and antimicrobial activity of seed extracts of *Silybum marianum* L. from Uttarakhand, India Medicinal Plants. International Journal of Phytomedicines and Related Industries **2015**; 7, (4): 277-283.

L

168. Le Cren F. Les antioxydants :la révolution du XXIe siècle. Quebecor Ed **2004** : p 35.

169. Le K., Chiu F., Ng K. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii.* Food Chemistry **2007**;105: 353-363.

170. Lee KW., Kim YJ., Lee HJ., Lee CY. Cocao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. Food chemistry **2003** ;51 : 7292-7295.

171. Lehout R., Laib M. Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : *Artemisia herba alba Asso*. Mémoire présenté de Master.Université des Frères Mentouri Constantine **2015** : 41p.

172. Leopoldini M., Russo N., Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. Food Chemistry **2011** ; 125(2) : 288-306.

173. Leray C. Les lipides dans le monde vivant. Tec & Doc Lavoisier Ed Paris **2010** : 4p.

174. Levine RL., Garland D., Oliver CN., Amici A., Climent I., Lenz AG., Ahn BW., Shaltiel S., Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol **1990**; 186:464-478.

175. Leybros J., Frémeaux P. Extraction solide-liquide aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés **1990** ; 1 (07) : 6-7.

176. Li Y., Jiao B., Zhao Q., Wang C., Gong Y., Zhang Y., Chen W. Effect of commercial processing on pesticide residues in orange products. European Food Research and Technology **2012b**; 234: 449-456.

177. Liangli LY. Wheat Antioxidants. Hoboken N.J., Wiley-Interscience **2008**: 213p.

178. Lijun DL., Danielle JC., Edgar C., Clausen L. Silymarin Extraction from Milk Thistle Using Hot Water. Applied Biochemistry and Biotechnology **2004** ; 113-116.

179. Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H., Zeng X. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng. Food Chemistry **2009** ; 112(1) :35-41.

M

180. M'hiri N. Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine » et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone. Thèse the doctorat. Université de Lorraine **2016 :** 28p.

181. Maataoui BS., Hmyene A., HilalI S. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). Lebanese Science Journal **2006** ; (1) :3-8.

182. Macheix JJ. Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle ? Acta Botanica Gallica **1996** ; 143 (6) : 473-479.

183. **Macheix JJ., Annie F. ; Christian JA.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes, **2005** : p 1, 24,37.

184. **Magalhães LM. , Segundo MA., Reis S., Lima JL.** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Anal Chim Acta. **2008** 14;613(1).

185. **Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.).* Journal of Nature and Technologie **2013** ; p 36-40.

186. **Majhenic L., Knez Z., Kerget MS.** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry **2007** ;104 :1258–1268.

187. **Malešev D., Kuntić V**. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. Journal of the Serbian chemical society **2007 ;** 72 (10) : 921-939.

188. **Marcel RB., Coxam V., Delzenne N.** Aliments fonctionnels. Tec & Doc Lavoisier Ed Paris **2008** : p 212.

189. **Marfak A.** Radiolyse gamma des flavonoïdes : Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges **2003** : p 24-42.

190. **Marvin E.** Les secrets de santé du thé : un peu de thé tous les jours éloigne le médecin pour toujours. Alpen Ed Monaco **2002** : 19p.

191. **Massaux C.** Polyphénols : des alliés pour la santé. Abeilles & Cie **2012** ;149 : 4, p1.

192. Matthieu Huet, Jacques F, 2013. Curcuma, thé vert et chardon-marie : quelle stratégie adopter en prévention du cancer ou en complément des traitements ? Hegel, 3 (4):268- 276.

193. **Mattila P., Kumpulainen J.** Détermination offree and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with Diode-Array détection. Journal of agricultural and food chemistry **2002**; 50: 3660-3667.

194. **Merken HM., Beecher GR.** Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. Journal of agricultural and food chemistry **2000**; 48 (3):577-599.

195. **Meyre-Silva C., Yunes RA., Schlemper V., Campos-Buzzi F., Cechinel-Filho V.** Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpène present in *Marrubium vulgare*, *Brazil Farmaco* **2005**; 60 (4): 321–326.

196. Michel T. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Thèse de doctorat. Université d'Orléans **2011**: p28, 50,183, 288.

197. Miguez MP., Anundi I., Sainz-Pardo LA., Lindros KO. Hepatoprotective mechanism of silymarin: No evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. Chemico-Biological Interactions **1994**; 91: 51– 63.

198. Mira L., Silva M., Manso CF. Scavenging of reactive oxygen species by silibinine dihemisuccinate. Biochemical Pharmacology **1994**; 48: 753–759.

199. Mohammedi Z., ATIK F. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *tamarix aphylla* (l.) karst. International Journal of Pharma and Bio Sciences **2013** ; 2 :609-615.

200. Mohsen SM., Ammar ASM. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chemistry **2009**; 112:595-598.

201. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity, *Song Klama Karin.* J.Sci. Technol **2004**; *26* (2): 211-219.

202. Morazzoni P., Bombardelli E. 1995. *Silybum marianum* (*Carduus marianus).* Fitoterapia **1995**; 66: 43–49.

203. Morazzoni P., Montalbetti A., Malandrino S., Pifferi G. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. The European Journal of *Drug* Metabolism and Pharmacokinetics **1993**;18: 289-97.

204. Moulay Y. Investigation Phytochimique de l'*Acacia arabica* Aux propriétés antioxydantes et inhibitrices. Mémoire de Magister, Universite Kasdi Merbah Ouargla, **2012** :130p.

205. Moure A., Cruz JM., Franco D., Dominguez JM., Sineiro J., Dominguez H., Nunez MJ., Parajo JC. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry **2001**; 72: 145-171.

206. Mouzali L. Le chardon-marie (*Silybum marianum*) : une plante aux multiples vertus. Société Algérienne De Nutrition Et De Médecine Ortho Moléculaire **2016** ; p132.

207. Murray RK., Granner DK. Biochimie de Harper. Presses de l'Université de Laval, **2002** ; p 933.

208. Mussatto SI., Ballesteros LF., Martins S., Teixeira JA. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. Separation and Purification Technology **2011**; 83(15): 173-179.

N

209. Nanjo F. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Free Radical Biology and Medicine **1996**; 21 (6): 895-902.

210. Nascimento MS., Santana ALBD., Maranhão CA., Oliveira LS., Bieber L. Phenolic extractives and natural resistance of wood. In: Chamy R and Rosenkranz F (eds) Biodegradation—life of science. Intech Open **2013**;349–370.

211. Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G.S. et Kakuda, Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafltration, Separation and Purification Technology **2006**; 48: 176-181.

212. NCCLS "National Committee for Clinical Laboratory Standards". Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100-S11, Wayne, PA, USA **2001**.

213. **Nisar A., Fazal H., Abbasi BH, Anwar S, Basir A.** DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). Toxicology & Industrial Health **2013b**; 29, 460-7.

214. Nkhili FZ. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Intéractions avec les ions du fer et du cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. Université de Cadi Ayyad – Marrakech **2009** : p17-20.

O

215. Omar AA. First Detailed Quantification of Silymarin Components in the Leaves of *Silybum marianum* Cultivated in Egypt during Different Growth Stages. Acta Chromatographica **2012**; 24(3): 463–474.

216. Oshaghi M., Sharifi R. Evaluation of antibacterial activity of silymarine against enteric bacterial pathogens. International Journal of Herbal Medicine **2016**; 4(5): 44-45.

217. Ou BX., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., Deemer EK., Prior RL., Huang DJ. Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. Journal of Agricultural *and* Food Chemistry **2002**,10 (50): 2772-2777.

218. Ouedraogo AS., Jean Pierre H., Banuls AL., Ouedraogo R., Godreuil S. Émergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest : facteurs favorisants et évaluation de la menace. Médecine et Sante´ Tropicales **2017** ; 27 : 147-154.

219. Ouedraogo Y., Nacoui M., Guissou IPIJ., GuedeGulna F. Evaluation in vivo et in vitro de la toxicite des extraits aqueux d'ecorces de tige et de racines de *mitragyna inermis* (wilid). o.ktz (rubiaceae). Pharmacopée ET médecine traditionnelle africaine **2001**; 11:13-29.

220. Oyaizu M. Studies on products of browning Reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from Glucosamine. Japanese J. of Nutrition **1986;** 44: 307–315.

P

221. Papazian L., Antoine R. 2008. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Springer Paris **2008** : p156.

222. Parajo JC. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry **2001**; 72, 145-171.

223. Peitta P., Gardana C., Peitta A. Flavonoids in herbs. In: Flavonoids in health and disease, Rice-Evans C., Packer L., ed. Marcel Dekker, New York **2003**: p 43-69.

224. Penchev P. Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat. Université de Toulouse **2010** : p1-239.

225. Peronny S. La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (Lemur catta). Thèse de doctorat, Museum national d'histoire naturelle – MNHN. Français **2005** : 34 p.

226. Perret C. Analysis de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par Btrytis cinerea. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel **2001** : p l, 173.

227. Perrut M. Extraction par fluide supercritique. Technique de l'ingénieur **2008** ; 2 (770) -1-12.

228. Perva-Uzunalic A., Skerget M., Knez Z., Weinreich B., Otto F., Grunner S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. Food Chemistry **2006**; 96(4): 597-605.

229. Pibiri MC. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de Lausanne 2005 : p63-65.

230. Pierre M., Lis M. Secrets des plantes. Editions Artemis, Paris **2007** :463p.

231. Pierre-André D. La silymarine dans l'intoxication aux amatoxines. Bulletin d'information toxicologique **2010** ; 26 (2) : 1-7.

232. Pietrangelo A., Borella F., Casalgrandi G., Montosi G., Ceccarelli D., Gallesi D., Giovannini F., Gasparetto A., Masini A.. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. Gastroenterology **1995**; 109:1941-1949.

233. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products **2000**; 63(7): 1035-1042.

234. Pokorny J., Korczak J., Gordon M. Preparation of natural antioxidant, in Antioxidants in Food: Practical Applications, 1st ed, Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England **2001;** p311-330.

235. Popovici C., Ilonka S., Bartek T. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH Cristina. Revue de génie industriel **2009**; 4: 25-39.

236. Prieto PM., Pineda M. Aguilar Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry **1999**; 269: 337–341.

237. Prior RL., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2005**; 53(10): 4290-4302.

238. Proestos C., Boziaris IS., Nychas GJE., Komaitis M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry **2006;** 95:664–671.

239. Proestos C., Lytoudi k., Mavromelanidou OK., Zoumpoulakis P., Sinanoglou VJ. Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils. Antioxidants **2013**; 2: (1) 11-22.

240. Psotova J., Kolar M., Sousek J., Švagera Z., Vicar J, Ulrichova J. Biological activities of Prunella vulgaris extract. Phytotherapy Research **2003;** 17: 1082-1087.

241. Puppo A. Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type reactions; Influence of the Iron Chelator. Phytochemistry **1992**, 31(1):85-88.

242. Puri S., Sidhu MC., Tewari R., Sharma A. Study of Phytochemicals. Trace Elements and Antibacterial Activity of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Journal of Plant Science & Research, **2015** ; (2) :2 -5.

Q

243. Quezel P., Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques. CNRS Éd **1963** : 1011 p.

244. Quy Diem DO., Angkawijaya Q., Tran-Nguyen AE., Lien HuongHuynh PL., Edi SF., Suryadi I., HsuJu Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic,* journal of food and drug analysis **2014** ;(22): 296 -302.

R

245. Ramawat KG., Mérillon JM. Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Edition: *Springer* -Verlag Berlin Heidelberg **2008**:5p.

246. Raven PH., Evert RF., Eichhorn SE. Biologie végétale. De Boeck Supérieur S.A. Ed. **2014:**527 p.

247. Ravi shankar D., Rajora AK., Greco F., Osborn HM. Flavonoids as prospectivecompounds for anti-cancer therapy. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **2013**; 45 (12): 2821-2831.

248. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine **1999**; 26(9-10): 1231-1237.

249. Regnault-Roger C, Philogène Bernard JR, Vincent C. Bio-pesticides d'origine végétale. Tec & Doc Lavoisier Ed **2008** : 259 p.

250. Regnault-Roger C. Produits de Protection des Plantes : Innovation et sécurité pour une agriculture durable. Tec & Doc Lavoisier Ed **2014** :86p.

251. Rezaire A. Activité antioxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa). Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane **2012** : 119p.

252. Ribereau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. : DUNOD Ed Paris **1968** :28p.

253. Rice-Evans CA., Miller NJ., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine **1996** ; 20(7) : 933-956.

254. Riché D. , Didier C. Micronutrition, santé et performance : comprendre ce qu'est vraiment la micronutrition. De Boeck Ed **2008** : p36.

255. Roberfroid Marce B., Coxam V., Delzenne N. Aliments fonctionnels. Tec & Doc-Lavoisier Ed **2008** : 476p.

256. Rodzko V. Abécédaire de phytothérapie **1999.**

257. Romani A., Pinelli P., Cantini C., Cimato A., Heimler D. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). Food Chemistry Journal **2006** ; 95 : 221-225.

258. Roux D. Les nouvelles plantes qui soignent. Alpen Ed Amazon France **2005** : 90p.

S

259. Saidman E., Yurquina A., Rudyk R., Molina MAA., Ferretti FH. A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. Journal of Molecular Structure **2002**; 585, (1-3): 1-13.

260. Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H., Kanazawa K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2003**; 29, 51(3): 571-81.

261. Salem N., Wissal D., Anas G., Fatma M., Gharbi S., Khammassi S., Marzouk B., Férid L., Ben Chaouacha RC. Antioxydant activity of *Silybum marianum* and *Ajuga iva* natural dyes. International Journal of Control, Energy and Electrical Engineering (CEEE)**2016;** 3(2)1-6.

262. Saller R. Phytotherapie. Haug, Heidelberg Ed **199**5 p 267-274.

263. Salvador A., Alberto C. Analysis of Cosmetic Products. Elsevier London Ed **2011**: 217p.

264. Salvayre R., Auge N., Nègre-Salvayre A. Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics Thérapeutiques. Ed Masson Paris **2003** : 269-290.

265. Sanchez-Moreno C., Larra Uri JA., Saura-Calixto F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International **1999** ; 32 : 407-412.

266. Schmelzer GH., Gurib-Fakim A. Plantes médicinales 2. Wageningen: Fondation PROTA Wageningen CTA, **2013**:145p.

267. Serteyn D., Mouithys-Mickalad A., Franck T., Grulke S., Lamy M., Deby C., Deby-Dupont G. La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. Annale de Médecine Vétérinaire **2002** ; 146 :137-53.

268. Shahidi F. Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications. Ed: The American Oil Chemists Society **2013**: 216p.

269. Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. Food Chemistry **2009**; (112): 885- 888.

270. Shibano MS., An-Shen L., Hideji I., Kuo-Hsiung L. Separation and Characterization of Active Flavonolignans of *Silybum marianum* by Liquid Chromatography Connected with Hybrid Ion-Trap and Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC–MS/IT-TOF). Journal. Natural Products **2007**;70 (9):1424–1428.

271. Sindel BM.1991. A review of the ecology and control of thistles in Australia. Weed Research **1991**; (31): 189-201.

272. Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras AR., Simonic M., Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food chem **2005**; 89: 191-198.

273. Smyth T., Ramachandran VN., Smyth WF. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. International journal of antimicrobial agents **2009** ;33(5) : 421-426.

274. Spichiger RE., Savolaine NV., Figeat M. Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées. Presses polytechnique et universitaires Ed romande **2004** : p 84, 348-349.

275. Spigno G., Tramelli L., De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering **2007**; (81): 200-208.

276. Stadtman ER., Levine RL. Protein oxidation. Annals of the New York Academy of Sciences **2000** ;(899):191-208.

277. Sulaiman SF., Sajak AAB., Ooi KL., Seow EM. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. Journal of Food Composition and Analysis **2011**; 24(4): 506-515.

278. Sun DJ., He ZH., Xia XC., Zhang LP., Morris CF., Appels R., Ma W., Wang HA. novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat. Mol. Breeding **2005;** (6):209-218.

279. Suty L. Les végétaux : des symbioses pour mieux vivre. Quae Ed. **2015** : 53p.

280. Svobodova A., Walterova D., Psotova J. Influence of silymarin and its flavonolignans on H_2O_2-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts. Burns, **2006;** (32): 973–979.

281. Syed Muhammad MS., Khan AK., Syed Muhammad HS., Kamran AC., Syed Muhammad SSP., Muhammad Asif K., Arshad F. Evaluation of Phytochemicals and Antimicrobial Activity of White and Blue Capitulum and Whole Plant of *Silybum Marianum*. World Applied Sciences Journal **2011**; 12 (8): 1139-1144.

T

282. Thiebault CM., Spumoni P., Astrand PO. L'enfant et le sport. Introduction à un traité de médecine du sport chez l'enfant. Boeck Supérieur Ed **1997** : 141p.

283. Toussaint JF., Jacob MP., Lagrost L., Chapman J. L'athérosclérose Physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques. Elsevier Masson Ed Paris, **2003 :** p 14, 269-290.

284. Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S, Hajlaoui H., Abdelly C. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. Food Science and Technology **2010** 43(4): 632-639.

285. Trease GE., Evans WC. Pharmacognosy. 15th Ed. London: Saunders Publishers **2002**: p 42, 60, 75, 391–393.

286. Tsao R. Coats JR. Starting from nature to make better insecticides. Chem. Tech **1995**: 25:23-28.

287. Turkmen N., Sari F., Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry **2006**; 99(4): 835-841.

288. Turkmen N., Velioglu YS., Sari F., Polat G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. Molecule*s* **2007***;*12: 484-496.

V

289. Valdés LJ*A*. Salvia divinorum and the unique diterpene hallucinogen, Salvinorin (divinorin) A. J. Psychoactive Drugs **1994**; (26) :277-283.

290. Valenzuela A. , Cristina L. , Karen S. , Luis AV. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. Biochemical Pharmacology **1985** ; 12 (15) : 2209-2212.

291. Valenzuela A., Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. Biological Research **1994**; 27(2):105-12.

292. Valenzuela A., Aspillaga M., Vial S., Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Medica* journal **1989**; 55:420-422.

293. Valenzuela AB., Nieto SK. Synthetic and natural antioxydants: food quality protectors. Grasas y Aceites **1996**; 47(3): 186-196.

294. Valko M., Rhodes C. J. B., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Freeradicals. Metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico- Biological Interactions **2006**; 160, p 1-40.

295. Vazquez G., Fontenla E., Santos J., Freire MS., Gonzalez-Alvarez J., Antorrena G. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (Castanea sativa) shell and

eucalyptus (Eucalyptus globulus) bark extracts. Industrial crops and products **2008** ; 28(3) : 279-285.

296. Vergely C. ; Luc R. Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. Médecine thérapeutique Cardiologie **2003**; 1(3): 131-139.

297. Verhoeyen ME., Bovy A., Collins G., Muir S,. Robinson S., de Vos CH., Colliver S. 2002. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. Journal of Experimental Botany **2002**; 53(377):209-210.

298. Vermerris W., Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry. Dordrecht : Springer Ed **2006** : p152, 237-245.

299. Vincent R. Abécédaire de phytothérapie **(1999-2000).**

300. Voyer M., Magny JF. Prématurité : le préterme. Elsevier Ed Paris **1998** : 31p.

W

301. Wallace SN., Carrier DJ., Clausen EC. Batch solvent extraction of flavanolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner). Phytochemical Analysis **2005**;16 (1):7-16.

302. Wang Y., Azeem I., Boima KJ., Liu H., Zhang W. Structural features in composition of different parts of *Silybum marianum* (L.) Gaertn.*Send to Se Pu.* 2010; 28 (12): 1192-1195.

303. Wannes W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Elyes Kchouk M., Marzouk B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (Myrtus communis var. italica L.) leaf, stem and flower. *Food and* Chemical Toxicology **2010**; 48: 1362–1370.

304. WHO monographs on selected medicinal plants. Who library cataloguing in *publication data,* Geneva, **2002**: 300 p.

305. Winston R., Hansen R., Schwarzländer M., Coombs E., Bell Randall C., Lym R. Biology and Biological Control of Exotic Thistles. Edition Federal Recycling Program **2008**; p 2, 112.

306. Wollgast J., Anklam E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International **2000**; 33: 423–447.

307. Wouters J. Concentre de CHIMIE, Presses universitaires de Namur, Amazon France **2015** : p59.

308. Xiao-Guang B., Chang-L X., Shuang-Shuang Z., Hong-Wei H., Yu-Cheng W., Ju-Xian W. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Alkoxylate Chalcones. Molecules **2014** ; 19 (11) : 17256-17278.

309. Xu G., Ye X., Chen J., Liu D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2007**; 55, 330-335.

Y

310. Yala Jean-F., Ntsameso-Mve-Mba V., Azzizet Issembe Y., Nicaise AL., Alain S. Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'Eryngium foetidium récolté dans la ville de Franceville. Journal of Applied Biosciences **2016;** 103: 9891.

311. Yusuf AZ., Zakir A., Shemau Z., Abdullahi M., Halima SA. Phytochemical analysis of the methanol leaves extract of Paullinia pinnata linn. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy **2013**; 6 (2): 10-16.

Z

312. Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan Y., Fan W., Gu G. Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry **2006**; 54: 277-286.

313. Zwergel C., François G., Sergio V., Marc D., Denyse B., Gilbert K. Aurones: Interesting Natural and Synthetic Compounds with Emerging Biological Potential. Natural product communications **2012**; 7(3):389-394.

Annexes

Annexe I : Produits chimiques et réactifs

Tableau 22 : Listes des produits chimiques et réactifs.

Produits	propriétés
Méthanol	CH_4OH, M= 32,04 g/mol
Éthanol	C_2H_6O, M=46,07g/mol, d=46,7, 95%
Eau distillée	H_2O, M=18g/mol
Alcool iso-amylique	$C_5H_{12}O$, M= 88,146 g/mol
Acétone	C_3H_6O, M=58,08 g/mole
Acides chlorhydrique	HCL, M=36,461± 0,002 g/mole
Chlorure de fer	$FeCl_3$, M=162,204 ± 0,008 g/mole
Chlorure de mercure	$HgCl_2$, M=271,5 ± 0,02 g/mole
Iodure de potassium	KI, M=166,0028 ± 0,0001 g/mole
Chloroforme	$CHCl_3$, M=119,378 ± 0,007 g/mole
Acide sulfurique	H_2SO_4, M=98,078 ± 0,006 g/mole
Hydroxyde d'ammonium	NH_4OH, M= 35,0455g/mole
Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$)	$AlCl_3$, M=137,43g/mole
Nitrite de sodium	$NaNO_2$, M=68,9953 ± 0,0008 g/mole
Hydroxyde de sodium (la soude)	NaOH, M= 39,9971 ± 0,0004g/mole
Catéchine	$C_{15}H_{14}O_6$, M=290,2681 ± 0,0148g/mole
Acide tannique (AT)	$C_{76}H_{52}O_{46}$, M= 1 701,1985 ± 0,0782g/mole
Folin-Ciocalteu	d= 1,22
Carbonate de sodium	Na_2CO_3, M= 105,9884 ± 0,0017g/mole,
Phosphate de sodium	Na_3PO_4, M=163,9407 ± 0,0012g/mole
molybdate d'ammonium	$(NH_4)_2MoO_4$
DPPH	$C_{18}H_{12}N_5O_6$, M= 394.32g/mole, d=1.4 g/cm^3
Ferricyanure de potassium	$K_3Fe(CN)_6$, M= 329,244g/mol, d=1.89 g/cm^3
Acide trichloracétique (TCA)	$C_2HCl_3O_2$, M= 163,387 ± 0,008g/mol
Acide gallique	$C_7H_6O_5$, M= 170,1195 ± 0,0075g/mol
Acide ascorbique	$C_6H_8O_6$, M= 176,1241 ± 0,0072g/mol

Annexe II : Composition des réactifs généraux des alcaloïdes

Réactif de DRAGENDORFF :

Iodure de potassium(KI)	25g
Chlorure mercurique	6.8g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

Réactif de MAYER :

Chlorure de mercure	1.36g
Iodure de potassium	5g
Eau distillée (qsp)	100 ml

Réactif de Bouchardat

Iode	2 g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée (qsp)	100 ml

Réactif de Folin - Denis

Tungstate de sodium	100g
Acide phosphomolybdique	20g
Acide phosphorique	50 ml
Eau distillée (qsp)	1000ml

- **Solution de carbonate de sodium saturée** :

Pour chaque 100 ml d'eau distillée, on dissout 35 g de carbonate de sodium à 70 à 80°C. La solution est laissée au repos pendant 24h. Les cristaux de $Na_2CO_3 \cdot 10\ H_2O$ formés, sont filtrés et le volume final ajusté.

Annexe III : Composition des différents milieux de culture

Milieu de MUELLER HINTON (milieu solide) :

Formule-type (g/l)

Extrait de viande	2.00
Peptone trypsique de caséine	17.50
Amidon	1,50
Agar	15.0
pH 7,3 ; 0,1 à 25 ° C	

Préparation des milieux à partir de la poudre déshydratée

Milieu de MUELLER-HINTON :

- Dissoudre 36g de milieu déshydraté dans l'eau distillée en agitant continuellement, puis ajuster à 1L ;
- Chauffer le milieu jusqu' à dissolution totale sur une plaque chauffante toujours en remuant avec un agitateur magnétique ;
- Autoclaver à 121° C pendant 15 min.

Milieu de GÉLOSE NUTRITIVE ordinaire

La gélose nutritive est un milieu non sélectif, essentiellement utilisé pour vérifier la pureté des souches.

Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Peptones	5
NaCl	5
Agar	15 à 20
Eau (qsp)	1000
pH : 7.4	

Annexe IV : Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC). La longueur d'onde : 280 nm.

Tableau 23 : Temps de rétention de quelques standards utilisés dans l'analyse par HPLC (La longueur d'onde : 280 nm).

Standards	Temps de rétention (min)
Acide tannique	2.317
Taxifoline	9.347
Isosilychristine	12.047
Silychristine	12.905
Silydianine	13.886
Silybine A	17.027
Silybine B	17.523
Isosilybine A	18.635
Isosilybine B	19.025
Naringine	37.70
Quercétine	47.14
Kaepmoférol	47.701
Apigenine	50.90.

Publication internationale

Valley International Journals
Open Access Journal
VIJ
New Thinking New Innovation

International Journal of Medical Science and Clinical Invention 5(03): 3641-3647, 2018
DOI:10.18535/ijmsci/v5i3.16 ICV 2016: 77.2
e-ISSN:2348-991X, p-ISSN: 2454-9576
© 2018,IJMSCI

Research Article

Effects of Different Extraction Methods and Solvents on the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Silybum Marianum* Leaves Extracts

Abbassia Benchaachoua *[1, 3], Hassiba Mahdjoub Bessam [1, 2], Imene Saidi [1, 3]

[1]Laboratory Eco Development of Areas, Faculty of Natural Sciences & Life, Djillali Liabes University of Sidi Bel-Abbes, Sidi Bel-Abbes, Algeria
[2]Department of Biology, Faculty of Natural Sciences & Life, Djillali Liabes University of Sidi Bel-Abbes, Sidi Bel-Abbes, Algeria
[3]Département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mustapha Stambouli University of Mascara, Mascara, Algeria

***Corresponding Author: Abbassia Benchaachoua**
Cite 108 logts, bloc c2 Sidi Bel-Abbes, Algeria

Abstract:

Objective: The objectives of this study were essentially to evaluate the best technique for extracting phenolic compounds from *Silybum marianum* leaves.

Subjects and Methods: Two extraction methods (maceration and decoction), using four extraction solvents. The efficiency of the extraction methods was estimated by quantifying the total polyphenol contents by the Folin -Ciocalteu method and by determining the antioxidant power of the various extracts by the ability to trap the free radical DPPH °, and the influence of these parameters on the antioxidant activity.

Results: The results showed that the extracts of the leaves by maceration have contained the highest percentage yield (24.68%); the highest content in the aqueous -methanol polyphenols extract (18.75 ± 0.55 mg GAE / g DW) against the decoction is more effective for the extraction of flavonoids and condensed tannins. The highest content of flavonoids had been recorded for the aqueous- ethanolic extract (5.08 ± 0.57 CE mg / g DW). The water had the highest content of condensed tannin (03.86 ± 0.22 TAE / g DW). On the other hand, the aqueous -ethanolic and aqueous -methanol extract of the leaves obtained by maceration have the best antioxidant capacity (73.84 ± 5.90 EAG / g DW and 73.64 ± 5.93 mg EAG / g DW respectively) and the aqueous extract of the leaves by decoction had a better antiradical power (48.64 µg / ml).

Conclusion: The extraction of phenolic compounds from Silybum marianum leaves was strongly influenced by the type of solvent and the extraction method. In addition, it is very difficult to choose an appropriate extraction solvent for all plant samples.

Key words: Silybum marianum - phenolic compounds - extraction solvent - maceration-decoction - antioxidant activity.

INTRODUCTION

The use of medicinal plants is as old as human civilization. Continuous efforts are being made to improve medicinal plants or produce their products in high amounts through various technologies. [1] Thus, plants can be considered as reservoirs of bioactive molecules still little explored. [2] Indeed, the scientific community has carried out several scientific works to study medicinal plants for the research and the valorization of new molecules, which represent the principal groups endowed with a powerful activity antioxidant or scavengers of free radicals or others of activity in order to provide solutions to oxidative stress [3]. Phenolic compounds are present in all higher plants and they are very heterogeneous compounds both by their compositions and by their structures [4]. They correspond to a very wide range of chemical structures and are characterized by a very unequal qualitative and quantitative distribution according to the considered species but also the organs, the tissues and the physiological stages, [2, 4] of very different physicochemical properties influencing the extraction of polyphenols. [5] The extraction technique is a very important step in the isolation and recovery of the active ingredients of these existing metabolites in the plant material, as well as in their identification. [6]Conventionally, the phenolic compounds were extracted by maceration or extraction at reflux with a hydro-

alcoholic mixture. [7] Numerous studies have been devoted to the study of the effect of some experimental parameters on the quantitative variation of the phenolic compounds of plant extracts on the one hand, and on its antioxidant power on the other hand, such as the mode of extraction and type of solvent. The extraction of phenolic compounds from the different plant samples is strongly influenced on the one hand by the nature and the concentration of extraction and penetration solvents in the plant material, and on the other hand the capacity of the plant sample to solubilize in solvents. [8, 9] For this purpose, it is very difficult to select a suitable solvent for the extraction of polyphenols from all plant samples.

Silybum marianum is an annual biennial plant belonging to the family of Asteraceae or composed, used for more than two thousand years in traditional European medicine. [10] Its geographical distribution is wide; it is found in a majority of European countries as well as North Africa, North and South America, South Russia and Asia Minor. In Algeria, according to Belouahem (2009), [11] the milk thistle is particularly widespread in the highlands, the steppe, the south of the Saharan Atlas, the sandy pastures and places a little wet. This plant is of medicinal and pharmaceutical interest thanks to its richness in bioactive substances; its properties are due to the presence of silymarine with a concentration of about 70 - 80%, responsible for most of the therapeutic effects of the plant. [12] Milk thistle has a significant biological and medicinal value, but remains little studied in Algeria.

In this context, we were interested in evaluating the best solvent and extraction technique of phenolic compounds in *Silybum marianum* leaves, and evaluate the influence of these parameters on the antioxidant activity.

Material and methods

Plant material

The leaves of *Silybum marianum* were harvested during the month of June in the TESSALA Mountain of the region of SIDI BEL ABBÉS- Algeria. Mr. MAHDADI Zouheir, Professor at the Department of the Environment, Djillali Liabès University, - SIDI BEL- ABBÈS (Algeria), provided us with a botanical identification of the species. The plant material was freshly collected, dried in the shade for 2 to 3 weeks, then pulverized with the MF 10 BASIC IKAWERKE grinder to obtain a fine vegetable powder.

Extraction methods

Two methods of extracting polyphenols were used, namely maceration and decoction, using four extraction solvents (methanol / water (70/30), ethanol / water (70/30: v / v); acetone / water (70/30: v / v) and distilled water.

The extraction by maceration is carried out according to the protocol described by Romani et al., 1995 and Mahmoudi et al., 2013[08, 13]: 10 g of powder of the plant material is extracted in 100 ml of the solvent (renewal twice every 2.5 hours) at room temperature with magnetic stirring, and protected from light.

The extraction by decoction: was carried out according to the protocol described by Chavane et al. (2001) [14]: 1 g of plant material is contacted with 20 ml of different solvents. The preparation is refluxed and heated (100 ° C.) for 30 minutes, repeated twice the various extracts were combined, recovered and filtered with some filter paper. The maceras and decocts thus obtained are concentrated in a rotavapor at a temperature of 50 ° C and then stored at 4 °C.

Calculation of extraction yields

Yield percentage of the various extracts obtained was defined as being the ratio between the mass of the extract and that of the dry vegetable matter subjected to the extraction [15]. It is calculated by the following formula:

Percent yield = $[W_1-W_2 / W_3] \times 100$

W_1: Weight of the flask after evaporation, W_2: Weight of the empty balloon, W_3: Weight of the starting dry vegetable matter.

Quantitative analysis of phenolic compounds

Determination of Total Polyphenol Contents

The total polyphenol content of the various extracts was achieved by the use of the Folin-Ciocalteu reagent, according to the method described by Vermerris et al., (2006) [16]: A volume of 100 µl at different concentrations of extracts was added to 2 ml of Na_2CO_3 (2%). After stirring and a rest of 5 min, 100 µl of the Folin-Ciocalteu reagent were added to the reaction medium. The absorbance was measured at 750 nm after 30 min of incubation at room temperature in the dark. A calibration curve is established using gallic acid at various concentrations (0 to 400 µg / ml) as standard. Thus, the results were expressed in milligram gallic acid equivalent per gram of dry weight (mg GAE/ g DW).

Determination of total flavonoids

The determination of total flavonoids was carried out according to the method described by Dewanto et al., (2002). [17] An aliquot of 250 µl of each diluted extract was added to 75 µl of a $NaNO_2$ solution (7%). After 6 minutes, 150 µl of an $AlCl_3$ solution (10%) was added and after standing for 5 minutes, 500 µl of NaOH were added to the mixture. The final volume of reaction medium is subsequently adjusted with distilled water at 2500 µl. The absorbance of the mixture was read at 510 nm. A calibration curve was performed with catechin at concentrations of 0 to 400 µg / ml. The flavonoid contents are expressed in milligram catechin equivalent per gram of dry weight (mg CE/g DW).

Determination of Condensed Tannins

The condensed tannins were determined by the colorimetric method of Folin - Denis, described by Joslyn, 1970. [18] One milliliters of the extract was mixed with 75 ml of distilled water, 5 ml of Folin - Denis reagent and 10 ml of the saturated solution of CO_3Na_2. The mixture was stirred by a vortex and was incubated at room temperature for 30 minutes. The absorbance of the mixture was read at 760 nm. Condensed

tannins contents were expressed in milligram (mg) equivalent of tannic acid (TA) per gram of dry weight (mg TAE / g DW).
Determination of the antioxidant activity:

Total antioxidant capacity (TAC)

It is evaluated by a spectroscopic method leading to the formation of a phosphomolybdenum complex. [19] A volume of 1 ml of reagent solution (sulfuric acid (0.6 N), sodium phosphate (28 mM) and ammonium molybdate (4 mM)) was combined with 0.1 ml of each diluted extract. After 90 minutes of incubation at 95°C and a rest of 6 minutes at room temperature, the absorbance was measured at 695 nm against a white containing methanol instead of the extract. The total antioxidant activity was expressed in mg of ascorbic acid equivalent per gram of dry weight (mg EAG / g DW).

DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay for antioxidant activity

The experimental protocol followed is that according to Sanchez-Moreno et al (1998) in [20]. An aliquot of 50 µl of different concentrations prepared in methanol of each extract were added to 1950 µl of the methanol solution of DPPH freshly prepared. A negative control is also prepared, in parallel. Absorbance was read at 515 nm after 30 min incubation. Ascorbic acid was used as a positive control. The results were expressed as inhibition percentage, calculated according to the equation below:

$$IP\ \% = ((A_{blank} - A_{sample})/A_{blank}] \times 100.$$

A_{blank}: Absorbance of the control reaction
A sample: Absorbance in the presence of plant extract.

The study of the variation of the percentage of inhibition as a function of the concentration of the extracts allows the determination of the concentrations corresponding to 50% inhibition (IC 50).

Statistical Analyses

The results of the analyzes carried out in triplicate were expressed in mean ± standard deviation. The ANOVA statistical analyzes were carried out by Excel 2003 and was applied to determine the significant difference at p <0.05.

Results

Extraction yield

The best averages of extraction yields by different solvents were for the aqueous extracts (24.68%) followed by the aqueous -methanol extract (23.24%) which were close for the – aqueous-acetonic and the aqueous -ethanolic extracts (17.31 and 16.02% respectively). In the case of maceration, water is the best extraction solvent with values of about 24.71%, followed by methanol 22.03%, ethanol (19.92%) and finally the acetone 15.43%. With regard to the decoction, the results show that water and methanol gave better extraction yields with very close values: 24.65% and 24.45% respectively. However, ethanol, showed the lowest yield (12.13%) (Figure 1). The averages of extraction yields, of the two methods used are very close and they are practically similar for maceration and decoction (20.52% and 20.10% on average respectively).

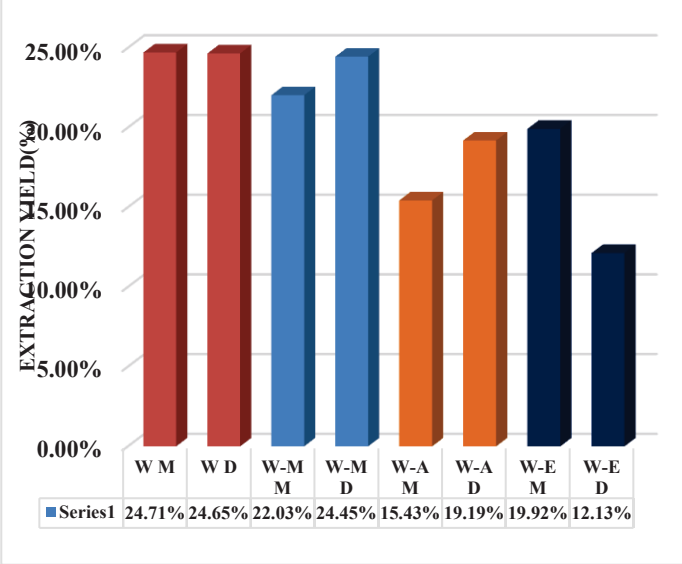


Figure 1: Extraction yields of Silybum marianum leaves by maceration and decoction

W: Water (100%), W-M: Water-Methanol (30-70; v-v), W-E: Water-Ethanol (30-70; v-v), W-A: Water-Acetone (30-70; v-v), L: Leaves, M: *Maceration, D: Decoction.*

Quantitative phytochemical analysis

Total polyphenol assays

the results of the determination of total polyphenols reveal that the highest levels of polyphenols were recorded in the extracts by maceration method: in which, the aqueous-methanol and aqueous acetonic extracts have amounts of 18.75 ± 0.55 and 16.97 ± 5.46 mg GAE / g DW respectively. Significant levels were also observed in the decoction extracts in which the aqueous- ethanol and aqueous -methanol extracts have the amounts of 16.12 ± 2.50 and 15.31 ± 0.78 mg EAG / g MS respectively. However, the aqueous extract by maceration had the lowest phenolic compounds content with a rate of 07.52 ± 0.24 mg GAE / g DW. Among the four solvent systems used, the methanol extracts offered the highest content of polyphenols. (Table 1).

Statistical analysis showed that there is no significant

difference in phenolic content (P> 0.05) for the leaves extracts obtained by maceration and decoction.

Part of the plant	Extraction solvents	Total polyphenols (mg GAE/ g DW)		Flavonoids (mg CE/g DW)		*Condensed tannins* (mg TAE / g DW).	
		By maceration	By maceration	By Decoction	By decoction	By maceration	By decoction
Leaves: (L)	Water	07.52 ± 0.24	04.23 ± 0.37	02.63± 0.39	10.93± 2.78	02.30 ± 0.22	03.86± 0.22
	Water-Methanol	18.75± 0.55	02.70 ± 0.32	04.09 ± 0.60	15.31 ± 0.78	00.75 ± 0.05	00.73 ± 0.18
	Water-Acetone	16.97 ± 5.46	0.95 ± 0.06	05.06 ± 0.44	12.18 ± 3.89	01.66 ± 0.23	01.15 ± 0.20
	Water-Ethanol	11.95 ± 1.76	03.04 ± 0.45	05.08 ± 0.57	16.12 ± 2.50	00.54 ± 0.06	01.04 ± 0.26

Table 1: The contents of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins in the leaves of Silybum marianum extracted by maceration and decoction.

Flavonoids content

The highest content of flavonoids was recorded for aqueous ethanol and aqueous acetonic, extract by decoction, with similar values of the order of 5.08 ± 0.57 and 05.06 ± 0.44mg CE mg / g DW respectively. The aqueous acetonic extract by maceration presented the lowest content (0.95 ± 0.06 EC / g MS mg / g). With regard to the extraction solvent, ethanol is the best flavonoid extractor. The results shown in table 1 indicate that the extracts of the leaves by maceration had significantly different flavonoid contents (P <0.05), closely related to the nature of the solvent and the extraction method used. While the results were insignificant (P> 0.05) for the extracts obtained by decoction.

Content of condensed tannins

The results illustrated in the table below, show that the decoction is more effective for extraction of condensed tannins than maceration. We noticed that the water had the highest contents of condensed tannin, whatever the extraction mode used, with a value of the order of 03.86 ± 0.22 TAE / g DW by decoction and 02.30 ± 0.22 mg TAE / g DW by maceration. The lowest tannin content was that of ethanol by maceration (00.54 ± 0.06 mg TAE / g DW (Table 1). Statistical analysis had shown that there was a significant effect of the polarity of the extraction solvent (P <0.05) on condensed tannin concentration of leaves extracts by maceration and by decoction.

Determination of antioxidant activity

Total antioxidant capacity

The results of this activity (Figure 2) indicate that aqueous - methanol and aqueous ethanol extracts leaves by maceration have the best antioxidant capacity compared to other extracts and had almost the same value (73.84 ± 5.90 EAG / g DW and 73.64 ± 5.93 mg EAG / g DW respectively). The other extracts showed considerable activities, except for the aqueous acetonic and aqueous extracts by decoction, which were less active with a very low total antioxidant capacity (Fe Aq D: 0.69 ± 0.041; Fe Ac D: 0.75 ± 0.04 mg EAG / g MS). The statistical study revealed that the total antioxidant capacity of leaves extracts by decoction were significantly (P <0.05) influenced by the type of solvent used, whereas the effect of the solvent was not significant for the maceration extracts.

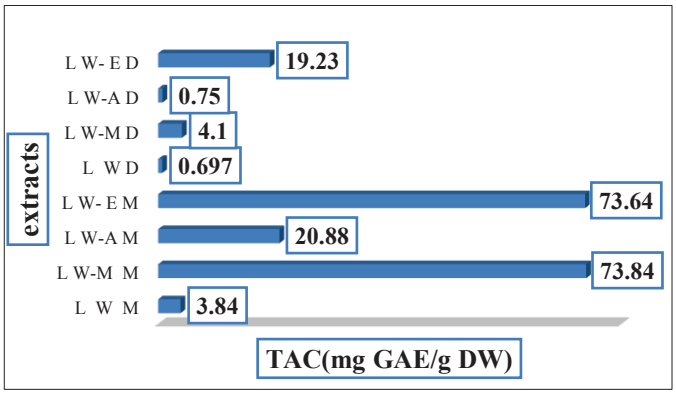
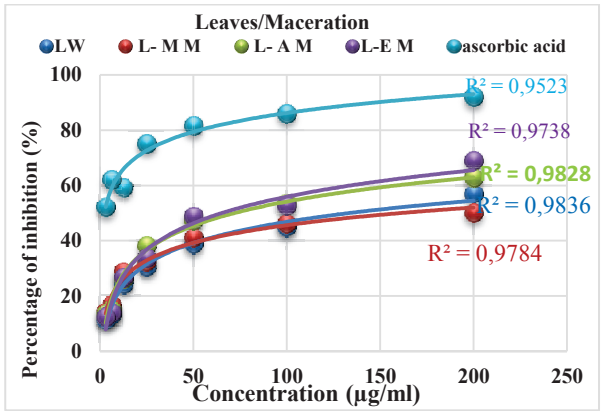


Figure 2: Comparison of the total antioxidant capacity of the extracts of Silybum marianum leaves.

DPPH radical scavenging activity

Leaves extracts by decoction of *Silybum marianum* showed significant DPPH inhibition percentage values: the leaves aqueous extract obtained by decoction had the highest value (Fe Ac D: 71.57%), followed by aqueous ethanol extract with a DPPH inhibition percentage equal to 68.88% at the concentration of 200 µg / ml. In contrast, the aqueous acetonic extract by decoction had a very low antioxidant activity showed by a percentage inhibition of 43.65% at the same concentration. The DPPH inhibition rates recorded for the standard substance (ascorbic acid) were higher than those of the various extracts of the leaves with a value of 92.06%. From the figure 3, it is noted that the percentages of free radical inhibition increase significantly (p≤0.05) with the increase of the concentration of extracts by maceration and by decoction.



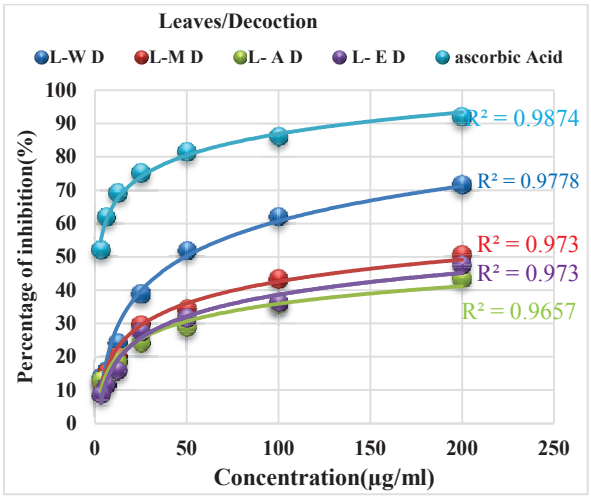


Figure 3: Percentage inhibition of DPPH radical by ascorbic acid and extracts of Silybum marianum leaves obtained by maceration and decoction (each value represents the average of three trials).

In order to compare the antioxidant efficiency of the extracts, the IC50 of the different extracts were compared. Indeed a low value of IC50 indicates an important antiradical activity. The results shown in figure 4 were classified into two groups:

The first group: extracts with IC50 values between 48.64 to 72.65 µg / ml, have significant antioxidant activities, this is the case of: L W D (48.64 µg / ml) > L W- E M (65.15 µg / ml) > L W- A M (72.65 µg / ml) extracts. The second group of extracts showed a very low ability to scavenge the DPPH radical, with IC50 values higher than 133.75 µg / ml. This is the case for all extracts, except the aqueous extract by decoction, the aqueous ethanol and aqueous acetonic extracts by maceration. All extracts tested were less active compared to the IC50 of ascorbic acid (2.17 µg / ml). The results revealed that the antiradical activity of leaves extracts obtained by maceration and decoction was significantly influenced by the nature of the extraction solvent.

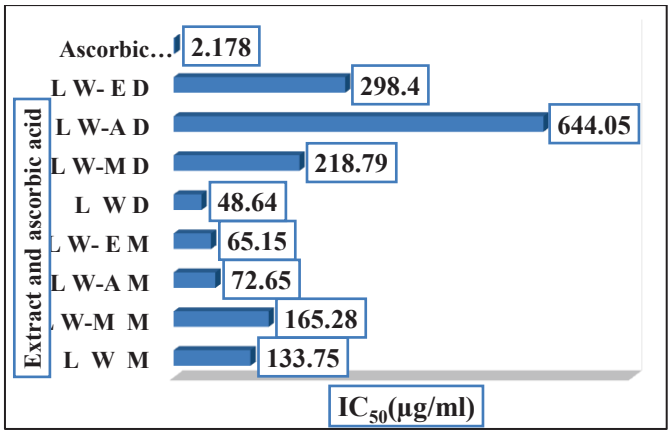


Figure 4: Minimum inhibitory concentrations 50 (IC50) of the extracts tested and the standard (ascorbic acid) by the free radical scavenging method (DPPH °).

DISCUSSION

In recent years, interest in natural antioxidants, in relation to their therapeutic properties, has increased considerably. Scientific researches in various specialties has been developed for the extraction, identification and quantification of these compounds from several natural substances namely; medicinal plants and agri-food products .[21]The results showed that the extraction yield differs according to the method and the extraction solvent. The average extraction yields of the two methods used were very similar and close for maceration and decoction. Maceration extraction is one of the simplest and most widely used extraction method for determining the content of medicinal plants as secondary metabolites, [22] and preserves metabolites and their structure, in contrary the extraction by the decoction where the heat is likely to degrade certain thermosensitive chemical compounds. [28]However, this does not mean that the decoction does not remain effective for the extraction of phenolic compounds, because it is an operation, which can be reserved for the extraction of non-thermolabile active principles. It is very fast, requiring only contact times of ten minutes. [32] In our case, the best averages of extraction yields by different solvents were for aqueous extracts. This can be explained by the fact that water is a highly polar solvent known to extract a wide range of molecules of which a significant amount of non-phenolic compounds such as carbohydrates and proteins which are one of the main causes of the increase in yield corresponding to the extraction method with hot water or by decoction. [23] .The results of the total polyphenol assay showed that the highest levels were recorded in the maceration extracts. The decoction seems to be the best method of extracting flavonoids and tannins. Our results are in agreement with the work of Mahmoudi and his collaborators (2013) ,[8] who found that maceration seems to be the best method of extraction of total polyphenols .Also, Bourgou et al., (2016) [24] revealed that the decoction of the aerial part of Euphorbia helioscopia showed high levels of flavonoids. Among the four solvent systems used, methanol offered the highest content of polyphenols (18.75 ± 0.55 mg GAE/ g DW). Our results are in agreement with (Gamil E et al., 2013 and Salem et al., 2016) that showed that the maximum amount of total phenolic compounds was obtained from artichoke leaves using methanol as the solvent for extraction .[25, 2 6] However, the contents of phenolic compounds were much higher than ours. This may be due to the variation in the metabolite content of each species as well as the geographical origin, the conditions and the duration of the drying during the harvest period. [27, 23] Regarding the extraction solvent, whatever the mode of extraction, ethanol is the best flavonoid extractor. For *Silybum marianum* leaves, the flavonoid content in the hydro-ethanol extract by maceration is lower than that of the same species previously studied by Sun et al (2016) ,[28]in the range of 03.04 ± 0.45mg ECE / g DW. Flavonoids have a wide distribution in the plant world, they are present in all parts of higher plants [29] and the great distinction between the parties appears in the level of wealth of some and the poverty of others. [08] Several previous studies have shown that the extraction yield increases significantly with the use of aqueous ethanol or aqueous methanol compared to pure organic solvent extractions. [30] More

specifically, the addition of water to the polar solvents improves the extraction of phenolic compounds, in particular with ethanol, methanol or acetone. [31] The aqueous extract of leaves by decoction and maceration, had the highest contents of condensed tannins (03.86 ± 0.22, 02.30 ± 0.22 mg TAE / g DW) respectively followed by the aqueous acetonic extract (01.66 ± 0.23 mg TAE / g DW). This result is in agreement with numerous results of researchers who indicated that the aqueous extract had the highest contents of condensed tannins followed by the aqueous acetonic extract. The disadvantage is that water extracts undesirable substances such as proteins and non-phenolic pigments that cause interference when tannin is being measured. [14] The antioxidant power of our extracts was evaluated through two methods (TAC and DPPH radical scavenging). A comparison of the antioxidant activities of the extracts obtained by the two techniques described above was carried out. The extraction by maceration gave extracts, which have a good antioxidant capacity compared to the decoctions. This may be due mainly to the richness of its extracts in biomolecules particularly: polyphenols, flavonoids and tannins endowed with important antioxidant activities and depending on the chemical structures of the bioactive molecules. The results of this activity indicate that the two extracts: aqueous-ethanol extract and aqueous- methanol extract of the leaves by maceration had the best antioxidant capacity compared to other extracts and had almost the same value (73.84 ± 5.90 and 73.64 ± 5.93 mg GAE / g DW respectively). This result can be explained by the fact that leaves extracts by polar organic solvents such as ethanol (polarity of 5.2) and methanol (polarity of 6.6) contain molecules such as polyphenols endowed with important antioxidant activities in comparison with less polar solvents. In addition, the nature of the solvents used, affects significantly the total antioxidant activity of the extracts. For the DPPH free radical scavenging test, the work done by Salem et al. (2016) stated that the percentage of free radical inhibition (DPPH) increases with increasing concentration. [26] This work shows that aqueous methanol extracts and aqueous acetonic extracts of *Silybum marianum* leaves from Tunisia have a great ability to reduce free radicals and can be used as remarkable antioxidants. Nisar et al (2013b) [32] report that the percentage of inhibition (PI%) of the stable radical (DPPH °) recorded by the aqueous ethanol extracts for the leaves of *Silybum marianum* was 52% and the work of Jing Sun, (2016) and his collaborator,[28] showed that the aqueous ethanol extracts of the leaves recorded an inhibition rate of DPPH of 56.82%. These results were a little lower compared to our extracts with a value of about 68.88%. [29] We have noticed that the aqueous leaves extract by decoction had the most important antioxidant power compared to the other extracts. This can probably be related to the quantity and quality of the polyphenols, flavonoids and condensed tannins. The availability of these can act as radical scavengers. [34] The aqueous ethanol and aqueous acetonic extracts by maceration showed an important antioxidant potential. These results are in agreement with previous work that concluded that extracts obtained using polar solvents have a more efficient activity than less polar solvents. [32] In the same optics, Bourgou et al. (2016) and Bettaieb et al. (2016) studied the influence of different solvents on the antiradical activity where ethanol was the most active, because of the good polarity and solubility of the antioxidants in this solvent. [3, 24]These authors proved that the addition of water at low ratio to organic solvents improves the extraction of powerful antioxidants.

Conclusion

From our results, we find that the leaves of *Silybum marianum* contain variable contents in phenolic compounds and consequently have different antioxidant activities. The average extraction yields of the two methods used are very similar. The results showed also, that the aqueous extracts represent the highest yield, and that the total polyphenol contents were important in methanol extract, obtained by maceration. Ethanol is the best extractor of flavonoids by decoction while the aqueous extracts (by decoction and maceration) had the highest contents of condensed tannins. On the other hand, the aqueous methanol and aqueous ethanol extracts of leaves obtained by maceration have a good antioxidant capacity compared to the decoction. Concerning the DPPH technique, the aqueous extract obtained by decoction was the most active in scavenging the free radical. The extraction by decoction seems to be a better method than maceration. Therefore, differences in the antioxidant activities of the extracts may reflect differences in their composition of phenolic compounds. In addition, the extraction of these compounds and the estimation of the antioxidant activity of the crude extracts obtained from *Silybum marianum* leaves is strongly influenced by the nature of the solvent and the extraction method used. Our results are very promising and encouraging reflecting the richness of the leaves in phenolic compounds, which can play a powerful antioxidant role, considering the nutritional and therapeutic virtues of these compounds. For a better valorization of *Silybum marianum* leaves, and in order to reduce certain diseases related to oxidative stress, further works are needed to isolate and determine the active compounds responsible for this antioxidant activity.

References

[1] Ramawat, K.G., Mérillon, J.M. (2008). Bioactive Molecules and Medicinal Plants .Edition: Springer -Verlag Berlin Heidelberg .p 5.

[2] Karmakar, I., Dolai, N., Saha, P., Sarkar, N., Bala, A., Kanti, P. Scavenging activity of *Curcuma caesiarhizome* against reactive oxygen and nitrogen species (2011). Orient Pharmacology Experimental medicine, 11:221-228.

[3] Bettaieb Rebey, J. Sriti, B., Besbess, K., Mkaddmini Hammi, I. Hamrouni, S., Marzouk B., R. Ksouri, R. Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgarae* Mill.) (2016). Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology,

27(4): 1478-1487.

[4] Macheix, J.J. Les composes phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle ? Acta Botanica Gallica(1996) 143 (6) : 473-479. Publisher online 27 APR 2013.

[5] Michel, T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*), Thèse, école *doctorale sciences et technologies,* Université d'Orléans. p 28.

[6] Quy Diem Do, Q., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen,P. L., Lien HuongHuynh, F., Edi S., Suryadi I., HsuJu,. Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic,* journal of food and drug analysis ,22 (2014) :296 - 302.

[7] Azmir, I.S.M., Zaidul, M.M., Rahman, K.M. Sharif, A., Mohamed, F., Sahena, M.H.A. Jahurul Norulaini , N.A.N. , Ghafoor, K. , Omar, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, Journal of Food Engineering , Volume 117, (2013) 426-436.

[8] Mahmoudi, S., Khali M., Mahmoudi, N. Eude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 09 (2013) 35 - 40.

[9] Sulaiman, S.F., A.A.B. Sajak, K.L. Ooi and E.M. Seow. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. J. Food Compos. Anal. (2011), 24(4) : 506-515.

[10] Morazzoni, P., Bombardelli, E. *Silybum marianum (Carduus marianus).* Fitoterapia(1995), 66 (1) 3-49.

[11] Belouahem, A. D. Biodiversité Floristique et Vulnérabilité des Aulnaies Glutineuses de la Numidie Algérienne (N.E Algérien). European Journal of Scientific Research (2009). 32 (3) p 345.

[12] Svobodova, A., Walterova, D., Psotova, J. Influence of silymarin and its flavonolignans onH2O2-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts, (2006) Burns 32, 973–979 .

[13] Romani, P. Pinelli, C. Cantini, Cimato, A., Heimler, D. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). J. Food Chem. Vol. 95. (2006) 221-225.

[14] Chavan, U.D., F. Shahidi, Naczk, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. J. Food Chem. Vol. 75. (2001) 509-512.

[15] Harborne, J.B. Plant Phenolic: Encyclopedia of Plant Physiology. *New series*. Vol. (8): (1980) 329-402.

[16] Vermerris W, Nicholson R, 2006. Phenolic Compound Biochemistry .Edition Dordrecht: Springer, 2006.p152.

[17] Dewanto, V., Wu, X., Adom, KK. Liu, RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. Journal of Agriculture and Food Chemistry (2002), 50(10): 3010-3014.

[18] Joslyn, M. A. Ash Content and Ashing Procedures. Methods in Food Analysis. Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis. Second Edition, Academic Press, New York: (1970) 109-140.

[19] Pilar, P., Manuel, P., Miguel, A. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. Analytical Biochemistry (1999), 269: 337–341.

[20] Hüseyin, G., Umut, T., LaMoreaux, J. W. , Alemania : Survival and Sustainability: Environmental concerns in the 21st Century (Environmental Earth Sciences) .Springer Berlin Heidelberg (2011) p 538.

[21] Popovici, C. , Ilonka, S., Bartek, T. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH Cristina. Revue de génie industriel (2009), 4, 25-39.

[22] Chaouch, T. M. Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen (UABT), (2014) p 35.

[23] Clémentine Bonnaillie, C. , Salacs, M., Elena Vassiliova, E., Ilonka Saykova,I. Étude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (Arachis hypogaea L.). Revue de génie industriel(2012), 7, 35-45.

[24] Bourgou, **S**., Serairi beji, R., Medini, F., Ksouri, R. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia,* Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology (2016) , 28(12), 1649-1655.

[25] Gamil, E. I., Mohamed A. E., Eldahshan, O. A., Souleman, A.M. A. .European Scientific Journal February (2013) vol.9: 1857 – 7881.

[26] Salem, N., Dhifi, W. , Anas Graya, A. , Mnafeg,F, Gharbi,S., Khammassi,S., , arzouk , B., Férid Limam1,F., Ben Chaouacha , R.C., Antioxydant activity of Silybum marianum and Ajuga iva natural dyes. International Journal of Control, Energy and Electrical Engineering (2016) 1-6.

[27] Mohammedi, Z. , ATIK, F. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *tamarix aphylla* (l.) karst. International Journal of Pharma and Bio Sciences (2013), 2:609-615.

[28] Sun, J., Xinhua, L., Xiaolei, Y. Antioxidant Activities, Total Flavonoids and Phenolics Content in Different Parts of *Silybum Marianum* L. Plants, Chemical Engineering, Transactions (2016) , (55) 37-42.

[29] Verhoeyen, M.E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., de Vos, C.H., Colliver S. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. Journal of Experimental Botany (2002), (53), No. 377:209-210

[30] Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira, J.A. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. Separation and Purification Technology, (2011), 83(15): 173-179.

[31] Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H.,

Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H., Abdelly, C. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. Food Science and Technology (2010), 43(4) : 632-639.

[32] Leybros, J. and P. Frémeaux (1990). "Extraction solide-liquide aspects théoriques." techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06.

[33] Nisar, A ., Fazal H., Abbasi B.H., Anwar S., Basir A., 2013b, DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum L.*), Toxicology & Industrial Health, 29, 460-7.

[34] Proestos, C. and Komaitis, M. 2013. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. Metabolomics 9: 1109- 1128.