

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

# Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

**Filière** : Sciences biologiques

**Spécialité** : Biotechnologie microbienne

Intitulé du thème :

## L'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de la *Silybum marianum*

Présenté par : MR LEKHAL ADEL

MR TIMZIOUINE DJILALI

MR CHOUACHI MEROUANE

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury :	Mr. Abbouni Bouziane	(Professeur, UDL-SBA)
Examineur :	Mr. Benine Mohamed Lamine	(MCA, UDL-SBA)
Examinatrice :	Melle. Ghalem Mimouna	(MCB, UDL-SBA)
Promoteur :	Mme Khaldi Amina	(MCB, UDL-SBA)

Année universitaire 2020 - 2021

Session : « Juin »

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Remerciements

*Avant tout nous remercierons ALLAH tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce mémoire.*

*Nous remercierons notre encadreur de son grand aide durant la réalisation de ce travail, elle nous a orientés vers le succès avec ses connaissances et son encouragement. Elle été présente à tout moment qu'on besoin d'elle Mme Khaledi.A.*

*Nous remercierons les membres de jury d'avoir accepté d'examiner et de juger notre travaille.*

*Mr : Abbouni.B, Mr : Benine.A.*

*Nos remerciements vont a tous les enseignants du département des la biologie.*

*Nous remercierons toute l'équipe de laboratoire de biochimie, technologie alimentaire, microbiologie appliqué, immunologie a l'université de sidi bel abbes pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructive.*

*Nous tenons à remercier monsieur le responsable de la spécialité Biotechnologies microbiennes professeur Abbouni.B.*

*Du profond de mon cœur, je dédie ce mémoire à*

*Ma mère : hadjla*

*Mon père : Mohamed*

*Qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.*

*Mes chers frères Sofien / Abdeslam / Malika / Amel*

*Pour leur soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.*

*Tous les membres de ma famille et toute personne qui porte le nom lekhfal*

*Pour l'amour et le respect qui ils m'ont toujours accordé*

*Au madame khaldi amina pour le soutien continu de cette étude, sa motivation et ses conseils tout au long du parcours*

*Mon binôme, djilali timziouine*

*Mes professeurs de faculté de science de la nature et de la vie, sidi bel Abbes*

*Mes collègues de promotion de 2ème année master biotechnologie microbienne.*

*Mes amis (es) : Mohamed / djilali / Amine / tayeb / nabil / morad / hichem / marouen / hadia*

*Pour une sincérité si merveilleuse... jamais oublié, en leur souhaitant tout le succès... tout le bonheur*

*À toute personne*

*Qui m'a aidé franchir un horizon dans ma vie*

*Adel*

*A ma très chère mère*

*Quoi que je fasse ou je dise, je ne saurais point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon très cher père*

*Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A mes chers frères ABBES et SOFIANE et mes belles sœurs SORIA, SAMIRA, CHAIMA, BAKHTA et BADRA.*

*A mes chères amies ADEL, MEROUAN, HICHEM, MOURADE, MOHAMED, HICHEM et HADIA.*

*Et à toute la promotion Biotechnologies microbiennes 2020/2021*

*Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout réussir.*

*Djilali*

*Je dédie ce travail à ma mère qui m'a soutenu*

*À mon père qui m'a tout donné*

*À mes tantes*

*À mes frères et à toute ma famille*

*À mon ami Maameri Hicham et à toute la promotion Biotechnologies microbiennes*

*2020/2021*

*Merouan*

# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.

Dédicaces

Tableau de matières

ملخص

Abstract

Résumé.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

## Partie I : Synthèse bibliographique

Introduction. .... 1

### Chapitre I : Généralités sur *Silybum marianum*.

1- Historique du chardon marie. ....	5
2- Présentation du Chardon Marie ( <i>Silybum marianum</i> ). ....	5
3- Noms de la plante. ....	6
4- Systématique de la plante ....	6
5- Habitat et Origine. ....	7
6- Reproduction. ....	8
7- Cycle vital du chardon marie.....	8
8- Description morphologique de la plante. ....	9
8.1- Racines. ....	10
8.2- Tige. ....	10
8.3- Feuilles. ....	10
8.4- Fleurs.....	10
8.5- Fruits. ....	11
8.5.1 - Composition chimique du fruit. ....	12
8.5.2 - Huile et acides gras de la graine de <i>Silybum marianum</i> ....	12

<b>9- Propriétés et activités biologiques de la plante .....</b>	<b>15</b>
<b>9.1- Les antioxydants de Silybum marianum .....</b>	<b>17</b>
<b>9.2- Silybum marianum en thérapeutique .....</b>	<b>18</b>
<b>9.2.1- Généralités .....</b>	<b>18</b>
<b>9.2.2- Toxicité .....</b>	<b>19</b>

## **Chapitre II : Activités anti-oxydantes et antimicrobiennes.**

<b>1- Les antioxydants : .....</b>	<b>21</b>
<b>2- Les radicaux libres : .....</b>	<b>21</b>
<b>3- Classification des antioxydants selon leurs natures : .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1- Les antioxydants naturels : .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2- Les antioxydants synthétiques : .....</b>	<b>24</b>
<b>4- Avantages et inconvénients des antioxydants de synthèse : .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1- Poly-phénols comme antioxydants : .....</b>	<b>26</b>
<b>4-2- Propriétés des antioxydants : .....</b>	<b>27</b>
<b>4-3- Les différents types d'antioxydants : .....</b>	<b>28</b>
<b>5 - Activité antimicrobienne : .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1- Les agents antimicrobiens : .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1.1- Mode d'action des agents antimicrobiens : .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1.1.1- Action germicide : .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1.1.2- Action germistatique (bactériostatique et fongistatique) .....</b>	<b>32</b>
<b>6 - Facteurs influençant l'activité des antimicrobiens .....</b>	<b>32</b>
<b>6.1- Nature et état du microorganisme.....</b>	<b>32</b>
<b>6.2- Nature de l'agent antimicrobien .....</b>	<b>32</b>
<b>6.3- Rôle de l'environnement .....</b>	<b>32</b>

## **Chapitre III : Composés phénoliques (Les flavonoïdes).**

<b>1 - Généralité .....</b>	<b>34</b>
<b>2 - Principales classes des poly phénols .....</b>	<b>34</b>

<b>2.1 - Les acides phénoliques simples .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1.1 - Acides hydrox-cinnamiques .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1.2 - Acides hydroxbenzoïques .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.3- Coumarines .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.4- Les flavonoïdes .....</b>	<b>36</b>
<b>1- Généralité .....</b>	<b>36</b>
<b>2 - Structure .....</b>	<b>36</b>
<b>2.1. Flavones et Flavonols .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2. Flavanones et hydro-flavonols .....</b>	<b>38</b>
<b>2.3. Flavanols .....</b>	<b>38</b>
<b>3 - Distribution et localisation dans la plante .....</b>	<b>38</b>
<b>4- biosynthèse des flavonoïdes .....</b>	<b>39</b>
<b>6- Biodisponibilités des flavonoïdes .....</b>	<b>39</b>
<b>7- Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes .....</b>	<b>41</b>
<b>8- Activités biologiques .....</b>	<b>41</b>
<b>8.1- Activité antioxydant .....</b>	<b>41</b>
<b>8.2- Protection vasculaire .....</b>	<b>41</b>
<b>8.3- Flavonoïdes et ménopause .....</b>	<b>41</b>
<b>8.4- Effet contre le cancer .....</b>	<b>42</b>
<b>8.5- Action anti-inflammatoire .....</b>	<b>42</b>
<b>8.6- Action antidiabétique .....</b>	<b>42</b>
<b>8.7- Action anti-infectieuse .....</b>	<b>43</b>
<b>8.8 - Effet sur la peau .....</b>	<b>43</b>
<b>9 - Autres utilisation de flavonoïdes.....</b>	<b>43</b>
<b>9.1- Edulcorant .....</b>	<b>43</b>
<b>9.2- Engrais .....</b>	<b>43</b>
<b>10- Propriétés botaniques .....</b>	<b>44</b>
<b>11- Les propriétés physico-chimiques .....</b>	<b>44</b>
<b>12- Propriétés pharmacologiques et emplois .....</b>	<b>44</b>
<b>13- Propriétés pharmacologiques .....</b>	<b>47</b>

# Partie II : Partie expérimentale

## Chapitre IV : Matériel et méthodes.

1 - Objectif du travail .....	48
2 - Matériel végétal .....	49
2.1 - Récolte des grains .....	52
2.2 - Méthodes d'extraction .....	53
2.2.1- Extractions par macération .....	55
2.2.2- Evaporation .....	54
2.2.3 - Extraction par les solvants .....	54
2.2.3.1 - Affrontement à l'éther de pétrole .....	54
2.2.3.2 - Affrontement par le n-butanol .....	55
2.2.4 - La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).....	56
3- Etude microbiologique .....	58
3.1 - Microorganismes tests .....	58
3.2 - Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques .....	60
3.2.1- Préparations des extraits.....	60
3.2.2- Préparation des disques (patches) .....	60
3.2.3- Préparation de l'inoculum .....	61
3.2.4- Méthode de diffusion en milieu solide : (méthode des disques).....	61
3.2.4.1 – Ensemencement .....	61
3.2.4.2 – Dépôt et incubation .....	63
3.2.4.3 – Lecture .....	63
3.3 - Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB) .....	63
3.4 - Détermination de l'activité antioxydante (DPPH) .....	64
3.4.1 - Mode opératoire .....	65

## **Chapitre V Résultats et interprétations.**

<b>Rendement .....</b>	<b>66</b>
<b>1- Profil flavonoïques sur CCM .....</b>	<b>67</b>
<b>2- Partie microbiologie .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1 - Détermination de l'activité antimicrobienne .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1.1- Diffusion des disques en milieu solide .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1.2- Antibiogramme .....</b>	<b>71</b>
<b>3.2 - Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)73</b>	
<b>3.3 - DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) : .....</b>	<b>75</b>

## **Conclusion générale et perspective.**

## **Annexes**

## **Références bibliographiques.**

## ملخص

*Silybium marianum* أو شوكة الجمل, هي نبات طبي ينتمي إلى عائلة : Astérasceae الأكثر استخداما في جميع أنحاء العالم, لثرائها في المواد النشطة بيولوجيا. ويهدف هذا العمل إلى إجراء دراسة متعمقة لهذا النبات المنتشر على نطاق واسع في الجزائر والبحث عن مركبات جديدة لها نشاط مضاد للأجسام. ويتم استخراج المكونات النشطة عن طريق التكسير بواسطة العديد من أنظمة المذيبات, ثم يتم فصلها وتحديدتها بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).

وقد تم تحديد التأثير المضاد للميكروبات بواسطة تقنية النشر على أغار ( Diffusion sur gélose Muller-Hinton ) للبكتيريا التالية ( , Staphylococcus aureus ATCC 25923 ) , ( Streptococcus pyogenes ) , ( Escherichia coli ATCC25922 ) , ( Pseudomonas aeruginosa ) ( Entérocooccus faecalis ATCC 29212 ) , ( ATCC 27853 ) , هل لنا أن نجد أن مستخلص البوتانول هو الأكثر نشاطا, نحن نميل إلى دراسة CMI و CMB. ان أعلى تأثير مضاد للبكتيريا يتم الحصول عليه بواسطة مستخلص البوتانول الذي له تأثير مثبت على البكتريا GRAM : Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus .

الحد الأدنى للتركيز المثبط هو 23.35 mg/ml. النشاط ضد السلالات التي تنتمي إلى - GRAM لم يتم تقييمها بعد.

تم تقييم القوة المضادة للأوكسدة في مقتطفاتنا المحللة عن طريق تحديد قدرتها على فح جذور ال DPPH عن طريق تحديد فعاليتها (IC50) وفقا لهذا الإعداد .

إن أفضل نشاط محاصر لجذري DPPH مقارنة بمضاد الأوكسدة الاصطناعي (حمض الأسكوربيك ) قد تم تحديدها عن طريق مع مستخلص أسيتات الإيثيل ، والبوتانول مع IC50 = 4.56 mg/ml و 6.45 mm/ml على التوالي ، ومستخلص الكلوروفورم الذي أظهر نشاط منخفض إلى حد ما مضاد للأوكسدة IC50 يتوافق مع 17.94 mm/ml .

وتبرز هذه النتائج أنشطة مضادات الميكروبات ومضادات الأوكسدة للمكونات النشطة ل *Silybium marianum* ، التي توسع الخواص العلاجية لهذا النبات ، كم يمكننا أن نقترح استخدام مستخلص البوتانول في علاج بعض الأمراض المعدية.

**الكلمات المفتاحية :** *Silybium marianum* , IC50 , نشاط مضاد للأوكسدة , نشاط مضاد للميكروبات.

# Abstract

*Silybum marianum* or Milk thistle is a medicinal plant, belonging to the Asteraceae family, the most widely used throughout the world, for its richness in bioactive substances.

This work aims to study this plant widely spread in Algeria and to search for new compounds with antibacterial activity Vis-à-vis some human pathogenic microorganisms then the evaluation of antioxidant activity.

The active principles are extracted by fractionation by several solvent systems then separated and identified by thin layer chromatography (TLC).

The antimicrobial effect was determined by the Mueller-Hinton agar diffusion method for the test bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

The highest antibacterial effect is obtained by the action of butanol extract which has an inhibitory effect on Gram (+) strains (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*), the minimum inhibitory concentration is 23.35mg/ml, the activity against Gram (-) strains remains to be evaluated.

The evaluation of the antioxidant power of our analyzed extracts was carried out by determining their DPPH radical scavenging power by determining their effective (IC<sub>50</sub>) according to this parameter, The best DPPH' radical scavenging activity compared to the synthetic antioxidant (ascorbic acid) is shown with the ethyl acetate, butanol extract with an IC<sub>50</sub> of 4.56mg/ml and 6.45mg/ml respectively then the chloroform extract which showed a rather low antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> corresponding to 17.94mg/ml

These results highlight the antimicrobial and antioxidant activities of the active principles of *Silybum marianum*, which extends the therapeutic properties of this plant, we can suggest the use of butanol extract in the treatment of some infectious diseases

**Key words:** *Silybum marianum*, antimicrobial activity, antioxidant activity, IC<sub>50</sub>

# 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.

Ce travail vise à étudier en profondeur cette plante qui est Largement répandue en Algérie et de rechercher des nouveaux composés à activité antibactérienne Vis-à-vis certains micro-organismes pathogènes humains puis l'évaluation d'activité antioxydante.

Les principes actifs sont extraits par fractionnement par plusieurs systèmes de solvants puis séparés et identifiés par chromatographie sur couche mince (CCM).

L'effet antimicrobien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton pour les bactéries-tests *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogènes*, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC 27853), *Entérocooccus faecalis* (ATCC 29212)

Puisse que nous avons trouvé que l'extrait butanol est le plus actif, nous somme penchez vers l'étude de la CMI et la CMB de ce dernier, L'effet antibactérienne le plus élevé est obtenu par l'action d'extrait butanolique qui possède un effet inhibiteur sur les souches appartenant au Gram (+) (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Entérocooccus*), la concentration minimale inhibitrice est de 23.35mg/ml, l'activité contre les souches appartenant au Gram (-) reste à évaluer.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits analysés a été réalisé par la détermination de leur pouvoir de piégeage du radical du DPPH en déterminant leur efficace (IC50) suivant ce paramètre, La meilleure activité de piégeage du radical DPPH<sup>·</sup> par rapport à l'antioxydant de synthèse (acide ascorbique) est montrée avec l'extrait acétate d'éthyle, butanol avec un IC50 de 4.56mg/ml et 6.45mg/ml respectivement puis l'extrait chloroformique qui a montré une activité antioxydant assez faible d'un IC50 corresponde à 17.94mg/ml

Ces résultats mettent en évidence les activités antimicrobiennes et antioxydante des principes actifs de *Silybum marianum*, ce qui élargit les propriétés thérapeutiques de cette plante, nous pouvons suggérer l'utilisation d'extrait butanol dans le traitement de certaines maladies infectieuses

**Mots clés :** *Silybum marianum*, activité antimicrobienne activité antioxydante IC50

## Liste des tableaux :

Tableau 1 : classification du <i>Silybum marianum</i> . .....	7
Tableau 2 : Structure et taxonomies des acides gras (Cuvelier et al.,2004). .....	15
Tableau 3 : Activités biologiques en fonction des composés actifs de <i>Silybum marianum</i> (Alaoui, 2016). 17	
Tableau 4 : Principales substances anti-oxydantes (Pokorny et al., 2001 ; Le Cren, 2004). .....	25
Tableau 5 : Les différents microorganismes utilisés. ....	59
Tableau 6 : Les différents antibiotiques utilisés. ....	62
Tableau 7 : Les rendements massiques de l'extraction. ....	67
Tableau 8 : Résultats de la CCM dans le système chloroforme/ acétone / acide formique. ....	68
Tableau 9 : Résultats de la technique de diffusion en milieu solide. ....	69
Tableau 10 : Diamètre de zone d'inhibition pour la phase acétate. ....	70
Tableau 11 : Diamètre de zone d'inhibition pour la phase chloroforme. ....	70
Tableau 12 : Résultats de la technique de diffusion en milieu solide. ....	72
Tableau 13 : Résultats de la CMI Phase n-butanol. ....	74

# Listes des figures :

Figure 1 : Répartition de <i>Silybum marianum</i> en Afrique (a), en Europe (b) et en Amérique (c) ( <a href="http://www.plants.usda.gov">www.plants.usda.gov</a> ).....	8
Figure 2 : Parties de la plante de <i>Silybum marianum</i> ( <a href="http://www.alchemy-works.com">www.alchemy-works.com</a> ) .....	9
Figure 3 : Tiges de chardon Marie ( <a href="http://www.discoverlife.org">www.discoverlife.org</a> ).....	10
Figure 4 : Feuilles de chardon Marie ( <a href="http://www.themediteckwellnessgateway.com">www.themediteckwellnessgateway.com</a> ).....	10
Figure 5 : Fleurs de chardon Marie : fraîches (a) et sèches (b) ( <a href="http://www.freeflowerpictures.net">www.freeflowerpictures.net</a> ).....	11
Figure 6 : Graines de chardon Marie : libres (a) et attachés à la fleur (b) ( <a href="http://www.sciencephoto.com">www.sciencephoto.com</a> ).....	11
Figure 7 : Structure des principaux acides gras (Touitou, 2006).....	14
Figure 8 : Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques .....	27
Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes.....	29
Figure 10 : Les flavonolignanes de <i>Silybum marianum</i> (Foster, 1990). .....	30
Figure 11 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). .....	35
Figure 12 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). .....	35
Figure 13 : Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005). .....	36
Figure 14 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna et al, 2001). .....	37
Figure 15 : Structure de quelques classes des flavonoïdes (Ravi Shankar et al., 2013). .....	38
Figure 16 : Différentes réactions conduisant aux principales familles de flavonoïdes. ....	40
Figure 17 : Méthodologie de travail. ....	49
Figure 18 : les grains de chardon marie.....	52
Figure 19 : l'étape de macération.....	53
Figure 20 : l'étape de l'évaporation.....	54
Figure 21 : Affrontement par l'éther de pétrole. ....	55
Figure 22 : Affrontement par n-butanol. ....	56
Figure 23 : les matériels utilisés pour la CCM. ....	58
Figure 24 : les systèmes de solvants utilisés pour la CCM. ....	58
Figure 25 : caractérisation des flavonoïdes sur CCM.. ....	58
Figure 26 : les déférents microorganismes utilisés.....	59

Figure 27 : Les trois différents extraits. ....	60
Figure 28 : l'étape de l'ensemencement dans BN. ....	61
Figure 29 : L'ensemencement par écouvillonnage. ....	62
Figure 30 : L'antibiogramme .....	63
Figure 31 : La préparation des dilutions.....	64
Figure 32 : Spectrophotomètre utiliser pour la lecture.....	65
Figure 33 : préparation des dilutions pour le DPPH.....	65
Figure 34 : Résultats de la technique de diffusion en milieu solide en phase de n-butanol. ....	71
Figure 35 : Résultats de l'antibiogramme. ....	73
Figure 36 : résultats de détermination de la concentration minimale bactéricide en extrait de n-butanol. ...	74
Figure 37 : Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50% de DPPH des différents extraits en mg/ml. ....	76

# Liste des abréviations

<b>BN</b>	: bouillon nutritif.
<b>C°</b>	: Degré Celsius.
<b>CMI</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice.
<b>CMB</b>	: Concentration Minimale Bactérienne.
<b>µL</b>	: Microlitre.
<b>ML</b>	: millilitre.
<b>Mm</b>	: Millimètre.
<b>Min</b>	: Minute.
<b>Nm</b>	: Nanomètre.
<b>MH</b>	: milieu Muller Hinton.
<b>HCl</b>	: chlorure d'hydrogène.
<b>L</b>	: litre.
<b>G</b>	: gramme.
<b>Cm</b>	: centimètre.
<b>V</b>	: volume.
<b>C</b>	: Concentration.
<b>Thun</b>	: tour par minute.
<b>TC°</b>	: température degré Celsius.
<b>M</b>	: mole.
<b>%</b>	: pourcentage.
<b>R</b>	: rendement.

*Partie I : Synthèse bibliographique.*

# *Introduction*

L'Algérie est dotée d'une biodiversité (plantes aromatiques, médicinales, des plantes-épices et autres) qui lui permet d'être parmi les plus riches dans le monde.

Plusieurs ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont avérées utiles et possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent des applications dans divers domaines, à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie, agriculture et encore plus.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, chimio-thérapeutiques et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (**Teixeira da Silva, 2004**).

En effet, les métabolites secondaires resteront l'objet de nombreuses recherches *in vivo* aussi bien qu'*in vitro*, la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les saponines et les huiles essentielles.

L'objectif de cette étude visera à montrer la richesse de *S. marianum* en flavonoïdes et à tester ses propriétés antimicrobiennes et antioxydants.

Pour cela, le travail réalisé comprendra plusieurs parties:

**Le premier chapitre** sera consacré aux généralités sur notre plante.

Cette étude comportera l'historique, la définition, la classification botanique et la répartition géographique.

**Le deuxième chapitre** sera dédié aux métabolites secondaires que la plante contient.

**Le troisième chapitre** rassemblera le matériel et les différentes méthodes utilisées pour notre étude de l'activité antioxydante ainsi qu'une étude de l'activité antibactérienne vis-à-vis six souches bactériennes. Il comportera aussi:

- Une séparation par fractionnement liquide-liquide comprenant des affrontements par différents solvants organiques de polarités différentes, suivie d'une purification par chromatographie sur couche mince (CCM).

- Une mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antioxydant des flavonoïdes réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB).

**Le quatrième** et dernier chapitre portera les résultats obtenus et une discussion profonde de notre expérimentation.

Pour finir, une conclusion générale sur tout l'ensemble de notre étude.

Beaucoup de métabolites secondaires sont également importants pour notre alimentation (goût, couleur) alors que d'autres parmi les alcaloïdes, flavonoïdes, quinine, lignanes, stéroïdes et terpénoïdes ont bien d'autres applications commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, des colorants, des arômes, des parfums et des insecticides (**Pichersky et Gang, 2000**).

*Chapitre I : Généralités sur Silybum  
marianum.*

## 1 - 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.

## 2 - Présentation du Chardon Marie (*Silybum marianum*) :

*Silybum marianum* ou le chardon marie est une plante annuelle ou bisannuelle robuste, de grande taille, apparemment à la famille des Astéracées ou composées, c'est le seul représentant connu du genre *Silybum* (**Vincent, 2000**), certains auteurs mentionnent cependant une seconde espèce, *Silybum eberneum*.

C'est une plante spontanée ou encore herbe 'mauvaise' identifiée depuis deux mille ans par sa valeur estimable en thérapeutique. Elle a été utilisée comme médicament populaire et traditionnel en Europe et en Asie (**Morazzoni et al ., 1993**). Elle est résistante grâce à la répartition de ces graines sur et en dessous de la surface du sol. Elle ne succombe pas facilement aux différentes tentatives de pâturage (**Bonnier ,1990**).

Le *Silybum* était déjà cité par **Plime** et **Discoride** dans son *materia medica* comme une plante médicinale du genre chardon (**Vogel encyclopédie, 2007**), le nom dérive du grec **Silybon** ou **Silybos** qui veut dire houppe (**Vincent, 2000 ; Vogel encyclopédie, 2007**).

L'adjectif *marianum* vient du latin et est lié à la vierge Marie : une légende du moyen âge veut que celle-ci, voulant dissimuler son enfant Jésus aux soldats d'Hérode, l'a caché sous un grand chardon, comme elle était entrain de l'allaiter quelques gouttes de son lait tombèrent sur les feuilles de la plante, qui se trouva ainsi maculée héréditairement (**Vincent, 2000**).

### 3 - Noms de la plante :

**Les noms vernaculaires français sont :** chardon marie, artichaut sauvage, chardon argenté, chardon de notre Dame (**Passeport santé.net, 2007** [hada site web](#)), *Silybum marial* (**Brouillet, 2002 ; AAC, 2004**), Lait de notre dame, *Silybe de marie*, chardon marbré, épine blanche (**Wiersema et léon, 1999 ; USDA, 2007**).

**Les noms étrangers sont :** en allemand *Mriandistel*, en anglais *Blessed milk thistle*, en castillon *cardo lechoso*, en italien *cardo mariano* (*cardo di santa maria*) et en chinois Shui Fei Ji (**Michael, 2003 ; Julve, 1998**).

**Ses noms vernaculaires targui ou berbère sont :** *Tawra*, *Douj-n'ilour man* (**Gharb et Bertrand, 1991 ; Belkhada, 1997**).

**Sa nomenclature en Arabe est :** *Chouk el Djemel*, *Bou-Zerwal* ou *Sùk Ez-zerwal*, *Bùzerwal*, *Hacoub* et *Lichilik* (**Neger, 1961 ; Belkheda, 1997 ; Beloued, 1998**).

### 4 - Systématique de la plante:

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

Tableau 1 : classification du *Silybum marianum*.

1- Phylum	Phanérogames
2- Sous-phylum	Angiospermes
3- Classe	Magnoliopsida
4- Ordre	Astrales
5- Famille	Asteraceae (Composées)
6- Sous-famille	Tubuliflores
7- Genre	<i>Silybum</i>
8- Espèces	<i>Silybum marianum</i> (L).Gaerthn ,1791

**La famille des Astéracées est caractérisée par deux caractères principaux :**

- ❖ des anthères soudées entre elles par leurs bords latéraux
- ❖ des fleurs groupées en capitule entouré d'un involucre formé par des bractées.

Un grand nombre d'Astéracées sont comestibles et plusieurs d'entre elles sont cultivées comme des plantes ornementales et renferment des principes actifs ou des essences aromatiques très utilisées en médecine (**Bonnier ,1990**).

**5 - Habitat et Origine :**

Le chardon Marie affectionne particulièrement les lieux secs et ensoleillés, souvent sur sols acides, secs et cailloux (**Morazzoni et Bombardelli, 1995**).

Cette plante pousse essentiellement dans un climat chaud et tempéré et ne pousse qu'au-dessus de 700 mètres d'altitude. Sa répartition géographique est concentrée sur le pourtour méditerranéen (**Rodzko, 2000**). Elle est réellement originaire des lieux incultes des pays du Maghreb, de l'Europe, et de l'Asie de l'Ouest grâce au climat favorable qu'offrent ces pays. Elle est aussi cultivée en Californie et dans l'Est des Etats-Unis. Elle pousse dans les jardins mais elle est plus dominante dans les champs incultes, dans les pâturages, le long des bordures des sentiers et entre les décombres (**Morazzoni et Bombardelli, 1995**).

Selon **QUEZEL et SANTA (1963)**, **GUITTONNEAU et HUON (1983)** et **BENISTON (1984)** cette plante est cosmopolite, préfère les sols secs et les endroits chauds et ensoleillés. On la trouve dans les champs, les terrains incultes, les décombres et les bords des routes.

Selon **SINDEL (1991)** et **GABAY et al (1994)**, le chardon marie est aujourd'hui répandu en Amérique du Nord, si bien qu'on le trouve tant au Canada qu'au Mexique, la Nouvelle-Zélande, l'Australie, l'Afrique du Sud, le Chili et l'Argentine.

En Algérie d'après **QUIZEL et SANTA (1963)**, **Belouahem (2009)**, le chardon marie est particulièrement répandue dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'Atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides.

La carte de la figure au dessus explique la répartition de cette plante en Afrique, en Europe et en Amérique ().



**Figure 1 : Répartition de *Silybum marianum* en Afrique (a), en Europe (b) et en Amérique (c) ([www.plants.usda.gov](http://www.plants.usda.gov)).**

## 6 - Reproduction :

Le Chardon marie se reproduit par la graine. Les bourgeons non ouverts et entièrement formés de fleur produiront des graines attachées à la plante (**GROVES et KAYE 1989, SINDEL, 1991**).

## 7 - Cycle vital du chardon marie :

Le chardon marie est décrit comme une plante annuelle ou bisannuelle (**Burnie, 1997 ; Vial, 1998**). Il peut accomplir un cycle de vie annuel s'il peut germer assez tôt dans la saison de croissance. Les jeunes plantes en retard d'hiver et de printemps se comporteront en tant que plantes bisannuelles (**Dodd, 1989**).

Quelques températures froides sont exigées pour la production de fleurs. La plante a un potentiel de production de 33 capitules en moyenne, chaque tête de fleur produit environ 190 graines, avec une moyenne de 6350 graines par plante dont 94 % sont viables (**Sindel, 1991**). Les graines

peuvent entrer en état de dormance, cependant n'importe quelle longueur de dormance est affectée par la température et l'humidité (Dodd, 1989) ; elles restent viables pendant neuf années, ou plus (Sindel, 1991).

La croissance et l'allélopathie végétales fortes pendant la germination pourraient expliquer la forte densité du chardon marie (Gaby et al., 1994).

Selon SINDEL (1991), lorsque la plante meurt elle peut rester pendant une longue période et maintient le secteur nu de l'autre végétation, pour la prochaine génération des jeunes plantes de Chardon marie, ces caractéristiques biologiques favorisent la croissance de chardon marie et sa dominance dans un champ.

D'après JAUZIEN (1995), c'est une plante xérophile, nitrophile préférant les parcelles à forte fumure. Elle appartient au groupe biologique des thérophytes, le nombre total de chromosomes des cellules stomatiques est de  $2n = 34$ .

## 8 - Description morphologique de la plante :

Les différents organes (racine, tige, feuilles, fleurs, graines) de la plante de *Silybum marianum* ainsi que leurs parties sont schématisés (figure I.2).



Figure 2 : Parties de la plante de *Silybum marianum* ([www.alchemy-works.com](http://www.alchemy-works.com))

**8.1- Racines :** La tige du *Silybum marianum* s'appuie sur une épaisse racine principale développée, fibreuse, pivotante, forte, longue et épaisse.

**8.2- Tige :** De plus d'un mètre d'hauteur, c'est une tige cannelée, dressée et rameuse.



**Figure 3 :** Tiges de chardon Marie ([www.discoverlife.org](http://www.discoverlife.org))

**8.3- Feuilles :** Elles sont vertes, luisantes et en général largement tachetées de blanc le long des nervures bordées de dents épineuses dont l'épine est jaune et très puissante. Les feuilles moyennes et inférieures sont allongées, aiguës et embrassent largement la tige par leur base. Les feuilles inférieures ont un pétiole, elles sont relativement très grandes, à limbe profondément divisé en segments élargis (Morazzoni et al. ,1993).



**Figure 4 :** Feuilles de chardon Marie ([www.themediteckwellnessgateway.com](http://www.themediteckwellnessgateway.com))

**8.4- Fleurs :** les capitules de fleurs sont violets (**figure 5**). Les fleurs sont à 5 étamines qui forment un tube autour du style. Elles fleurissent depuis le mois de juin jusqu'au mois d'août en Europe et en Asie (Morazoni et al. ,1993).



Figure 5 : Fleurs de chardon Marie : fraîches (a) et sèches (b)  
([www.freeflowerpictures.net](http://www.freeflowerpictures.net))

**8.5- Fruits :** (figure.6) sont sous forme de graines noires, luisantes, légèrement aplaties, plus ou moins marbrées de jaune. Elles sont lisses ou finement ridées, couronnées avec les touffes plumeuses ; chacune d'elles est insérée sur une sorte de disque (formé par le pédoncule très réduit), d'apparence cornée et portant au centre une sorte de cylindre court qui présente à son sommet 3 à 5 petits mamelons (Morazzoni et al. ,1993).



Figure 6 : Graines de chardon Marie : libres (a) et attachés à la fleur (b)  
([www.sciencephoto.com](http://www.sciencephoto.com))

### 8.5.1- Composition chimique du fruit :

Le *Silybum marianum* est un végétal riche en composés actifs de point de vue médicinal, ses propriétés sont dues à la présence de la silymarine. La graine de *Silybum marianum* contient un taux élevé de silymarine (qui peut être extraite séparément ou séparé des différents composés de l'huile) d'où l'intérêt porté à cette partie de la plante (**Karkanis et al . ,2001**).

La graine contient en fait 4 à 6 % de silymarine (**Saller, 1995**) dont 70-80% de flavonolignanes et 20-30% de composés polyphénoliques oxydés non identifiés (**Svobodova et al . ,2006**).

Cette graine contient aussi des lipides à 30-20 %, des protéines à 25-30 % et des minéraux dont les teneurs varient selon l'organe étudié (**Saller, 1995 ; Meschy et Guenguen, 1995**).

Le chardon Marie présente des teneurs élevées en calcium dans tous les organes du végétal (feuilles, graines, tige, racines) ce qui donne à cette plante une valeur alimentaire très importante (**Amrani, 2006**).

Le phosphore reste le minéral qui distingue les graines de chardon Marie avec une teneur de 0,6 g.kg-1MS (matière sèche) plus élevée que celle des feuilles et de la tige (respectivement 0,2 et 0,15 g.kg-1MS).

Les feuilles se distinguent par des teneurs importantes en sodium, en magnésium et en calcium alors que la tige est riche en potassium (**Amrani, 2006**).

L'huile extraite des graines de *Silybum marianum* contient essentiellement des lipides, de la vitamine E (50 à 60 mg/100g (**Garner, 2004**), et des flavonoïdes (0.25%, (**Garner, 2004**)) (**Li et al . ,2011**). Sa teneur élevée en acides gras insaturés (56% de polyinsaturés et 21 % de mono-insaturés) lui permet d'entrer dans les régimes anti-cholestérol et pour la prévention des maladies cardio-vasculaires (**El-Mallah et al . ,2003**).

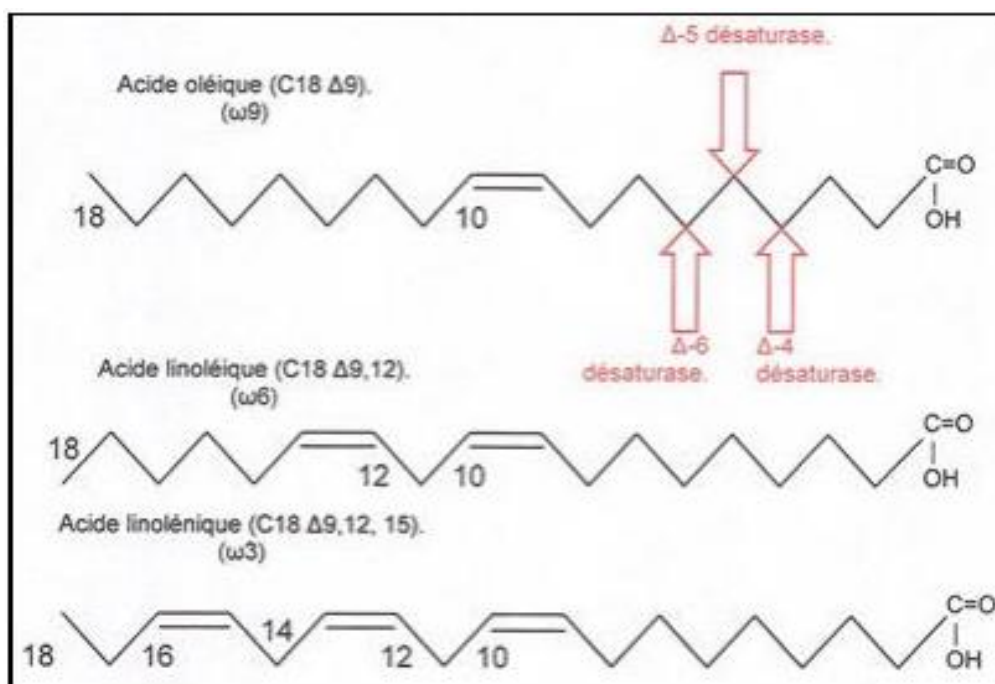
### 8. 5. 2- Huile et acides gras de la graine de *Silybum marianum* :

L'huile extraite des graines de *Silybum marianum* contient essentiellement des lipides, de la vitamine E (50 à 60 mg/100g (**Garner, 2004**), et des flavonoïdes (0.25%, (**Garner, 2004**)) (**Li et al . ,2011**). Sa teneur élevée en acides gras insaturés (56% de polyinsaturés et 21 % de mono-insaturés) lui permet d'entrer dans les régimes anti-cholestérol et pour la prévention des maladies cardio-vasculaires (**El-Mallah et al . ,2003**).

Les lipides ont un rôle énergétique (1g de lipides = 9 kcal), ils sont les principaux constituants de la membrane cellulaire, et interviennent dans les communications intra et intercellulaires. En fait les acides gras sont les constituants élémentaires des lipides ; ce sont des molécules organiques comprenant une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxylique. Cette chaîne carbonée peut être dépourvue de toute double liaison et, dans ce cas, les acides gras sont dits saturés (AGS). Elle peut aussi présenter une ou plusieurs double(s) liaison(s), les acides gras sont alors désignés sous les termes de monoinsaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI). Alors que les acides gras saturés, les monoinsaturés et une partie des polyinsaturés sont synthétisés dans l'organisme, les acides gras polyinsaturés des familles oméga 6 et oméga 3, ou tout du moins les acides linoléique et alpha-linolénique, doivent être apportés par l'alimentation (**Cuvelier et al. ,2004**).

Les acides gras insaturés sont classés en familles par rapport à la première double liaison côté méthyl terminal. Ainsi, les acides gras des familles oméga 6 (n-6 ou  $\omega 6$ ) et oméga 3 (n-3 ou  $\omega 3$ ) ont pour caractéristique d'avoir leur première double liaison située respectivement à 6 carbones (n-6) et 3 carbones (n-3) de l'extrémité méthyl. Ces deux doubles liaisons sont impossibles à insérer chez l'homme et l'animal. Par contre, l'organisme humain et l'organisme animal peuvent ajouter aux deux acides gras indispensables (**Figure I.7**) (acide linoléique C18:2 n-6 et acide alpha-linolénique C18:3 n-3) des doubles liaisons supplémentaires, vers l'extrémité carboxyle, et allonger la chaîne à cette extrémité (**Cuvelier et al. ,2004**).






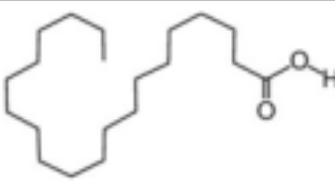


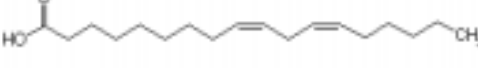

L'ensemble des dérivés obtenus, ajoutés aux deux acides gras indispensables précurseurs, constitue les deux familles d'acides gras essentiels, nécessaires au maintien d'une fonction biochimique, cellulaire ou physiologique donnée.



**Figure 7 : Structure des principaux acides gras (Touitou, 2006)**

Dans la représentation schématique des acides gras, la chaîne carbonée est symbolisée par une succession d'atomes de carbone reliée entre eux par des liaisons covalentes. Le tableau I.3 illustre les acides gras et leurs formules chimiques contenus dans l'huile extraite des graines de *Silybum marianum* (Cuvelier et al. ,2004).

Tableau 2 : Structure et taxonomies des acides gras (Cuvelier et al.,2004).

Structure	Taxonomies	Nom commun	Formule chimique
<b>C12:0</b>	Acide didécanoïque	Acide laurique	
<b>C14:0</b>	Acide tétradécanoïque	Acide myristique	
<b>C16:0</b>	Acide hexadécanoïque	Acide palmitique	
<b>C16:1</b>	Acide -7 <i>Cis</i> -9 hexadécénoïque	Acide palmitoléique	
<b>C18:0</b>	Acide octadécanoïque	Acide stéarique	
<b>C20:0</b>	Acide éicosanoïque	Acide arachidique	
<b>C22:0</b>	Acide docosanoïque	Acide behénique	
<b>C18:1</b>	Acide -9 <i>Cis</i> -9 octadécénoïque	Acide oléique	
<b>C18:2</b>	Acide -6 <i>Cis</i> -9,12 octadécadiénoïque	Acide linoléique	
<b>C18:3</b>	Acide -6 <i>Cis</i> -6,9,12 octadécatriénoïque	Acide linoléinique	

### 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 peroxyde 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 antidressive (**Mouzali, 2016**).

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

**Tableau 3 : 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 antioxydants. -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.
Flavonolignanes : Silandrine, 3-deoxysilychristine, Silibinine, Silymonine, Silydianine- Quercétol.	-Provoque la peroxydation membranaire. -Responsable de l'activité antioxydante.
Quercétol	-Propriétés de protection cellulaire.

### 9.1 - Les antioxydants de *Silybum marianum* :

Depuis ces dernières années, les antioxydants (les caroténoïdes, les tocophérols, les vitamines C et E, les poly-phénols...) ont fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques qui se sont révélés intimement liés à leur consommation dans les fruits et les légumes et à

leurs réduction des incidents cardiovasculaires et des tumeurs cancéreuses (**Milpied-Homsi, 2004**) .

A part les poly-phénols les plus connus, il existe une grande famille connue sous le nom des flavonolignanes présents uniquement au niveau des graines de *Silybum marianum*. En fait, la silymarine est un élément naturel et constitutif de ce fruit composé d'un mélange de flavonolignanes : silychristine, silydianine, et de deux groupes de diastéreisomères la silybine A, la silybine B, l'isosilybine A et l'isosilybine B (**Hadi, 2004**).

La silymarine était considérée comme un composé pur mais avec de nouvelles techniques d'analyse et de séparation, plusieurs auteurs (**Brown, 1993 ; Foster 1990**) ont confirmé que la silymarine est en réalité formé d'un mélange isomérique des flavonolignanes actifs : silychristine, silydianine et deux groupes de flavonolignanes diastereoisomériques la silybine A, la silybine B, l'isosilybine A et l'isosilybine B dont les structures chimiques sont schématisées dans la figure I.10 (**Foster, 1990**) .

Le composé le plus actif biologiquement est la silybine. Plusieurs études ont prouvé son efficacité thérapeutique par rapport aux autres composants de la silymarine.

Les deux diastéreisomères de la silybine : la silybine A (3,5,7-trihydroxy-2-[3-(R) - (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(R)-(hydroxyméthyl) - 2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-one) et la silybine B (3,5,7-trihydroxy-2-[3-(S)-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) - 2-(S)-(hydroxyméthyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-one) sont présents à des taux égaux (**Foster, 1990**).

## 9.2 - *Silybum marianum* en thérapeutique :

### 9.2.1 Généralités :

Le *Silybum marianum* est utilisé en médecine traditionnelle comme aide digestif, anti-inflammatoire, tonique antinéoplasique, diurétique (**Meschy et Guenguen, 1995**).

Au dix-neuvième siècle, il a été employé pour des problèmes du foie, du rein, de la rate, de calculs biliaires; des problèmes de grossesse et de menstruation.

Dans les années cinquante les composants du fruit du chardon Marie ont été isolés et toutes les recherches se sont concentrées sur ces composants qui représentent

exactement 4 à 6% du fruit sec de la plante. Ces composés ont été distribués dans des capsules normalisées avec une teneur de 70-80% (**Meschy et Guenguen, 1995**).

Des études ont confirmé que le chardon-Marie peut ralentir ou réduire l'activité de certaines enzymes du foie. Ces enzymes ont pour rôle de dégrader plusieurs des substances consommées, ainsi que les molécules chimiques ingurgitées comme les médicaments. Lorsque l'activité de ces enzymes est compromise, ces molécules risquent de demeurer plus longtemps dans le sang et d'atteindre des concentrations trop élevées dans le sang. Ceci entraîne des effets secondaires ou aggrave des effets secondaires déjà existants. Alors que si l'activité de ces enzymes est stimulée, les taux de médicaments risquent d'atteindre des valeurs sous les normales. Dans ce cas, le VIH pourra résister plus facilement aux médicaments et les options thérapeutiques futures seront limitées (**El-Mallah et al. ,2003**).

### **9.2.2 Toxicité :**

Le chardon Marie est non-toxique. Dans une étude expérimentale réalisée sur des souris, les résultats ont montré qu'elles pouvaient tolérer une dose de 20g kg-1. Toutes fois des réactions allergiques ont été reportées (**Sindel, 1991 ; Saller, 1995**).

*Chapitre II : Activités anti-oxydantes et  
antimicrobiennes.*

### 1. Les antioxydants :

Lorsque les systèmes antioxydants sont débordés, c'est-à-dire quand l'équilibre entre les réactions pro-oxydantes et anti-oxydantes 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 : le 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**).

### 2. Les radicaux libres :

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta, 2003**).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxy  $\text{ROO}\cdot$ , radical alkoxy  $\text{RO}\cdot$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

### 3. 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)

#### 3.1- Les antioxydants naturels :

Les antioxydants primaires sont des enzymes antioxydants essentielles, naturellement produites par notre organisme, ils possèdent une action directe sur les ERO. Ces enzymes antioxydants 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 anti oxydantes majeures sont :

##### ➤ Super-Oxyde Dismutase (SOD) :

Le rôle majeur du super-Oxyde Dismutase (SOD) est de catalyser la dis-mutation des ions super-oxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire :



##### ➤ La catalase :

Transforme le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle puis en  $\text{H}_2\text{O}$  au niveau des peroxysomes. Elle interviendrait essentiellement lorsque  $\text{H}_2\text{O}_2$  est produite en excès

(hyperoxie) ou dans les situations d'insuffisance du système glutathion (Voyer & Magny, 1998 ; Papazian & Roch, 2008) :



➤ **La glutathion-peroxydase ou (GPx) :**

Catalyse la transformation directe d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et d'autres hydro-peroxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydro-peroxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. Son action nécessite la présence du couple glutathion réduit-glutathion oxydé (Voyer & Magny, 1998).



Ces trois enzymes anti-oxydantes ont besoin pour être activées d'être mises en présence de minéraux issus des aliments : fer pour la catalase, zinc et cuivre pour la super-oxyde 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<sub>2</sub> pour former un hydro-peroxyde et un radical d'alpha-tocophérol 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 bêta-carotène** (précurseur de la vitamine A) à un rôle de protection des lipides membranaires en interrompant la chaîne de lipo-peroxydation 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 antioxydants (Voyer et Magny, 1998 ; Papazian & Roch, 2008).

### 3.2 - Les antioxydants synthétiques :

Sont généralement des composés phénoliques d'origine pétrochimique. Parmi les antioxydants synthétiques: le butylhydroxytoluène (BHT), du butylhydroxyanisole (BHA) qui sont autorisés pour la conservation des produits alimentaires et pharmaceutiques (**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 antioxydants, qui peuvent contribuer à la formation d'un groupe de composés connus sous le nom de nitrosamines, dont certains sont cancérigènes (**Decloître, 1992**).

Tableau 4 : Principales substances anti-oxydantes (Pokorny et al., 2001 ; Le Cren, 2004).

Antioxydants primaires	
Enzymes Cytosoliques	Vitamines
<ul style="list-style-type: none"> <li>- GPX (Glutathion Peroxydase).</li> <li>- GRD (Glutathion réductase).</li> <li>- GRT (Glutathion transférase).</li> <li>- SOD (Superoxyde Dismutase).</li> <li>- Catalase.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vit C.</li> <li>- vit E (Tocophérols).</li> <li>- Vit Q (Ubiquinone).</li> <li>- Vit A (Rétinol).</li> <li>- Vit B5 (A. pantothénique).</li> </ul>
Antioxydants secondaires naturelles	
Minéraux	Phytochimiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sélénium.</li> <li>- Zinc.</li> <li>- Manganèse.</li> <li>- Cuivre.</li> <li>- Magnésium.</li> <li>- Anhydride sulfureux (SO<sub>2</sub>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Terpènes.</li> <li>- Poly-phénols</li> </ul>
Antioxydants de synthèse	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- BHT (3,5ditertobutyl4hydroxytoluène).</li> <li>- BHA (3-tertiobutyl4-hydroxyanisole).</li> <li>- TBHQ (tertiobutylhydro -xyquinone).</li> <li>- Trolox (acide-6-hydroxy-2, 5, 7,8. tetraméthylchroman-2-carboxylique).</li> <li>- Gallate de propyle (E310).</li> <li>- Gallate d'octyle (E311).</li> <li>- Gallate de dodécyle (E312).</li> </ul>	

#### 4 - Avantages et inconvénients des antioxydants de synthèse :

Actuellement, l'emploi des molécules anti-oxydantes 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 anti-oxydante (Valenzuela et al., 1996).

**4-1 Poly-phénols comme antioxydants :**

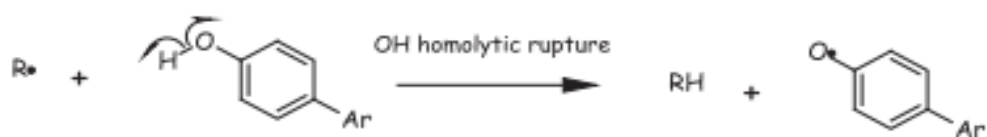
Les poly-phénols peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (anion super-oxyde :  $O_2^-$ , radical hydroxyle : OH) pour produire des radicaux phénoxy stables. Ils peuvent aussi agir comme des antioxydants grâce à leur capacité à complexer les ions métalliques (**Collin et Crouzet, 2011**).

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**).

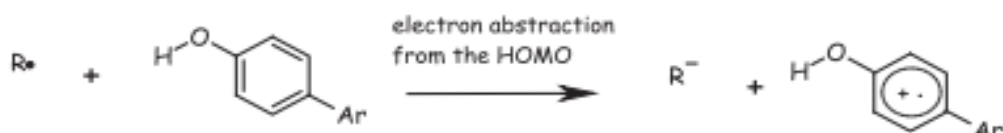
La stabilité du radical est garantie par une structure aromatique permettant une forte délocalisation électronique (**Monin, 2012**). Ils sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices des espèces oxydantes (telles que la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclo-oxygénase, la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

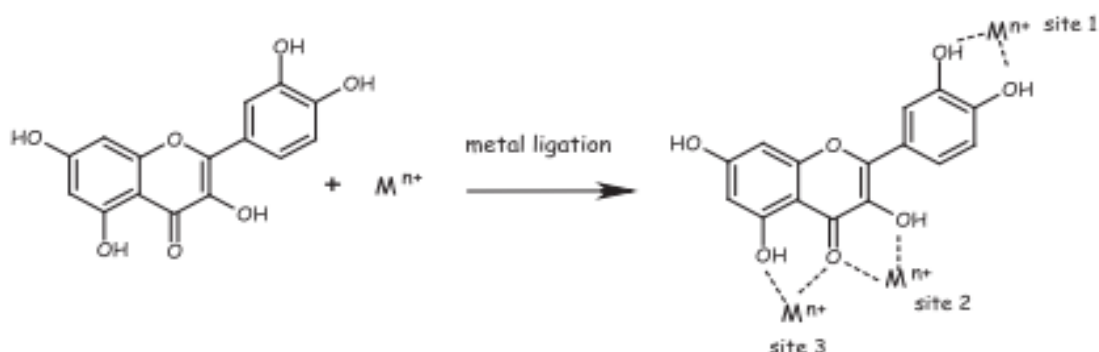
## 1. Hydrogen Atom Transfer (HAT)



## 2. Single Electron Transfer (SET)



## 3. Transition Metals Chelation (TMC)



**Figure 8 : Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques**

(Leopoldini et al., 2011).

#### 4-2 Propriétés des antioxydants :

D'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur : il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont réduire les radicaux libres si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé. Ainsi, les antioxydants présents dans les aliments protègent les molécules organiques (par exemple les graisses ou l'ADN) de l'oxydation et semblent jouer un rôle protecteur contre la cancérogénèse. Comme les antioxydants sont aussi interdépendants donc en cédant un électron, ils deviennent eux-mêmes des radicaux libres qui doivent être rééquilibrés et réduits (Mette et Berger, 2006).

### 4-3 Les différents types d'antioxydants :

Les antioxydants cellulaires élaborent un système de défense perfectionné contre l'agression radicalaire (**Hadi, 2004**). Ils sont caractérisés par un mécanisme d'action qui peut être direct comme pour le cas des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques ou indirect en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydants (**Mette et Berger, 2006**).

Dans ce travail, nous nous intéressons aux antioxydants non enzymatiques exogènes et plus précisément aux poly-phénols.

#### - *Les poly-phénols :*

De nombreuses études épidémiologiques et expériences in vitro réalisées sur les animaux révèlent que les poly-phénols présents au niveau de certains fruits et végétaux possèdent des propriétés anti-oxydantes et exercent des effets anti-inflammatoire, anticarcinogénique, antibactérien, anti-antimutagène, antiviral, antibactérien anti-tumorales. Les poly-phénols sont des substances présentes dans les boissons obtenues à partir des plantes, des fruits, et des légumes, tels que l'huile d'olive, le vin rouge et le thé (**Curtay et Robin, 2000**).

Durant les dix dernières années, des études ont prouvé que les poly-phénols ont, in vivo et in vitro, une activité qui consiste à réduire et à empêcher les effets de l'oxygène d'où dérivent les radicaux libres liés à des maladies humaines. Un intérêt spécial a été porté au rôle thérapeutique neurodégénératoire comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (**Mette et Berger, 2006**). Les poly-phénols sont divisés en trois familles :

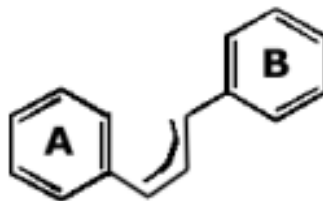
- Les flavonoïdes.
- Les tanins.
- Les anthocyanes.

Nous nous intéressons plus précisément dans ce travail à la famille des flavonoïdes.

- *Les flavonoïdes :*

Sont des métabolites secondaires végétaux. Ils constituent un des plus vastes groupes de poly-phénols naturels et présentent un large champ d'activité biologique aussi bien chez les animaux que chez les végétaux (**Richter, 1993 ; Stevens et coll. ,1998**). Ce sont des substances colorées (**Guignard, 1979**) et sont responsables de la coloration de nombreux fruits, légumes, fleurs,... (**Adrian et coll., 1995**).

Biochimiquement, les flavonoïdes appartiennent à la famille des benzopyrones, la sous – classe des gamma-benzopyrones.



**Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes.**

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique basique puisqu'ils ont une origine biosynthétique commune. Cette structure est selon **Brunetton (1999)** représentée par un squelette identique formé de deux cycles en C6 (figure I.8) schématisé par les unités aromatiques A et B reliés par une chaîne en C3 (**Mohammedi, 2006**).

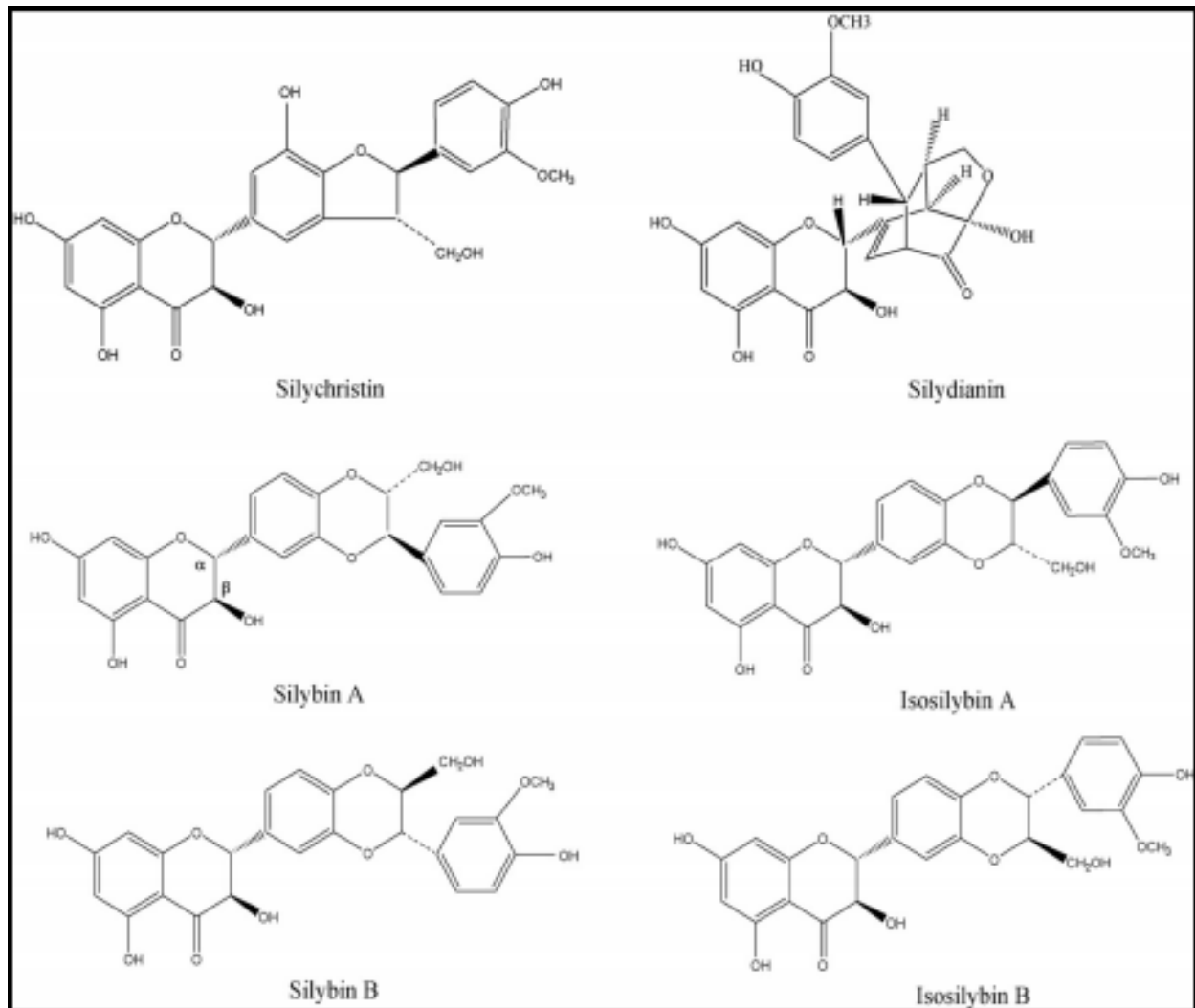


Figure 10 : Les flavonolignanes de *Silybum marianum* (Foster, 1990).

De nombreux traitements, destinés à combattre le virus de SIDA provoquent l'endommagement du foie, du tube digestif et même des reins : la silymarine a pu aider à traiter ces dommages dont les plus importants sont l'indigestion, l'affaiblissement de la fonction rénale et hépatique (Berger, 2006).

Les propriétés pharmacologiques attribuées à la silymarine sont essentiellement les propriétés de la silybine qui ont été étudié par Vogel (1968). En fait, les propriétés antioxydantes de la silybine ont été observées dans divers modèles cellulaires, y compris des cellules de foie (Foster, 1990).

La silybine a un pouvoir hépatoprotecteur qui protège contre la phalloïdine, l' $\alpha$  amanitine, le praséodymium, le tétrachlorure de carbone, l'éthionine et la thioacétamide, poisons qui ont en commun l'attaque élective des hépatocytes (**Curtay et Robin, 2000**).

Elle stimule l'ARN polymérase I et donc la synthèse de l'ARN et des protéines (**Foster, 1990**).

## **5 - Activité antimicrobienne :**

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (**Kaufmann, 1997**).

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

### **5.1 - Les agents antimicrobiens :**

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes (**Asada et al., 1998**).

Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus forts que les dommages qu'elles causent à l'organisme; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme (**Perry et al., 2002**).

#### **5.1.1- Mode d'action des agents antimicrobiens :**

##### **5.1.1.1- Action germicide :**

Cette action caractérise les agents ayant une action létale sur les microorganismes. En fonction de la catégorie de microorganismes ciblés, les agents antimicrobiens exercent une

---

action bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent anti-champignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti- protozoaires) (**Bousseboua, 2006**).

#### **5.1.1.2- Action germistatique (bactériostatique et fongistatique) :**

Dans ce cas, les agents inhibent la croissance du microorganisme sans le tuer (bactérie ou champignon) (**Bousseboua, 2006**). Les substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien, les microorganismes recommenceront à se développer dès que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue (**Guiraud 1998**).

### **6 - Facteurs influençant l'activité des antimicrobiens :**

#### **6.1- Nature et état du microorganisme :**

Les différences existants entre les espèces microbiennes entraînent une sensibilité variable à l'égard des agents antimicrobiens caractérisé chacun par son spectre d'activité plus ou moins large, et également par leur nature.

#### **6.2- Nature de l'agent antimicrobien :**

Les agents antimicrobiens diffèrent par leur efficacité et leur spectre d'activité. Dans le cas des agents physiques, l'activité microbicide augmente souvent avec la dose, alors que pour les agents chimiques, les effets seront d'abord bactériostatiques puis bactéricides. Cependant, l'activité de certains d'entre eux dépend de leur stabilité, pour d'autres elle est liée à leur décomposition ; c'est le cas par exemple de l'hypochlorite de sodium et peroxyde de l'hydrogène (**Guiraud, 1998**).

#### **6.3- Rôle de l'environnement :**

La population à détruire ou à inhiber n'est pas isolé mais elle est soumise a des facteurs de l'environnement qui peuvent offrir une protection ou favorisé la destruction par exemple la chaleur tue plus facilement à pH acide. La nourriture et les boissons acide tel que les fruits et les tomates, sont plus facilement pasteurisé que les denrées alimentaires plus neutres comme le lait et les solutions huileuses (**Prescott et al., 2003**).

# *Chapitre III : Composés phénoliques*

*(Les flavonoïdes)*

## 1 - Généralité :



Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000**).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, d'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (**Macheix et al., 2005**).

## 2 - Principales classes des poly phénols :

### 2.1 - Les acides phénoliques simples :

#### 2.1.1 - Acides hydrox-cinnamiques :

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Figure.11).

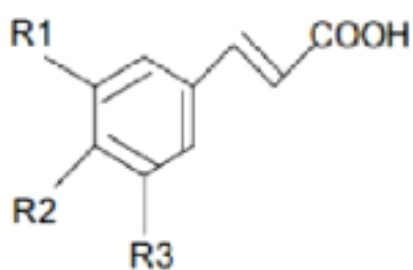
	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure 11 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

### 2.1.2- Acides hydroxybenzoïques :

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans **la figure (12)**.

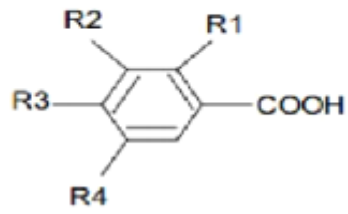
	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Figure 12 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

### 2.1.3- Coumarines :

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (**Figure 13**).

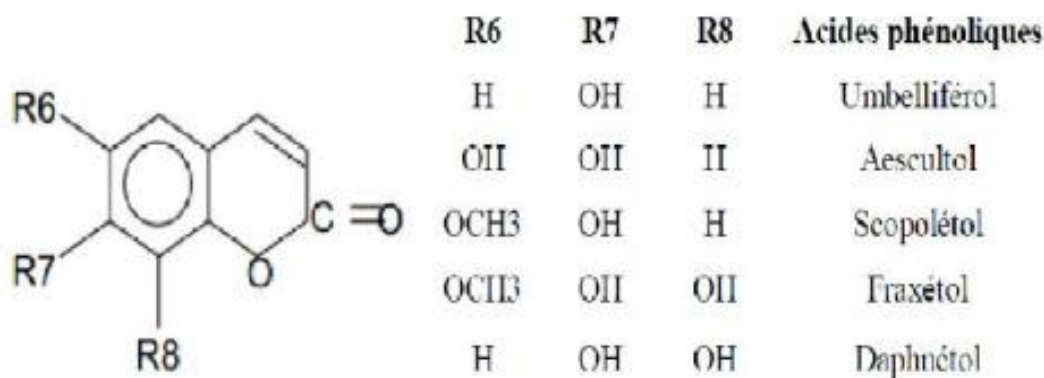


Figure 13 : Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

#### 2.1.4- Les flavonoïdes :

##### 1 - Généralité :

Le terme flavonoïde provient du latin flavus signifiant jaune. La présence de flavonoïdes a été révélée dans le zeste du citron par les travaux du Hongrois Szent-Gyorgyi en 1936 et 1937 sur le scorbut. Avant lui, la première substance flavonoïde obtenue à l'état pur : le Morin, a été isolée par Chevreul en 1814. Le terme "flavonoïde" provient du nom flavedo correspondant à la couche externe des écorces d'orange. Ce terme désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des poly-phénols (**Gérard, 2004**) qui sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles (**Riberau-Gayon, 1968**).

Les flavonoïdes sont répandus dans toutes les parties de la plante : racines, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus ; les anthocyanes sont plutôt localisées dans la partie externe des fruits, des fleurs et les cellules épidermiques; les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets des fleurs. Les flavonoïdes sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées).

##### 2 - Structure :

Les flavonoïdes sont des composés de la série C6-C3-C6 ayant deux noyaux aromatiques A et B, unis par un pont à trois carbones. L'élément commun de ces composés, dont plusieurs milliers ont été décrits, est d'être rattaché à un noyau de base : le 2-phenyl-chromane (**Breneton, 1987**).

La numérotation des atomes commence par l'hétéroatome d'oxygène avec passage au noyau A ; les deux atomes communs au cycle A et à l'hétérocycle ne sont pas numérotés, car toutes les valences sont occupées dans la structure des cycles et aucun atome ou radical supplémentaire ne pourra s'y ajouter. Dans le noyau B, la numérotation est indépendante et commence par le carbone lié au pont ou à l'hétérocycle (**Rakipov, 1987**).

Il faut signaler que la numérotation est différente chez les chalcones et les auronés. La substitution des noyaux aromatiques se fait selon un schéma caractéristique, imposé par la biosynthèse ; les substituants peuvent être : OH, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>-O-(très rare) ou -O-Oside.

Le noyau A est habituellement substitué en 5 et en 7 ; un troisième oxygène, libre chez les chalcones en 6' est engagé dans le pont éther du pyranne ou du furanne central (2-benzylcoumaranes). Plus rarement, il est monosubstitué ou, au contraire, polysubstitué ; occasionnellement il peut être prénylé ou alkylé par un ose (**Bruneton, 1987**).

Le noyau B, dans la majorité des cas, est substitué par une fonction hydroxyle (en para) ou par deux (en méta et para). Une troisième substitution n'est pas rare (une en para et deux en méta), mais l'absence de substitution est exceptionnelle (**Bruneton, 1987**).

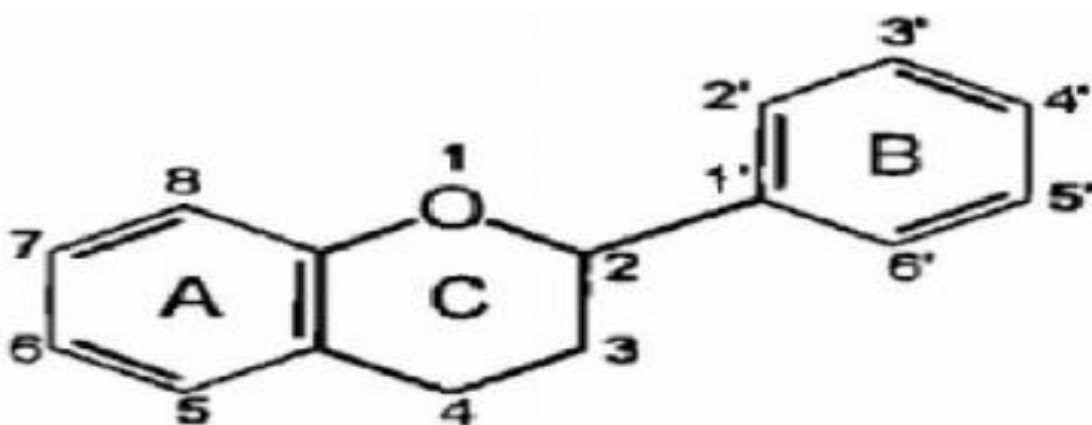


Figure 14 : Structure chimique de base des flavonoïdes (**Krishna et al, 2001**).

### 2.1. Flavones et Flavonols :

- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée, le composé est nommé flavone dérivé de 2-phénylchromen-4-one.
- Si le squelette est substitué en position C3 par un groupement hydroxyle et une fonction C=O en C2-C3, il est désigné par le nom flavonol dérivé de 3-hydrox-2-phénylchromone-4-one (**figure 15**).

## 2.2. Flavanones et hydro-flavonols :

Se caractérisent par la présence des centres d'asymétrie et l'absence de la double liaison entre C2 et C3.

## 2.3. Flavanols :

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4. Ce sont des dérivés de 2-phényl-3-chromanol (**Bruneton, 1999**).

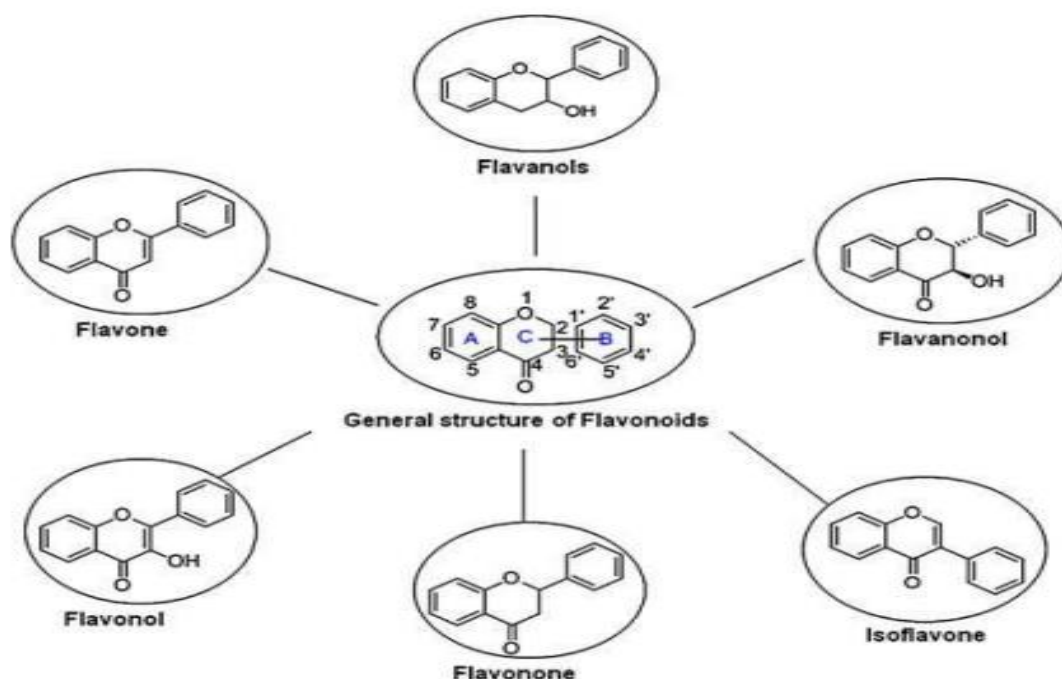


Figure 15 : Structure de quelques classes des flavonoïdes (**Ravi Shankar et al., 2013**).

## 3 - Distribution et localisation dans la plante :

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonoïque. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (**Remsy et al. 1996**).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (**Bruneton, 1993**).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont largement abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri **(Bronner et Beecher, 1995)**.

#### 4 - Biosynthèse des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont dérivés des phényles propanoïdes caractérisés par l'adjonction au noyau coumaryl en C6- C3 activé par le coenzyme A (Comaryl – CoA), 3 acétyles (fournis par le malonyl – CoA) ; réaction suivie d'une cyclisation qui aboutit à une chalcone, la tetrahydroxy-chalcone ; l'enzyme est la chalcone synthase (CHS), les légumineuses possèdent en outre une chalcone réductase (CHR) qui co-agissent avec la CHS, peut aboutir à la trihydroxy chalcone **(Heller et al., 1998)**.

#### 5 - Biodisponibilités des flavonoïdes :

Les effets des flavonoïdes sur la santé ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être absorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes absorbés, Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des flavonoïdes est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé **(Walle, 2004)**.

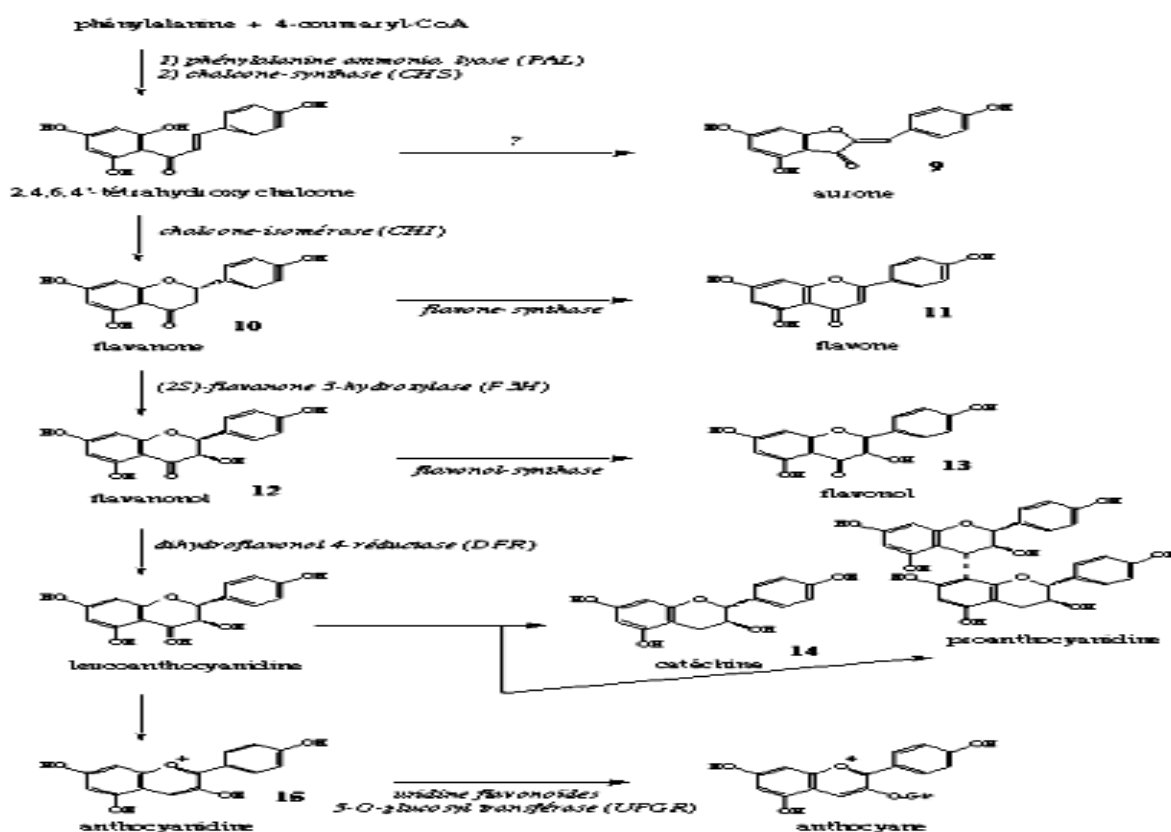


Figure 16 : Différentes réactions conduisant aux principales familles de flavonoïdes.

([Www. Détour Santé.com/flavo-perso .htm](http://Www.Détour Santé.com/flavo-perso.htm))

La chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse des divers flavonoïdes, elle est en équilibre avec les flavonoïdes, cet équilibre étant contrôlé par une enzyme, la chalcone isomérase, conduisant à une cyclisation stéréospécifique du cycle donnant naissance aux flavanones (**Bruneton, 1933**). Les chalcones gardent la structure de tri ou tétra-stérols. Les flavanones dérivent des précédentes par une cyclisation du noyau central, conduisant à un hétérocycle, suite à une isomérisation par la chalcone isomérase (CHI) (**Heller et al. 1998**).

Les flavones, particulièrement abondantes chez les légumineuses (fabales) dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle. Les flavonols se différencient des flavones par la présence d'un OH en C3. Les isoflavones dérivent aussi des flavanones, mais après une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C2 au C4 de l'hétérocycle (**Heller et al. 1998**).

Les anthocyanes dérivent également des flavanones suite à une réduction par la flavone -3 hydroxylase (F3H) en dihydrokaempférol (un dihydroxyflavonol) ; une deuxième réduction est opérée par une dihydroflavonol réductase (DFR) (**Heller et al.,1998**).

## 6 - Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques, certaines établies depuis longtemps (2000 ans), par leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques multiples, dans cette partie on va citer certaines actions de flavonoïdes.

## 7 - Activités biologiques

### 7.1 - Activité antioxydant :

Les antioxydants sont largement utilisés dans la prévention primaire et secondaire, les plus connus sont le  $\beta$ -carotène, l'acide ascorbique, le tocophérol, les tanins, les anthocyanes, les acides phénoliques, le lycopène et les poly-phénols (**Bjelakovic et al., 2007**). Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres générés par notre organisme en réponse aux agressions de l'environnement (cigarette, polluants, infectieux, etc.) qui favorisent le vieillissement cellulaire. Les antioxydants renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires.

### 7.2 - Protection vasculaire :

Les flavonoïdes sont « veino-actif » c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance ; une étude menée aux Pays Bas (l'étude Zutphen) a mis en évidence le fait que les personnes chez qui l'on a donné une dose importante de flavonoïdes sont moins exposées aux maladies cardiaques que les autres (**Hertog et al. 1995**). Grâce à l'effet synergique des flavonoïdes, de nombreuses plantes sont maintenant classées dans la catégorie des protecteurs vasculaires (**Rice et al. 1996**).

C'est ainsi que l'on classe les flavonoïdes de raisins dans cette catégorie (**Fleuriet et al. 2005**).

### 7.3 - Flavonoïdes et ménopause :

Les flavonoïdes ont également des effets protecteurs contre les maladies hormono-dépendantes. En effet, les isoflavones du soja par exemple, interagissent de manière spécifique avec les récepteurs des oestrogènes et inhibent les bouffées de chaleur chez la femme ménopausée, pour cela, ils sont maintenant considérés comme phyto-oestrogènes. La quercétine de l'oignon et le kaempferol de la chicorée, possèdent de leur côté des propriétés pseudo-oestrogéniques qui inhibent la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. De nouvelles études restent cependant nécessaires pour valider ces effets sur l'être humain (**Fleuriet et al., 2005**).

#### 7.4 - Effet contre le cancer :

Les flavonoïdes ont pour effet d'inhiber l'activité d'une enzyme, la topo-isomérase II, qui joue un rôle essentiel dans l'apparition du cancer, notamment la maladie de Hodgkin. Ils ont largement montré leurs effets protecteurs contre plusieurs cancers, dont la prostate, le colon et le poumon (**Rice et al., 1996**).

Par ailleurs, la Silymarine, fraction principale des flavonoïdes de *Silybum marianum*, 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 et favorise l'écoulement de la **bile** (**Ferenci et al., 1989; Alarcon, 1995**). Les flavonoïdes de raisins permettent la prévention et le traitement des cancers; ils ont également des activités anti-tumorales et chimio-préventives.

([www. Détour. Santé.flavonoïdes.htm](http://www.Détour.Santé.flavonoïdes.htm))

#### 7.5 - Action anti-inflammatoire :

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols du cacao, peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils éliminent la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation. Il a été également démontré que d'autres flavonoïdes inhibaient la sécrétion des mastocytes impliqués dans les phénomènes inflammatoires (**Fleuriet et al., 2005**), cette activité concerne de nombreux composés phénoliques et en premier lieu l'acide salicylique sous sa forme acétylé (acétyl salicylique) commercialisée sous le nom d'aspirine. Ainsi que certaines anthocyanes, la cyanidine extraits de cerises, les flavonoïdes des agrumes (**Manthey, 2000**).

#### 7.6 - Action antidiabétique :

En raison de ses propriétés anti-oxydantes et de son long passé d'utilisation dans le traitement des désordres hépatiques, la Silymarine est utilisée pour décliner la glycémie chez des diabétiques, Une équipe de chercheurs de l'hôpital Oronfalcone à Gorizia en Italie a traité 60 patient diabétiques quotidiennes pendant 12 mois avec 600 mg de Silymarine ou un placebo (**Anonyme, 1997/1998**).

D'autres études cliniques ont montrés également l'efficacité de la Silymarine dans la régulation de la glycémie sanguine, qui descend d'une moyenne de 190 mg/dl à 174 mg/dl. Bien qu'une telle diminution des niveaux sanguins de sucre puisse augmenter le risque d'hypoglycémie. Les patients traités par la Silymarine n'ont pas eu d'augmentation du nombre d'épisodes légers ou sévères

d'hypoglycémie, suggérant que la Silymarine stabilise la glycémie en même temps qu'elles à diminuer (Nutranews, 2003).

#### **7.7 - Action anti-infectieuse :**

Les flavonoïdes accélèrent le processus de destruction des agents pathogènes en améliorant la capacité des macrophages à les neutraliser. La transformation des macrophages en antigène est donc plus rapide et les lymphocytes-T peuvent intervenir avec plus d'efficacité (Fleuriet et al. 2005).

#### **7.8 - Effet sur la peau :**

Des composés extraits de myrtilles ou des épinards amélioreraient la signalisation des messages nerveux et pourraient ralentir le processus de vieillissement (Rice et al., 1996 ; Martini, 2006), les poly-phénols participent à la lutte contre le vieillissement cutané en tant que molécules anti-radicalaires ou en tant que protecteurs de protéines de dégradation des protéines de structure de la peau comme l'élastine et le collagène (Closs, 2002). Par ailleurs, une étude préliminaire sur l'utilisation d'extraits de plantes comme filtres UV a démontré que l'incorporation de flavonoïdes à une solution à 2% de filtre solaire synthétique, augmente sensiblement l'indice de protection de celui-ci (Ramos et al. 1996).

### **8 - Autres utilisation de flavonoïdes :**

#### **8.1 - Edulcorant :**

Un puissant édulcorant, la néo-hespéridine di-hydro-chalcone (E958) est utilisé en alimentation pour les boissons non alcoolisées. Cet édulcorant est synthétisé à partir d'un flavonoïde particulier : la néo-héspéridoside (molécule naturelle amère).

([www.Détour.Santé.flavonoïdes.htm](http://www.Détour.Santé.flavonoïdes.htm)).

#### **8.2 - Engrais :**

Le généticien Don Smith a associé les flavonoïdes à un cocktail de bactéries fixatrices d'azote. Le résultat a été concluant : la récolte a augmenté d'au moins 10%.)

([www.Détour.Santé.flavonoïdes.htm](http://www.Détour.Santé.flavonoïdes.htm))

### 9 - Propriétés botaniques :

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes, puis ils migrent et se dissolvent dans les vacuoles. Ils interviennent comme constituants des chromoplastes (**Bruneton, 1933**).

La plante fabrique des flavonoïdes pour se protéger de l'oxydation et c'est le rayonnement solaire qui stimule cette réaction. Plus l'ensoleillement augmente, plus les teneurs en flavonoïdes augmentent, surtout dans les parties les plus exposées. Ils servent également à attirer l'attention des insectes pollinisateurs, ou au contraire à dessiner des formes pour éloigner les prédateurs, certains flavonoïdes sont mêmes toxiques pour les insectes ([www. Détour Santé.com/flavo-perso.htm](http://www.Détour Santé.com/flavo-perso.htm))

### 10 - Les propriétés physico-chimiques :

- Les flavonoïdes (poly phénols) sont des acides faibles (du aux phénols)
- Les flavonoïdes sont des solides cristallisés de coloration jaune plus ou moins intense selon les catégories.
- Les génines sont solubles dans les solvants organiques apolaires (éther) et peu soluble dans l'eau.
- Les hétérosides sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), alcools et autres solvants polaires mais insolubles dans les solvants organiques apolaires.
- Les flavonoïdes en solutions alcalines donnent une coloration jaune qui disparaît par l'ajout d'un acide.
- Ils possèdent un spectre UV caractéristique au type de noyau ce qui permet leur identification.
- Les flavonoïdes (poly phénols) forment des chélates avec les ions métalliques à forte charge positive ( $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ).

### 11 - Propriétés pharmacologiques et emplois :

#### 11.1 - Propriétés pharmacologiques:

- a) Les flavonoïdes sont des substances veinoactifs : cette action se situe au niveau des petites veines et des capillaires se traduisant par une augmentation de la résistance des

capillaires et une diminution de leur perméabilité : c'est l'action **Vitaminique P** ou action **veinotrope**.

- b) les flavonoïdes sont des **antioxydants** : ils capturent et neutralisent les EOR (espèces oxygénés réactives) impliquées dans le stress oxydant.
- c) les flavonoïdes inhibent, in vitro, un grand nombre d'enzymes : histidine décarboxylase, protéine kinase C, 5lipoxygénase...
- d) Autres activités : diurétiques, antispasmodiques, anti-ulcère gastrique, anti-inflammatoire...

Les flavonoïdes sont des molécules pratiquement atoxiques et bien tolérées chez l'homme mais leur action est lente.

### 11.1.1 - Emplois :

Anciennement, les drogues à flavonoïdes étaient employées comme colorant (Genêt des teinturiers) En thérapeutique, un certain nombre de drogues à flavonoïdes sont utilisées soit en nature (infusion), soit sous forme d'**extraits standardisés** ou pour l'**extraction** des flavonoïdes (citro-flavonoïdes, rutine...) dans le traitement des **troubles capillaro-veineux** :

- Insuffisance veino-lymphatique (Jambes lourdes, varices, hémorroïdes...).
- Fragilité capillaire (purpura, pétéchie...).
- Métorrhagie lors de la contraception.
- Troubles de la circulation rétinienne et choroïdienne.

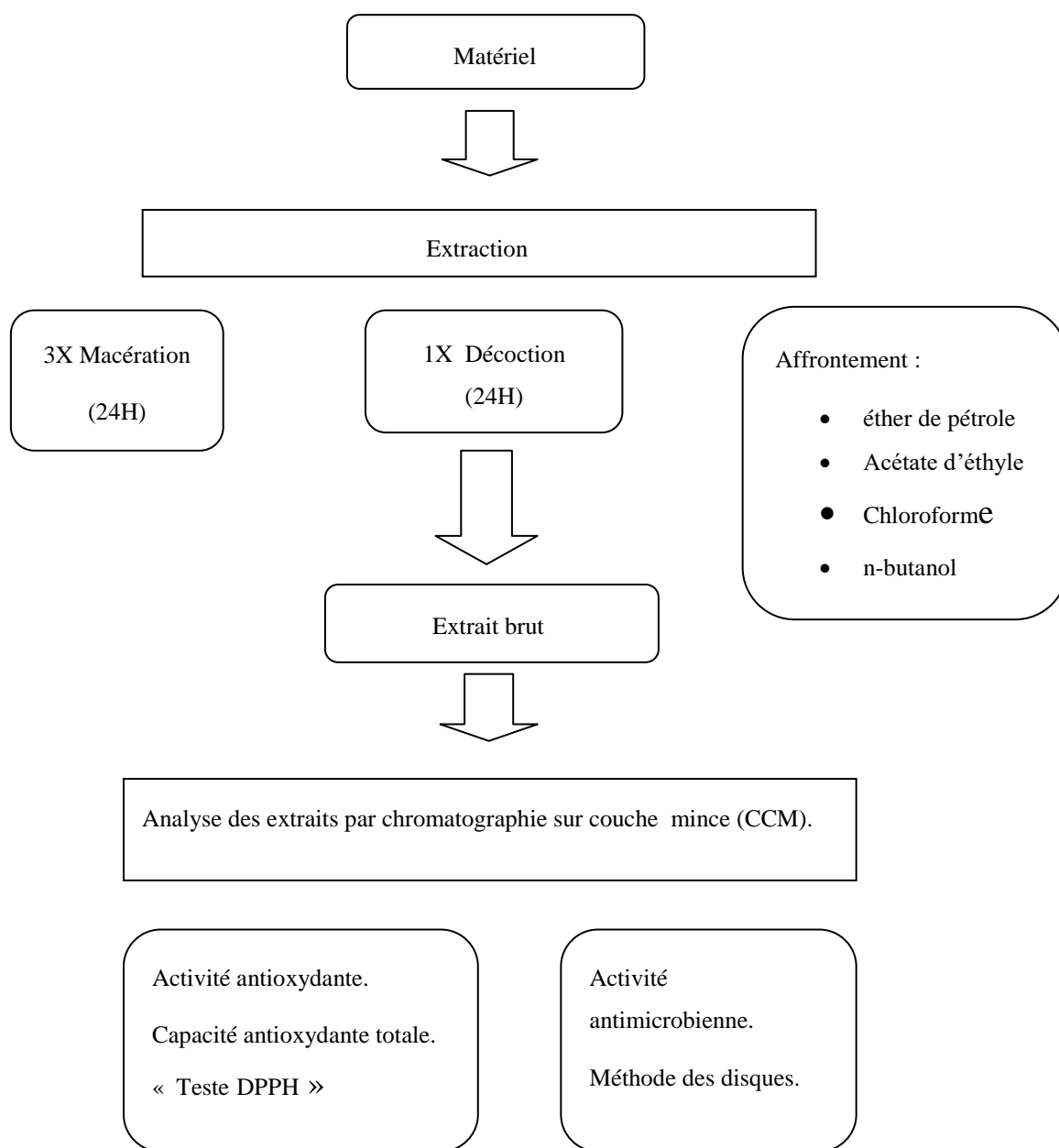
## *Partie II : Partie expérimentale*

*Chapitre IV :*  
*Matériel et méthodes*

## Objectif du travail

L'objectif visé dans cette étude consiste essentiellement à étudier *Silybum marianum* et de déterminer en particulier l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de cette plante, à savoir les flavonoïdes utilisant trois méthodes d'extraction (macération, décoction et affrontement). Nous employons, pour ce faire, un solvant d'extraction (méthanol) et quatre solvants d'affrontement (éther de pétrole, acétate d'éthyle, n-butanol, chloroforme) afin de voir l'influence de ces paramètres sur l'activité antioxydante et antimicrobienne.

Cette expérimentation a été réalisée au sein des laboratoires de « Biochimie appliquée », « Technologie de la nutrition », « Microbiologie générale » au département de Biologie, de l'Université DJILALI LIABÈS de Sidi Bel Abbès.



**Figure 17 : Méthodologie de travail.**

**1 - matériel utilisé pour l'étude antibactérienne de la *Silybum marianum* :****➤ Appareillage et verreries :**

- 1- Anse de platine.
- 2- Balance électronique.
- 3- Bec Bunsen.
- 4- Boites de pétri.
- 5- Becher (100ml / 200 ml / 50 ml)
- 6- Tubes stériles.
- 7- Tubes a hémolyse.
- 8- Pipettes graduées (20 ml / 10 ml / 5 ml).
- 9- Micropipettes (1000µl / 250 µl / 50 µl).
- 10- Microplaques.
- 11- Pipettes pasteur.
- 12- Erlenmeyer.
- 13- Ampoule a décanté.
- 14- Eprouvette gradué (100ml).
- 15- Etuve.
- 16- Four pasteur.
- 17- Papier filtre.
- 18- Pince métallique.
- 19- Rotavapor.
- 20- Pompe sous vide.
- 21- Papier aluminium.
- 22- Disques d'antibiotiques.
- 23- Ecouvillons.
- 24- Mortier & pilon.
- 25- Broyeur électrique.
- 26- Agitateurs.
- 27- Tamis de 0,20 mm.
- 28- Flacons (740ml / 1000ml /420 ml / 250ml)

➤ **Produits et milieux de cultures :**

- 1- Bouillon nutritif.
- 2- Bouillon Muller-Hinton.
- 3- Gélose Muller-Hinton.
- 4- Gélose nutritive.
- 5- Méthanol.
- 6- Ethanol.
- 7- N-butanol.
- 8- Acétate d'éthyle.
- 9- Acétone.
- 10- Chloroforme.
- 11- AC formique.
- 12- Eau distillé.
- 13- Eau physiologie stérile.
- 14- Ether de pétrole.

## 2 - Matériel végétal :

### 2.1 - Récolte des grains :

Notre étude est réalisée sur les graines d'une plante: *Silybum marianum*.

Les grains de *Silybum Marianum* ont été achetés en mai 2021 au niveau magasin de fournitures des oiseaux à sidi bel abbés- Algérie. Les grains sont récupérés et sauvegardés pendant une semaine.



Figure 18 : les grains de chardon marie.

### 2.2 - Méthodes d'extraction :

La méthode d'extraction des flavonoïdes correspond à une macération suivie d'une évaporation, ensuite une décoction puis une extraction par les solvants. Elle est effectuée au niveau du laboratoire de TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE de l'université de DJILALI LIABES à sidi bel abbes.

Ces techniques d'extractions utilisent un solvant pour la macération ((Méthanol/eau (80/20)), un solvant pour la décantation (Méthanol) et quatre solvants pour la décoction (affrontement).

#### 2.2.1 - Extractions par macération :

Peser 100 g de graines broyées en une poudre fine, on ajoute un volume du mélange méthanol / Eau (80:20) (280ml méthanol + 70ml eau distillé = 350ml du solvant). Cette macération se fait en trois temps, c'est-à-dire on laisse macérer dans un agitateur pendant trois jours successifs à l'ombre

avec changement du solvant chaque 24 heures, ceci pour permettre une meilleure extraction des composées flavonoïques.

Les solutions hydro-alcooliques (le volume total de la macération) obtenues sont réunies dans un même récipient pour subir une filtration par la pompe sous vide afin d'obtenir une solution limpide.



**Figure 19 : l'étape de macération.**

### **2.2.2- Evaporation :**

Elle est réalisée dans le laboratoire de BIOCHIMIE à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rota-vapor) R 120 à une température de 45°C.

On met notre échantillon au rota-vapeur à température 44°C pendant 30 min afin de séparer le solvant à partir de l'échantillon.

Après 30min, Le résidu sec est repris par 200ml d'eau distillée bouillante qui aide à la récupération des composés restés collés aux parois du ballon d'évaporation. Il est ensuite laissé pendant 24 heures afin de subir une décantation pour éliminer les boues, graisses et résines risquant de gêner la suite des opérations, puis il est filtré sur par la pompe sous vide.



**Figure 20 : l'étape de l'évaporation**

### **2.2.3 - Extraction par les solvants :**

. Pour cela, la phase aqueuse est affrontée successivement par les solvants suivants : l'éther de pétrole, le chloroforme l'acétate d'éthyle, et le n-butanol.

#### **2.2.3.1 - Affrontement à l'éther de pétrole :**

On stérilise l'ampoulé à décanter et la fixe dans le support. On prend 100 ml de phase aqueuse et la déversés dans une ampoule à décanter à laquelle on rajoute 100 ml d'éther de pétrole. Après une agitation énergique et un repos de quelques minutes en laissant s'échapper à chaque fois les gaz produits. On observe deux phases :

- La phase éther de pétrole supérieure contenant les boues.
- La phase aqueuse inférieure contenant des flavonoïdes.

La phase éther de pétrole qui ne renferme pas de composés phénoliques est rejetée, quant à l'autre phase, elle est évaporée à sec avec le Rotavapor, puis pesée et reprise dans du méthanol (4 à 5 ml).



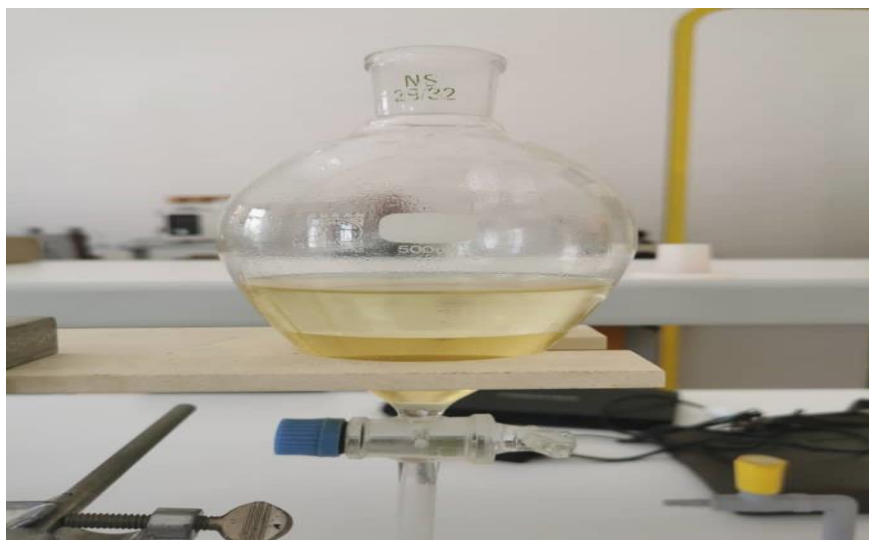
**Figure 21 : Affrontement par l'éther de pétrole.**

#### **2.3.3.2 - Affrontement par le n-butanol :**

La phase aqueuse obtenue après affrontement à l'éther est remise dans l'ampoule à décanter pour subir les mêmes opérations que précédemment. La phase aqueuse se retrouve en haut de l'ampoule et la phase n-butanol en bas ; celle-ci est récupérée dans un bécher, alors que la phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter pour être affrontée au solvant suivant. Le même protocole est répété pour les deux autres solvants : **l'acétate d'éthyle et le chloroforme.**

Après l'étape d'affrontement par les solvants, on passe à l'étape de l'évaporation par l'évaporateur rotatif.

Les différentes phases (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, butanol, et eau) sont évaporées à sec et chaque extrait est repris par un minimum de méthanol (5ml) pour être utilisé dans les tests phyto-chimiques et antimicrobiens.



**Figure 22 : Affrontement par n-butanol.**

#### **2.2.4 - La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) :**

La CCM s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexe de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée générale sur les constituants d'un extrait ou d'une fraction, et permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions sont bien déterminées.

La séparation des flavonoïdes a été réalisée par la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM) au niveau du laboratoire de biochimie de l'université de Djilali Liabes a sidi bel abbes. La chromatographie est arrêtée lorsque le solvant a parcouru une distance à 2 à 3 cm du bord supérieur de la plaque. Le solvant est éliminé par évaporation à température ambiante.

La mise en œuvre de la CCM nécessite plusieurs étapes :

➤ **Préparation de la cuve :**

- On Prépare le mélange de solvants qui constituera l'éluant.
- On Verse dans la cuve à chromatographie afin d'obtenir une hauteur de liquide d'environ 1 cm.
- On Bouche la cuve afin d'éviter l'évaporation des solvants

➤ **Préparation de la phase stationnaire :**

Dans notre étude, nous avons utilisé la plaque de silice, elle est très fragile.

Éviter de la toucher avec les doigts.

On tracer au crayon gris, à environ 1,5 cm du bord inférieur de la plaque, un trait qui constitue la ligne de dépôt.

On place sur cette ligne des marques, régulièrement espacées, dont le nombre est égal à celui des échantillons à déposer.

➤ **Choix de la phase mobile (systèmes solvants appropriés) :**

Le système de solvants qu'on a utilisé est celui ayant donné les meilleures séparations (migrations) ; c'est le chloroforme avec l'acétone et l'acide formique (75ml /16.5ml /8.5ml).

➤ **le dépôt :**

Le dépôt des extraits a été fait linéairement de façon ponctuelle avec un capillaire. Dans cette étude, nous avons travaillé avec trois extraits : phase chloroforme, phase acétate, phase butanol.

➤ **développement des plaques :**

Les plaques sont placées dans la cuve de CCM après sa saturation par la vapeur du solvant d'élution. Le bord de la plaque où a été effectué le dépôt est trempé dans du solvant approprié, en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt de l'échantillon et le mélange de solvant. Les différents constituants de l'échantillon déposé migrent avec des vitesses différentes. Dans le cas idéal on obtient autant de taches que les constituants sur le trajet de migration du solvant.

➤ **Visualisation des taches :**

Dans notre travail, la visualisation des taches (spots) de flavonoïdes a été faite sous UV à 254 nm dans une chambre noire.

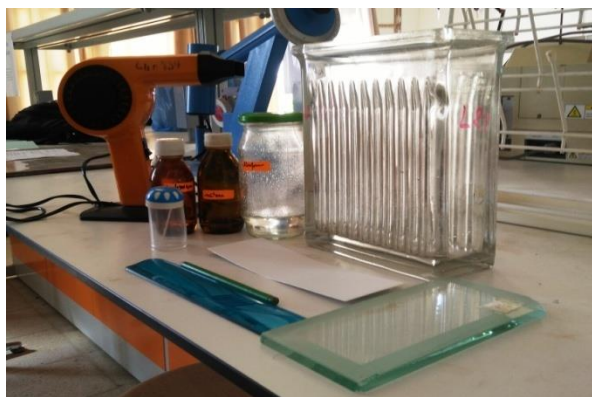


Figure 23 : les matériels utilisés pour la CCM.



Figure 24 : les systèmes de solvants utilisés pour la CCM.



Figure 25 : caractérisation des flavonoïdes sur CCM..

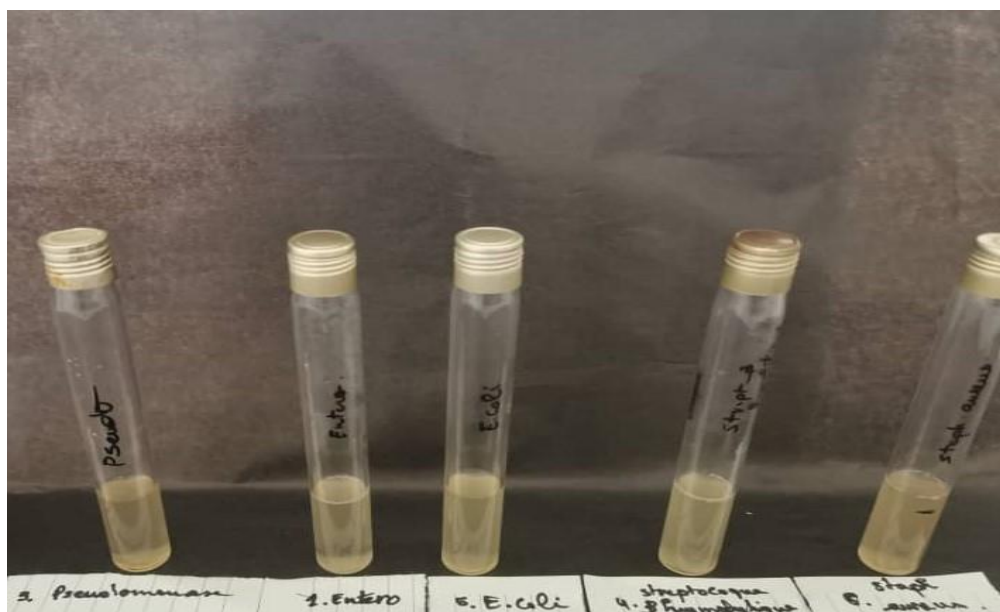
### 3. Etude microbiologique :

#### 3.1 - Microorganismes tests :

Les microorganismes testés proviennent des laboratoires de microbiologie général et laboratoire de microbiologie appliqué de l'université de Djilali Liabes – SIDI BEL ABBES. Ils correspondent aux espèces suivantes:

**Tableau 5 : Les différents microorganismes utilisés.**

Catégorie	Genre et espèce	Références ATCC
Bactéries Gram -	• <i>Escherichia. coli</i>	ATCC 25922
	• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
Bactéries Gram +	• <i>Entéroccoccus faecalis</i>	ATCC 29212
	• <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923
	• <i>Streptococcus pyogènes</i>	



**Figure 26 : les différents microorganismes utilisés.**

### 3.2 - Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques :

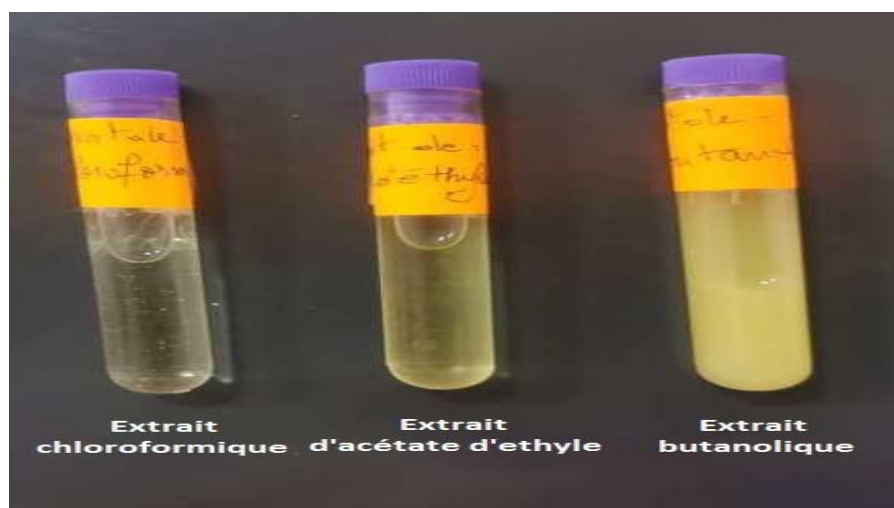
La méthode de diffusion à partir d'un disque a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne (Collin et al, 1970).

#### 3.2.1 - Préparations des extraits :

On s'est intéressé à l'activité antimicrobienne de deux extraits : phase acétate d'éthyle et phase butanol. Nous avons choisi ces deux extraits parce que la pharmacopée allemande indique que la silymarine se trouve dans ces deux phases.

Les phases sont évaporées à sec au Rotavapor et reprises dans 5 ml de méthanol, pour chaque nouvel extrait on a fait quatre dilutions, ce qui donne Cinq concentrations (**Annexe01**):

$$C_{\text{Initiale}}, C_{I/2}, C_{I/4}, C_{I/8}, C_{I/16}$$



**Figure 27 : Les trois différents extraits.**

#### 3.2.2 - Préparation des disques (patches) :

Des disques de papier Whatman n°1 de (5 mm) de diamètre sont stérilisés dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée puis séchés à l'étuve pendant 20 min à 120°C. Ces disques sont ensuite imbibés de 20µl d'extrait à tester (n-butanol, acétate d'éthyle) pendant 15 à 30 min avant utilisation.

### 3.2.3 - Préparation de l'inoculum :

Les souches sont ensemencées dans des bouillons nutritifs et incubées à 37°C pendant 18 à 24 h, pour optimiser leur croissance (**Annexe 03**).

A partir d'une culture sur BN, une suspension bactérienne en solution est préparée et bien homogénéisée, et son opacité ajustée sur 0,5 de turbidité de Mc Ferland ou a une DO de 0.08 a 0.10 a 600 nm.



**Figure 28 : l'étape de l'ensemencement dans BN.**

### 3.2.4 - Méthode de diffusion en milieu solide : (méthode des disques)

Préparer et marquer 30 boîtes de pétri, deux boîtes pour le test Antibiogramme (test positif), et trois boîtes pour la mise en évidence l'activité antimicrobienne de chaque souches.

Couler la gélose de Mueller-Hinton stérile dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre jusqu'à une épaisseur de 4 mm puis laisser refroidir (**Annexe02**).

#### 3.2.4.1 – Ensemencement :

À l'aide d'un coton-tige stérile réaliser un ensemencement par écouvillonnage en tournant la boîte d'environ 60°. Cinq boîtes sont utilisées pour chaque souche bactérienne (deux boîtes pour l'antibiogramme qui est le témoin positif, et 3 boîtes pour chaque extrait).

La dernière étape consiste à déposer à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose de trois boîtesensemencées par la souche à tester des disques imbibés de 20 µl d'extrait (n-butanol, chloroforme, acétate d'éthyle) et des disques spécifiques d'un type d'antibiotique à la surface de la gélose de deux boîtes (deux boîtes pour chaque souche)ensemencés par notre souche d'intérêt.



**Figure 29 : L'ensemencement par écouvillonnage.**

Les antibiotiques utilisés sont :

Antibiotique	Abréviation
Cefotaxine	CTX
Polumixine	PL
Tetracycline	TE
Caloramphicol	C
Spiramycine	SP
Amoxicilline	AMC
Cefalexine	CN
Penicillin	P
Chloramphicol	CLO

**Tableau 6 : Les différents antibiotiques utilisés.**



**Figure 30 : L'antibiogramme**

#### **3.2.4.2 – Dépôt et incubation :**

Les disques sont ensuite pressés afin de s'assurer de leur application. Chaque boîte contient au maximum 6 disques. Le méthanol est utilisé comme témoin négatif.

L'incubation dure de 18 à 24h. Durant cette période, les substances diffusent dans la gélose à partir des disques selon un gradient de concentration jusqu'à une limite où sa concentration est la plus faible (de 100 % jusqu'à 6.12 %), déterminant ainsi des zones d'inhibition.

#### **3.2.4.3 – Lecture :**

Après incubation, le diamètre d'inhibition autour des disques est mesuré à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée, et les valeurs sont exprimées en mm.

### **3.3 - Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB) :**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide.

La CMI est la plus faible concentration d'extrait butanolique à laquelle le microorganisme testé ne montre aucune croissance visible à l'œil nu.

La technique consiste à distribuer 100  $\mu$ l de méthanol dans la série des tubes de la microplaque auxquels 50  $\mu$ l de différentes dilutions (C1/2, C1/4, C1/ 8, C1/ 16) d'extrait butanolique a été ajouté dans chaque tube, à l'exception du douzième tube qui servira de témoin positif.

Ensuite, 50 $\mu$ l du mélange prélevé a été versé au 50 $\mu$ l de bouillon nutritif et 50 $\mu$ l de suspension microbienne. La microplaque a été incubée 18 à 24 h à 37°C.

La croissance bactérienne est indiquée par la turbidité ; le résultat est positif lorsqu'il n'y a pas de trouble dans les tubes. Le tube où il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice (**Kamagate et al. 2001**).



**Figure 31 : La préparation des dilutions.**

#### **3.4- Détermination de l'activité antioxydante (DPPH) :**

Le radical DPPH très stable est largement utilisé pour la détermination directe et rapide de l'effet antioxydant des composés phénoliques (**Shahidi, 1997 ; Hüseyin et al., 2011**)

### 3.4.1- Mode opératoire :

Le protocole expérimental suivi est celui de **(Benhamou et al.2013)**.

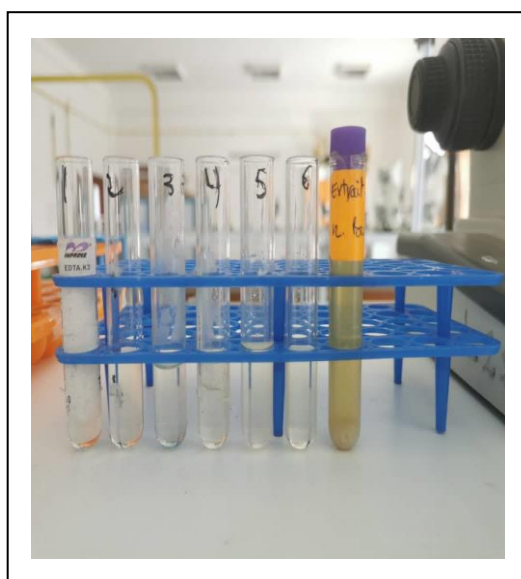
05 concentrations pour chaque extrait ont été préparées en diminuant ces concentrations chaque fois par la moitié.

Un volume de 50  $\mu$ l de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté a 1,950  $\mu$ l de la solution méthanolique du DPPH (0.0025 g/l) fraîchement préparée.

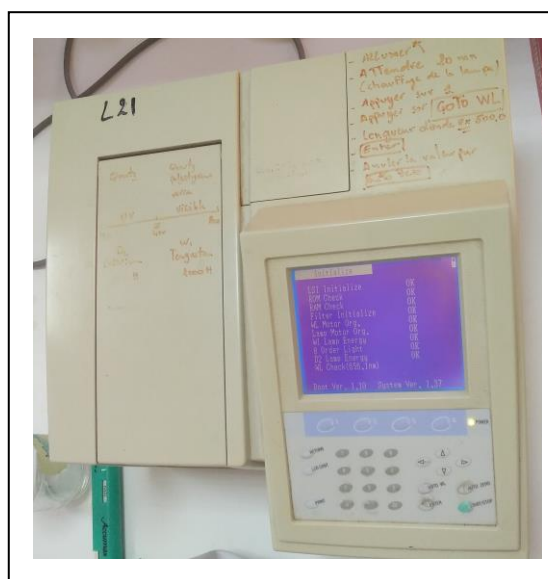
Le contrôle négatif été préparé en parallèle en mélangeant 50  $\mu$ l du méthanol avec 1950  $\mu$ l d'une solution méthanolique a la même concentration utilisée. Après incubation a l'obscurité 30 min a la température ambiante.

L'absorbance est mesurée à 517 nm. L'antioxydant de synthèse utilisé est l'acide ascorbique (le contrôle positif).

L'étude de la variation de l'activité anti radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC50). Une faible valeur de CI50 correspondant à une grande efficacité de l'extrait **(Chaouch, 2014)**.



**Figure 33 : préparation des dilutions pour le DPPH..**



**Figure 32 : Spectrophotomètre utiliser pour la lecture.**

## *Chapitre V Résultats et interprétations*

### 1. Rendement :

Les extraits ethanologiques récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les flavonoïdes, le rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal (graines de *Silybum marianum*) ; rendu en poudre ; subissant une extraction douce à température ambiante, les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 2.

On définit le rendement en extrait d'acétate d'éthyle, n-butanol et chloroforme comme étant le rapport entre la masse de l'extrait en gramme (ME) et la masse de matière végétale en gramme (MMV). Il est exprimé en pourcentage (%) et donné par la formule suivant :

$$R = \frac{m}{m_0} \times 100$$

OU :

R : rendement en E(%).

M : masse de l'E (gr).

M<sub>0</sub> : masse de matériel végétal (gr).

Donc le rendement est de :

$$R = \frac{10,85}{100} \times 100 = 10,85 \%$$

**Tableau 7 : Les rendements massiques de l'extraction.**

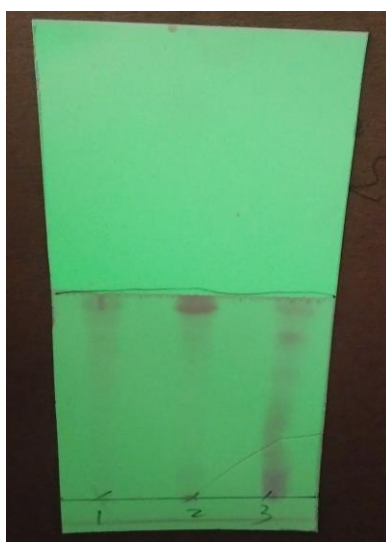
Extraits	Extrait brut	Phase n-butanol	Phase acétate d'éthyle	Phase Chloroforme
Rendements	10,85 g	0,467 g	0,285 g	0,136 g

Les résultats obtenus montrent que l'extrait brut représente une valeur de (10.85 %). L'extrait n-butanol représente un rendement de (0.467%), suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (0.285%). Cependant l'extrait chloroforme montre la plus faible valeur de l'ordre de (0.136%).

Nous avons remarqué que le rendement diminue d'une phase à une autre. Cette diminution est due à la rétention des molécules qui ont une plus forte affinité pour la phase. Chaque phase va récupérer des groupes de molécules de polarité croissante.

## 2. Profil flavonoïques sur CCM :

Pour la CCM, le: chloroforme/acétone/acide formique (75/16.5/8.5) c'est le système de solvant qui a été choisi, et qui a donné la meilleure migration des spots (séparation visible). La plaque de la chromatographie a montré trois taches, dans chacune des phases (chloroforme, acétate, butanol), de couleur jaune à la lumière visible (Fig. n°32). Elles ont des Rf différents : 0.51-0.33-0.44, elles apparaissent sous UV d'une coloration violette.



**Figure 32 : Résultats de la chromatographie sur couche mince.**

**Tableau 8 : Résultats de la CCM dans le système chloroforme/ acétone / acide formique.**

Détection	extrait	Rf	couleur
UV à 254 nm	Phase acétate	0,51	Violette
	Phase chloroforme	0,33	Violette
	Phase butanol	0,44	Violette

On observe trois spots indiquant la séparation d'au moins une seule molécule différente dans chaque phase. Les rapports frontaux donnent des différentes valeurs pour les 3 phases, soit 0,51 cm pour la première tache, 0,33cm pour la deuxième et 5.5 cm pour la troisième. Ces résultats indiquent que les 3 extraits contiennent des molécules ayant des propriétés différentes (polarité et masse moléculaire); l'intensité des tâches correspond à des concentrations différentes.

### 3. Partie microbiologie

#### 3.1 - Détermination de l'activité antimicrobienne :

##### 3.1.1 - Diffusion des disques en milieu solide :

La méthode de diffusion solide ou méthode de disque a pour but d'étudier l'activité antimicrobienne des substances naturelles. Elle a permis d'obtenir les résultats mentionnés dans les tableaux 4 et 5 et figures 7, 8 et 9. Ces résultats montrent une activité antimicrobienne de la phase acétate d'éthyle et de la phase butanol, pour les souches de *Escherichia. Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Entérocoque faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogènes*.

**Tableau 9 : Résultats de la technique de diffusion en milieu solide.**

concentration en extrait n-butanol en mg/ml Diamètre d'inhibition en mm					
Souches	Phase n-butanol				Méthanol
	93,42mg/ml	46,71mg/ml	23,35mg/ml	11,76mg/ml	90%
<i>Escherichia. coli</i>	4	4	3	0	0
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	12	10	6	4	0
<i>Entérocoque faecalis</i>	7	4	1	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	3	2	1	0
<i>Streptococcus pyogènes</i>	15	8	6	2	0

À partir du **tableau n 9** on peut remarquer que le pouvoir antimicrobien le plus élevé de l'extrait de la phase butanol est observé chez *Pseudomonas Aeruginosa* et *Streptococcus pyogènes* avec des zones d'inhibition qui étaient de 12 mm et 15 mm respectivement.

*Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité modeste vers l'extrait de butanol avec un diamètre d'inhibition est était de 9 mm, d'autre part *E. coli* est clairement résistante vers les substances végétales de cette phase.

**Tableau 10 : Diamètre de zone d'inhibition pour la phase acétate.**

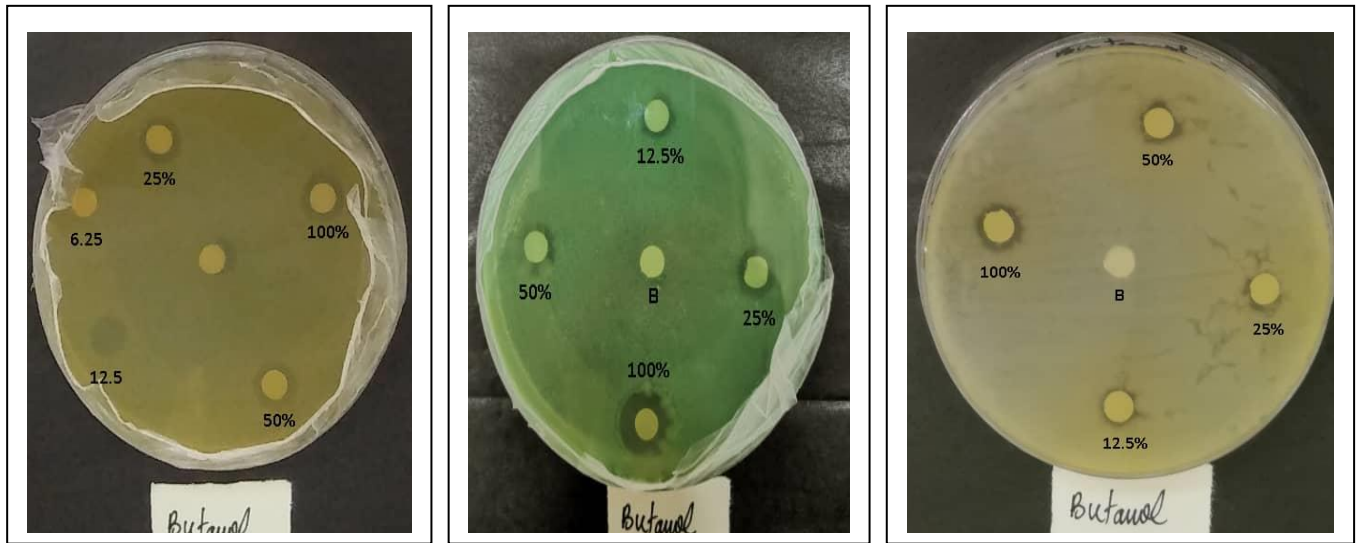
concentration en extrait acétate d'éthyle en mg/ml Diamètre de zone d'inhibition en mm					
Souches	Phase acétate				Méthanol
	57mg/ml	28.5mg/ml	14.25mg/ml	7,125mg/ml	90%
<i>Escherichia. coli</i>	4	4	2	0	0
<i>Pseudomonas</i>	8	7	3	0	0
<i>Entérocoque faecalis</i>	5	4	1	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	3	1	0	0
<i>Streptococcus pyogènes</i>	3	2	0	0	0

À partir de tableau n 10 les souches bactériennes n'ont montré aucune sensibilité vers l'extrait d'acétate d'éthyle avec des zones d'inhibition assez faibles en accord avec l'étude de (kechkar.2008), exception faite pour *Staphylococcus aureus* qui était de 12 mm pour une concentration de 76mg/ml dans cette étude avec nos résultats qui était de 5mm pour une concentration de 93.42mg/ml.

**Tableau 11 : Diamètre de zone d'inhibition pour la phase chloroforme.**

concentration en extrait chloroforme en mg/ml. Diamètre d'inhibition en mm.					
Souches	Phase chloroforme				Méthanol
	27,2 mg/ml	13,6 mg/ml	6,8mg/ml	3,4mg/ml	90%
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	0
<i>Entérocoque faecalis</i>	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus bêta hémolytique type A</i>	0	0	0	0	0

Exception faites pour l'extrait chloroforme, où les résultats n'ont abouti à aucun résultat positif ceci et peut être dû à la qualité du solvant d'extraction.



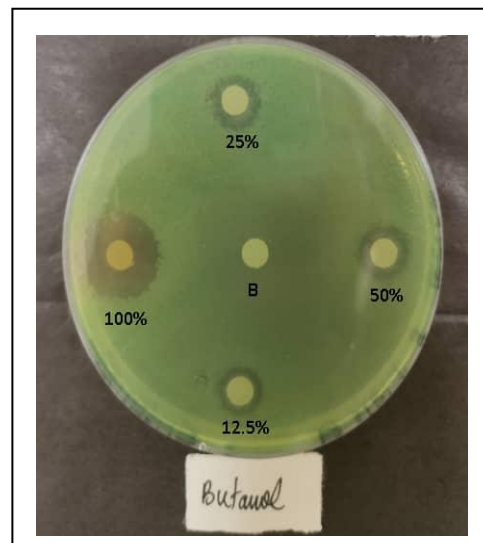
*Escherichia coli.*

*Pseudomonas aeruginosa.*

*Entérocooccus faecalis*



*Staphylococcus aureus*



*Streptococcus pyogènes*

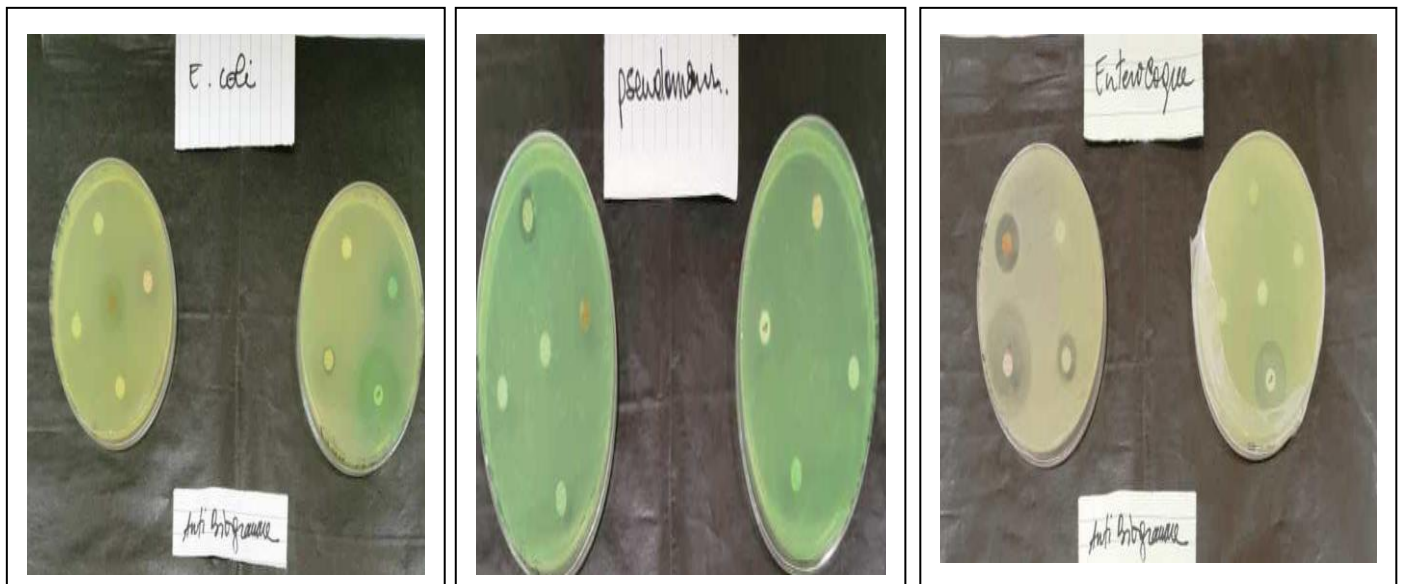
Figure 34 : Résultats de la technique de diffusion en milieu solide en phase de n-butanol.

## 3.1.2- Antibiogramme :

Tableau 12 : Résultats de la technique de diffusion en milieu solide.

Souche	La charge des discs d'ATB.	Escherichia coli	Pseudomonas Aeruginosa	Entérocoque	Staphylococcus aureus	Streptococcus pyogènes
Céfotaxime (CTX)	30µg	0	0	0	0	0
Polymyxine (PL)	abs	7	12	0	6	11
Tétracycline (TE)	10 µg	13	10	16	15	15
Chloramphenicol (C)	30µg	10	10	12	6	11
Spiramycine (SP)	100µg	6	30	30	25	0
Amoxicilline	20/10µg	0	0	0	0	0
Chloramphenicol	10µg	20	30	22	26	26
Cephalexin (CN)	30µg	0	0	0	0	0
Penicilline (P)	6µg	0	0	0	0	0

Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau n° 12**. Ils montrent des zones d'inhibitions les plus élevées de 30 mm pour *Pseudomonas aerogenosa* avec la Spiromycine et Chloramphenicol. Alors que pour *Staphylococcus aureus* ; elles ont un diamètre de 26 mm avec la Chloramphenicol, 25 mm avec la Spiramycine. Des zones d'inhibition de 30 mm avec Spiramycine et 22 mm avec Chloramphenicol pour *Entérocoque* . Une zone d'inhibition de 26 mm avec chloramphénicol pour *streptococcus pyogènes*.



Escherichia coli.

Pseudomonas aeruginosa.

Entérocooccus faecalis



Staphylococcus aureus



Streptococcus pyogènes.

**Figure 35 : Résultats de l'antibiogramme.**

3.2 – Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Tableau 13 : Résultats de la CMI Phase n-butanol.

Souches	Phase n-butanol					Méthanol
	93.42mg/ml	46.71mg/ml	23.35mg/ml	11.67mg/ml	5.83mg/ml	90%
<i>E. coli</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Entérocoque</i>	---	---	+++	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	---	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Streptococcus pyogènes</i>	---	+++	+++	+++	+++	+++

+ : trouble (croissance).

- : absence de croissance (inhibition).

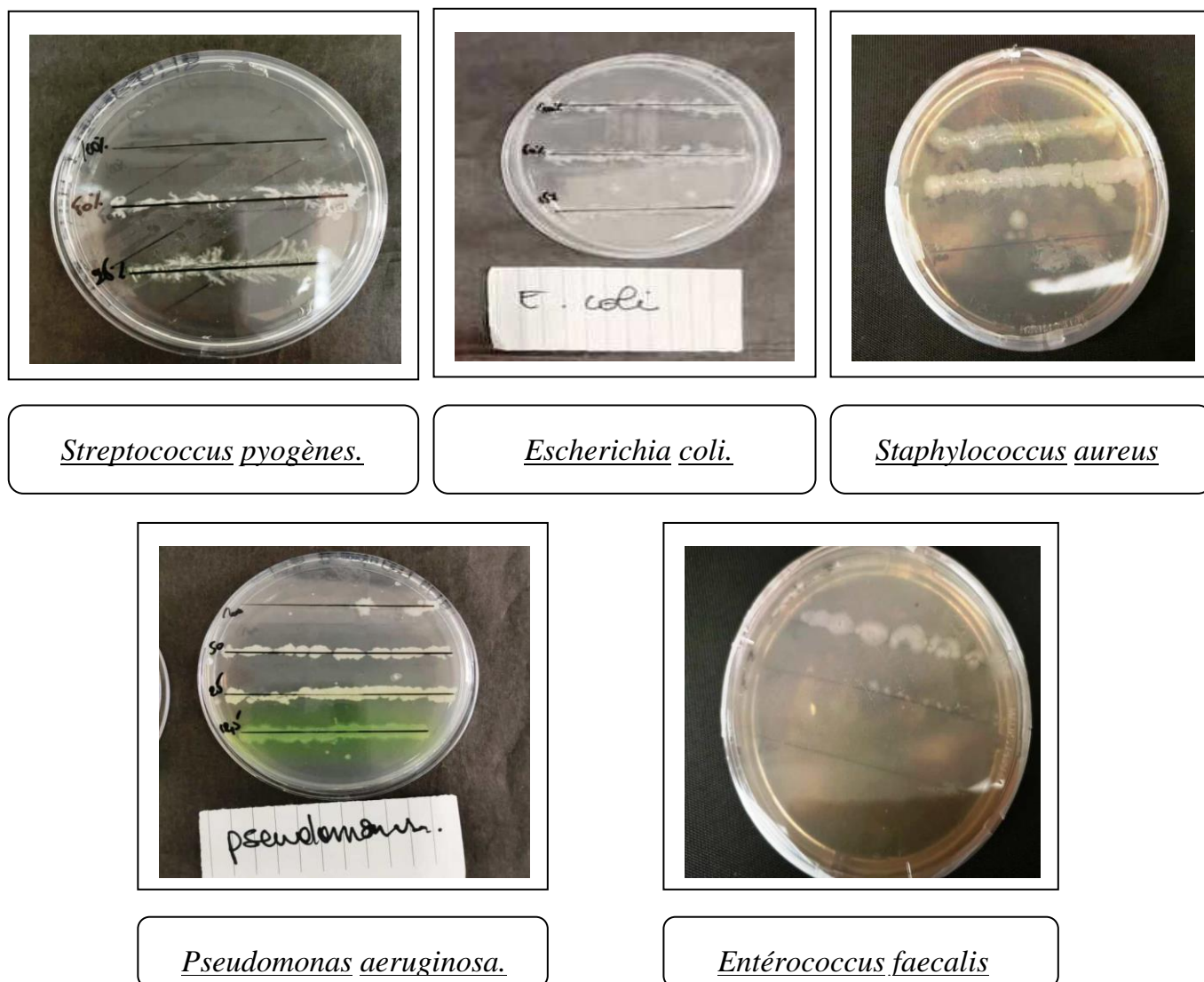


Figure 36 : résultats de détermination de la concentration minimale bactéricide en extrait de n-butanol.

Étude de la CMI et de la CMB d'extrait brut butanol de *Silybum marianum* fait l'objet d'une étude pour l'évaluation de l'activité antibactérienne par le biais de la méthode des dilutions sur milieu liquide sur une microplaque La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration de l'extrait qui ne montre pas de culture visible. Pour les souches bactériennes qui sont montrées les plus sensibles par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, des valeurs de CMI ont été déterminées puis rapportées dans un tableau (**Annexe04**).

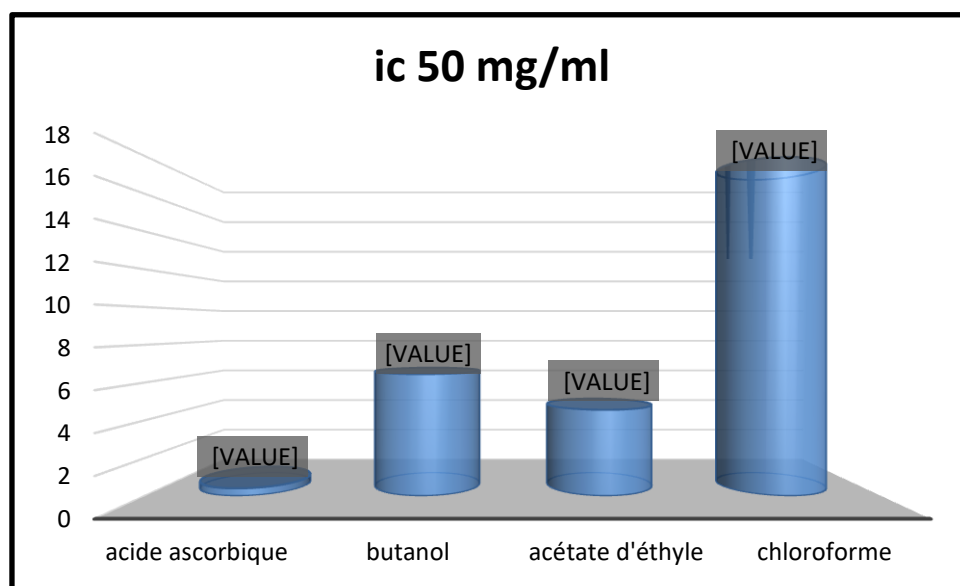
- Pour *Escherichia coli* (Gram-), la souche est totalement résistante vis-à-vis l'extrait, le CMI et le CMB n'ont pas déterminés.
- Pour *Staphylococcus aureus* (Gram+), la concentration minimale inhibitrice de l'extrait butanol est de 23.35mg/ml ce qui est comparable avec les travaux de (**BENCHAACHOUA.2019**) pour l'extrait hydro-ethanoliques de fleurs et l'extrait hydro-acétonique par décoction. Le CMB est de 93.42 mg/ml.
- La CMI pour *Streptococcus pyogènes* (Gram+), est à partir d'une concentration de 23.3mg/ml.
- Pour *pseudomonas Aeruginosa* le CMI est de 23.35mg/ml mais le CMB n'est pas clairement déterminée ce qui nécessite des concentrations plus élevées d'extrait.
- pour *Entérocooccus faecalis* le CMI est de 23.35mg/ml est le CMB est de 46.71mg/ml.

L'extrait butanol a exercé un effet bactériostatique vis-à-vis *Streptococcus pyogènes* et *Staphylococcus aureus* et un effet bactéricide contre *Entérocooccus faecalis*

Les résultats de CMI ont montré des valeurs relativement élevé (23.35 jusqu'à 46.35 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 l'extrait butanolique obtenu à partir de *Silybum marianum* possède un effet intéressant par rapport aux souches bactériennes testées. Des études complémentaires sont nécessaires pour l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans cet extrait en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

## 3.3 – DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) :



**Figure 37 : Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50% de DPPH des différents extraits en mg/ml.**

La différence dans l'activité anti-radicalaire au DPPH entre les extraits analysés est probablement due à leur composition en différents composés phénoliques. La réduction du DPPH n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais à l'interaction entre plusieurs composés, ces interactions peuvent exister dans un extrait pas dans un autre, conduisant ainsi à cette différence d'activité entre les extraits.

Selon nos résultats, l'extrait d'acétate éthyle et butanol ont donné une valeur de IC<sub>50</sub> de 4.56 mg/ml et 6.45mg/ml respectivement qui est peut-être dû à la présence d'une forte teneur en composés phénoliques contrairement à l'extrait chloroformique qui a montré une activité antioxydant assez faible d'un IC<sub>50</sub> correspondre à 17.94mg/ml, nous remarquons clairement le fort pouvoir antioxydant de contrôle positif utilisé qui est de l'ordre de 0.42mg/ml.

Il existe une Corrélation entre la capacité antioxydant 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 antioxydant, nous ne pouvons pas savoir quels sont les composants responsables de la capacité antioxydant observée sans procéder par des études analytiques plus approfondies (BENCHAACHOUA, 2019).

## *Conclusion générale et perspective*

Les plantes médicinales élaborent une vaste gamme de substances chimiques actives, des métabolites secondaires qui peuvent être une source de préoccupation majeure des substances actives connus pour leurs propriétés thérapeutiques. Leur utilisation est en croissance constante, étant donné la toxicité et les effets secondaires non souhaitables des molécules de synthèse. Ainsi, l'exigence établie 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.

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne de *Silybum marianum*, une plante omniprésente en pharmacopée traditionnelle pour ses qualités thérapeutiques

L'extraction de flavonoïdes de *Silybum marianum* est effectuée par un fractionnement de type liquide-liquide par divers solvants de polarité différentes (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol) a permis d'évaluer les rendements massiques de chaque phase. Les masses des extraits passent de 10.85g dans l'extrait brut à 0.136; 0,285; 0,467g dans l'extrait de chloroforme, acétate d'éthyle, butanol, successivement..

La séparation des composés actifs est réalisée par CCM utilisant le gel de silice. Les résultats ont montré l'apparition de trois taches différentes dans chaque phase migrant avec des rapports frontaux de 0,33; 0,44 ; 0,51 cm. Ces RF pouvant être assimilés à la silymarine (principe actif majeur de *Silybum marianum*).

Le choix des phases à haut potentiel antimicrobien est réalisé par la méthode de diffusion sur milieu solide (Gélose Mueller-Hinton), Les résultats sont intéressants, ils ont montré que l'extrait butanolique est le plus actif vis-à-vis des germes sensibles (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Entérocooccus*, *E. Coli*, *pseudomonas*), Un deuxième criblage de l'activité antimicrobienne utilisant l'extrait est effectué par la méthode des disques. Les résultats ont montré une action significative sur les bactéries gram positif

La détermination des CMI et CMB est réalisée par la méthode de dilution en milieu solide et liquide, Les résultats des CMI vont de 23.35mg/ml pour l'extrait de butanol, l'activité contre les souches appartenant au Gram (-) reste à évaluer.

Le rapport CMB/ CMI est égal à 4 pour l'extrait butanolique avec les deux souches *Streptococcus pyogènes* et *Staphylococcus aureus* (action bactériostatique), et de 2 pour *Entérocooccus faecalis* (action bactéricide).

La plus forte activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical DPPH• libre avec une valeur de IC50 intéressante pour l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanol, 4.56mg/ml et

6.45mg/ml respectivement, contrairement à une activité modeste d'extrait chloroformique d'un IC50 de 17.94mg/ml.

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.

La réalisation d'une étude toxicologique serait une étape substantielle afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux comprendre les sites d'action des substances actives.

Sachant que l'Algérie possède une immense biodiversité qui ne demande qu'à être étudiée, les sujets dans ce domaine ne manquent donc pas, car chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phyto-chimiques et pharmacologiques particulière.

## *Références bibliographiques*

- Adrian J. Potus J. frangne R. 1995: La science alimentaire de A à Z 2ème Edition ; (38,164-166).
- Alaoui IS.2016. Valorisation de deux plantes marocaines Melia azedarach et Silybum marianum. Thèse de doctorat. Université Mohamed V: 15p.
- Alarcon . A.C,1995, Gastroprotection induced by silymarine; the hepato- protective principle of Silybum marianum in its chemia. Role of neutrophis. Planta. Med. 6 (2):116-19.
- Amrani O,2006, Valeur nutritive du chardon marie (Silybum marianum(1) Gaerthn) "Tawra". (Magister de la faculté des sciences de L'Algérie Batna.
- Anonyme,1998, Rational phyto therapy). A physicians guide to herbal medecine. 3ème édition. Springer-Verlage. Germany. 218.
- Anonyme. 1997 : Drugs . 53.637-656.
- Asada Y.,Oshikawa T., Welli,1998, Antimicrobial flavonoids from Glycyrrhiza glabra hairy root cultures. Planta medica. 64(8): 746-747.
- Asghar 2008.Z.Masood Z. Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxy radicals in vitro. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences; 21(3):249-54.
- Baharum. 1997 : Substances naturelles actives . la flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. food and agricultural research council.
- Baud F.Philippe H. Hafedh T. Intoxications aiguës, Springer 2013: 91p.
- Belkhada J,1997, La Pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. IBIS Press. P. 202
- Beloued A,1998,Plantes médicinales d'Algérie. Ed .Office des publications. Beneston N.T., W.S,1984 ,Fleurs d'Algérie. Ed. Entreprise National de livre. Algérie .P 274.
- Beniston NT,Beniston WS,1984 ,Fleurs d'Algérie .Ed Entreprise Nationale de livre, Alger p274. N° ed. 1822/84.
- Berruex JC. La forme à votre portée, Edition Fitline séminaires, 1998,P 57.
- Bonnier,1990,Silybum marianum Gaerthn. Nom anglais: Milk thistle. Nom italien : Cardo mariano ou Santa
- Brouillet, 2002 ; AAC,2004, Flore laurentienne. 3eme éd. Boucherville: Edition Gaëtan Morin. . Quebec.

Bruneton J ,2016, Pharmacognosie-phytochimie plantes médicinales. 5ème édition. Tec& Doc Lavoisier Ed Paris : p 339-402.

Burnie, 1997 ; Vial, 1998- Encyclopédie de botanique et de l'horticulure. Plus de 10.000 plantes du monde entier. Ed. Random house Australia ptyltd. P 843

Céline C,2004,Les secrets de santé des antioxydants : plus jeune, plus longtemps avec les antioxydants. Alpen Ed France : p16-17.

Collin et Crouzet, 2011,Polyphénols et procédés : transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Tec & Doc Lavoisier 2011 : p 12, 13, 50,305- 337.

Conan M,2016. Milk Thistle Heals and Protects the Liver and Acts as Poison Antidote, Epoch Times:2 p.

Curtay JP. Robin J M ,2000, Intérêt des complexes antioxydants.

Cuvelier C. Cabaraux J-F.Dufrasne I. Hornick JL.Istasse,2004, L. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. Ann. Méd. Vét, 148, 133-140.

De Moffarts et al., 2005. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. Equine and Comparative Exercise Physiology 2004; 1: 211-220.

Decloître, 1992, Alimentation, environnement et cancer. Courrier de la Cellule Environnement de l'INRA1992 ; 17 : 45-59.

Deysson G, 1979,Organisation et classification des plantes vasculaires 2ème partie. systematique, cour de botanique générale, 4ème séries Ed CUDSEDES 540p.

Dodd J, 1989: Phenology and seed production of varbегatee thistle in Ausralia in relation to mechanical and biological control weed researcher 29, pp255-263.

El-Mallah MH. Safinaz M. El-Shami M. Hassanein M. Detailed studies on some lipids of Silybum marianum (L.) seed oil, 2003 , Grasas y Aceites. 54. Fasc4, 397-402.

Favier, 2003,Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique 2003 : 108 p.

Ferenci et al.,1989,Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. J. Hepatol. 9:105-13.

Fleuriet.A. Macheix.J.J.Sarni.M.2005.Les composés phénoliques dans la plante: Structure, Biosynthèse, Répartition et roles.In: les polyphénols en agroalimentaires. Eds, Tech & Doc, Lavoisier, Paris. 32, 150, 153-155, 160-161.

Foster S. Milk thistle: *Silybum marianum*,1990, Austin (TX): American Botanical Council.

Gabay R. Plitmann U et Danin A,1994. Facteurs affectant le dominante du *marianum* L de *silybum* dans ses habitats spécifiques Flore 189 pp 201-206.

Groves et Kaye 1989, Sindel, 1991, Germination and Phenology of Seven Introduced Thistle Species in Southern Australia. Aust. J. Bot. 1989. 37(1): 351-359.

Guenguen L. Ingestion et absorption des éléments minéraux majeurs:nutrition des ruminants domestiques ; ingestion et digestion. (1995). Ed. INRA, 721-758.

Guignard 1979, et al...La systématique du chardon Marie selon Deysson .

Guittonneau et Huon A, 1983. Connaître et reconnaître la flore et la végétation méditerranéenne.Ed.Ouest France, p331.

Haddad , Y2008, Interventions thérapeutiques prometteuses dans un modèle in vivo de stéatosehépatite non alcoolique. Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maîtrise des sciences (M. Sc.) en Pharmacologie. Université de Montréal : 124p.

Hadi M,2004, La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse en Pharmacochimie.

Hadolin M, 2004,Hras AR., Davorin B., Knez Z. Isolation and concentration of natural antioxidants with high-pressure extraction. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 5 (2) 245-248.

Halliwell et al., 1987 ; Marvin, 2002- The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. Analytical Biochemistry.

Heller R.Esmault R. Lance C,1998, Physiologie Végétale. 6eme édition. Dunod, Paris. p:290.

Heratchian 2007A. Le chardon-marie protecteur hépatique. *Naturo* ; 43 : 18-20.

Hertog et al., 1995 , Kromhout., Aravanis et al..Apport en flavonoides et risque à long terme de coronaropathie et le cancer, étude dans sept pays. Arch. Intern. Med .

Jauzien, P, 1995, Flore des champs cultivés. Ed. INRA,p244-245.

Julve, 1998 , Base flore.Indexe botanique. Ecologique et chronologique de la flore de France.

Karkanis A, Dimitrios B, 2011, Efthimiadou A. Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crops and Products*, Volume 34, Issue 1, 825–830.

Le Cren F, 2004, *Les antioxydants : la révolution du XXI<sup>e</sup> siècle*. Quebecor : p 35.

Leopoldini M, Russo N, Toscano M, 2011, The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* ; 125(2) : 288-306.

Manthey J M, 2000, Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*, 7, 28-34. Modaresi-Chahardehi A., D. Ibrahim, S. Farisa.

Sulaiman, et L. Mousavi, 2012. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Revista de biología tropical*, 60 (4), 1567-76.

Marcel RB. Coxam V. Delzenne N, 2008, *Aliments fonctionnels*. Tec & Doc Lavoisier Ed Paris : p 212.

Martini M.C, 2006, *Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie*. P 331. Mazza. 2000, Programme de recherches alimentaires, Agriculture et agroalimentaire Canada. Numéro spécial du *Journal of food. Science and Agriculture*. 80 (7).

Marvin E , 2002, *Les secrets de santé du thé : un peu de thé tous les jours éloigne le médecin pour toujours*. Alpen Ed Monaco : 19p.

Meschy F. Guenguen L , 1995, *Ingestion et absorption des éléments minéraux majeurs: nutrition des ruminants domestiques ; ingestion et digestion*. Ed. INRA, 721-758.

Mette M. Berger , 2006, *Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances*. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 48–53.

Michael, 2003, Julve, 1998, First report of *Silybum marianum* as a host of *Puccinia punctiformis*. *Plant Disease*. 86:1271.

Milpied-Homsi B , 2004, *Pathologie allergique de la muqueuse buccale*. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. 44 .76.78.

Mira B, Blasco M, Subirats S, 1996, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oils from orange peel *Journal of Supercritical Fluids* 9, 238-243.

Mohammed Z. ATIK F, 2013, Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *tamarix aphylla* (L.) karst. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* ; 2 :609-615.

Morazzoni P and Bombardelli E, 1995, *Silybum marianum* .*Fitoterapia*, 66(1) : p3-49.

---

Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, Pifferi G, 1993, Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *The European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*;18: 289-97.

Mouzali L, 2016, Le chardon-marie (*Silybum marianum*) : une plante aux multiples vertus. Société Algérienne De Nutrition et de Médecine Ortho Moléculaire ; p132.

Neger, 1961, *Silybum marianum* : another host for *Puccinia punctiformis*, 221.

Nutra news ,2003, Information et actualité santé, nutrition, prévention du vieillissement – htm.

Papazian L, Antoine R, 2008. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, Springer Paris : p156.

Perry J, Staley J, Lory S et al..., 2002, *Microbiologie. Cours et question de révision*. Dunod: 159-160.

Pichersky E, Gang R, 2000 : *TIRS* ,VOL.5,439-445.

Pietà, 2000, Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7): 1035- 1042.

Pokorny et al., 2001 ; Le Cren, 2004, Preparation of natural antioxidant, in *Antioxidants in Food: Practical Applications*, 1st ed, Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England , p311-330.

Puppo A, 1992 Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type reactions, Influence of the Iron Chelator, *Phytochemistry*, 31(1):85-88.

Ramos.M, Santos.E.P. Bizarri.C.H.B, Mattos.H.A, Padilha.M.R.S. Durate,H, 1996.

Preliminary studies toward utilization of various plant extracts as antisolar agents. *International journal of cosmetic science*.18: 87-101.

Ravi shankar D, Rajora AK. Greco F, Osborn HM , 2013, Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (12): 2821-2831.

Rice et al., 1996, les composés phénoliques des végétaux. press polytechniques et universitaires, Romandes.160.

Rice-Evans, 1996, CA. Miller NJ. Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* , 20(7) : 933- 956.

- Rodzko V, 1999-2000, Abécédaire de phytothérapie.
- Brown D, 1993, Silymarin education monograph. Herbal Res Update. 23-36 Bruneton. Sources alimentaires des flavonoides. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3<sup>ème</sup> édition). Editions Tec and Doc Lavoisier, 1120.
- Saller R, 1995, Phytotherapie. Haug, Heidelberg, 267-274
- Salvador & Chisvert, 2011. Analysis of Cosmetic Products. Elsevier London Ed 2011: 217p.
- Sindel, BM, 1991, a review of the ecology and control of thistles in australis. Weed search vol31, p189-201.
- Spichiger. Re. Savolainen V et Figeat M, 2000: botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales, 1<sup>ère</sup> Ed. Ed presses polytechnique et universitaires romande 372p.
- Stevens JF Miranda C L, 1998, and Buhler DR Deinzer ML.,: chemistry and biology of hop flavonoids, 1204p.
- Svobodova A, 2006, Walterova D. Psotova J. Influence of silymarin and its flavonolignans on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts, Burns 32, 973–979.
- Teixeira de Silva, 2004, Mining the essential oil of the Anthemideae, African journal of biotechnology 3(12), 706-720.
- Valenzuela AB, 1996, Nieto SK. Synthetic and natural antioxydants: food quality protectors. Grasas y Aceites 47(3): 186-196.
- Vincent, 2000. Abécédaire de phytothérapie.
- Vogel G. Silymarin, 1968, antihepatotoxic principle form *Silybum marianum* L. as antagonist of the effect of phalloidine. *Arzneim. Forsch.* 18:1063-1064.
- Voyer M, 1998, Magny JF. Prématurité : le préterme. Elsevier Ed Paris : 31p.
- Wiersema et léon, 1999, USDA, 2007, world economic plants : A standard reference. Boca raton (FL), CRC press. LLC.

# *Annexes*

**Annexe 01 : Préparation des différentes concentrations des extraits :****L'extrait acétate d'éthyle :**

Les concentrations : 57-28,5-14,25 et 7,125 mg/ml sont obtenus comme suit:

Le ballon vide 286.22g  $\Longrightarrow$  ballon + phase acétate = 286,50g  $\Longrightarrow$  phase acétate 0.285g (285mg).

- Nous avons dilué dans 5 ml de méthanol :

285 mg  $\longrightarrow$  5ml de méthanol  
 X mg  $\longrightarrow$  1ml  $\Longrightarrow$  la concentration d'acétate dans  
 1 ml est 57 mg.

Puis nous avons fait des dilutions à base de deux et nous avons obtenu : 57 mg/ml - 28,5mg/ml - 14,25mg/ml - 7,125mg/ml.

**L'extrait butanol :**

Les concentrations 93,42-46,71-23,35 et 11,67 mg/ml sont obtenus comme suit:

Le ballon vide 286.22 g  $\Longrightarrow$  ballon + phase butanol = 286.68 g  $\Longrightarrow$  phases butanol 0.4671 g (467,1mg).

- Nous avons dilué dans 5 ml de méthanol :

467,1mg  $\longrightarrow$  5ml de méthanol.  
 X mg  $\longrightarrow$  1ml.  $\Longrightarrow$  La concentration du butanol dans 1 ml est 93.42 mg.

Puis nous avons fait des dilutions à base de deux et nous avons obtenu : 96,42mg/ml, 46,71 mg/ml - 13,35mg/ml - 11,67 mg/ml.

**L'extrait chloroforme.**

Les concentrations 27,2-13,6 - 6,8 et 3,4 mg/ml sont obtenu comme suit:

Le ballon vide 286.22 g  $\Longrightarrow$  ballon + phase chloroforme = 286.35 g  $\Longrightarrow$  phases chloroforme 0.136 g (136mg).

- Nous avons dilué dans 5 ml de méthanol :

136mg  $\longrightarrow$  5ml de méthanol  
 X mg  $\longrightarrow$  1ml  $\Longrightarrow$  La concentration du chloroforme dans 1 ml est 27,5 mg.

Puis nous avons fait des dilutions à base de deux et nous avons obtenu : 27,2mg/ml - 13,6 mg/ml - 6,8 mg/ml - 3,4 mg/ml.

**Annexe 02** : composition des milieux de culture utilisée pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne :

Mueller-Hinton (milieu solide) :

- Agar.....10g.
- Extrait de viande.....02g.
- Hydrolysate acide de caséine..... 17,5g.
- Amidon..... 1,5g.
- Eau distillée.....1000ml.

PH 7,4.

**Annexe 03 :** Composition des bouillants nutritifs utilisés pour la culture des microorganismes à tester :

Bouillant nutritif pour les bactéries :

- Extrait de viande..... 5g.
- Peptone.....10g.
- Na cl.....5g.
- Eau distillée.....1000ml.

Ph 7,35.

Stérilisation à 110°C pendant 20mn.

**Annexe 04 :** Résultats Du rapport CMB/CMI Phase n-butanol.

Concentration Souche	Extrait butanolique			
	CMI Mg/ml	CMB Mg/ml	Rapport CMB/CMI	Commentaire Déterminée / Indéterminée
<i>E. coli</i>	36,25	/	/	Indéterminée
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	46,35	/	/	Indéterminée
<i>Entérocoque</i>	23,35	46,71	2	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	23,35	93,42	4	Bactériostatique
<i>Streptococcus pyogènes</i>	23,34	93,42	4	Bactériostatique

