

REMERCIEMENTS

Nous remercions Dieu Tout puissant, Seigneur des cieux et de la terre, qui nous a permis de faire ce travail.

Tout d'abord, nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à Mme KASSA LAOUAR M, et Mr KASHI I, qui nous ont fait l'honneur de réaliser ce travail sous leur direction, pour leurs précieux conseils avisés.

Nous remercions également Mr NOUADRI pour l'honneur qui nous fait en daignant de présider le jury.

Nous remercions Mr BENSOUICI C pour ses efforts et d'avoir accepté l'examen de notre mémoire.

Enfin nos remerciements s'adressent aux enseignants de l'université Frères Mentouri 1, Constantine.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents papa **KAMEL** et Maman **NADIA** Pour leur amour, leur gentillesse, leur soutien qu'ils m'ont toujours apporté et la confiance dont ils m'ont toujours témoignée. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, de m'avoir donné les moyens pour réaliser mes projets et d'avoir éclairé mon chemin vers la réussite, que dieu vous protège Je vous aime.

A mes sœurs et mes âmes sœurs **AMINA** et **YASMINE** Pour leur gentillesse sans égal, leur soutien, leur dévouement et leur nombreux coups de main lors de mes déboires pendant ces années.

A mes neveux **KOSSAI** et **YOUNES** Je vous adore. A ma nièce et petite princesse **SALSABIL** ainsi qu'à mon frère **MOHAMED**, pour l'énergie positive que vous me donnez .

A mon binôme et mon amie **Lanani Ramla** qui a partagée avec moi les moments difficiles et toute sa famille .

BOUSBAA RACHA .

Dédicace

Je dédie ce travail à Ma famille **LANANI** et ma deuxième famille **BOUDAH** et aux personnes les plus chères au monde mes chers parents ;

A ma très chère mère **ILHEM BOUDAH** ; Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père **AMAR** ; Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices qui tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Je dédie spécial ma frangine **OUMEIMA** et mes frères **MOUSSA** et **HOSMAN** Pour leur amour, leur gentillesse, leur soutien, et leur encouragement tout au long de ma vie.

Et je remercie ma tante **MOUNIA** pour m'avoir aidé tout au long de ce travail.

A mes proches amis **MAISSA** et ma cousine **KHAOULA** et sur tout **CHOUCHOU**.

A mon binôme et mon ami **RACHA BOUSBAA** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille.

LANANI RAMLA.

Liste des abréviations

(Al(NO₃)₃, 9H₂O): nitrate d'aluminium
(C₂H₆O) : Éthanol
(C₄H₁₀O) : Butanol
(C₄H₈O₂) : Acétate d'éthyle
(CH₃COOK): Potassium Acétate
(CH₃OH): Méthanol
(Cu Cl₂, 2H₂O): Acétate d'ammonium
(Na₂CO₃) : Carbonate de sodium
¹O₂ : L'oxygène singulet
ABTS : (Azino-bis (3 éthylbenzothiazoline -6-sulfonique Acide)
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALAT : Alanine aminotransférase
BHA : Butylhydroxyanisole
BHT : Butylhydroxytoluène
CDDP: Cataloging Distribution Data Processing
CUPRAC: Cupric reducing antioxidant capacity
DAB9: Pharmacopé Allemande
DMBA : Le diméthyl-7.12-ben(a) anthracène
DPPH: (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)
EAE : l'extrait acétate d'éthyle
EB : l'extrait butanolique
ED : l'extrait dichlorométhane
EE : l'extrait éthanolique
ERO : Espèce réactive de l'oxygène
FCR : Folin-Ciocalteu
GPx : Glutathion peroxydase
GR : Glutathion réductase
GST : Glutathion s-transférase
IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50%
K₂S₂O₈ : Persulfate de potassium
MDA : Malondialdéhyde
MPT: Perméabilité mitochondriale

N_2O_3 : Trioxyde d'azote

NADPH : Diphénylpicryl β hydrazyl

NO : L'azote

$NO\bullet$: Le monoxyde d'azote

OH: Radical libre hydroxyle

PAA : L'acétaminophène

PE : Poids de l'extrait

PMV : Poids de matière végétale

R : Rendement

SOD : Superoxyde dismutase

TBHQ : Tétrabutyl hydroquinone

TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate

Liste des figures

Figure.1. Répartition de <i>Silybum marianum</i> en Afrique (a), en Europe (b) et en Amérique (c)	5
Figure.2. <i>Silybum marianum</i>	5
Figure.3. Parties de la plante de <i>Silybum marianum</i>	6
Figure.4. Morphologie des racines	6
Figure.5. Tiges de chardon Marie	7
Figure.6. Feuilles de chardon Marie	7
Figure.7. Fleurs de chardon Marie : fraîches (a) et sèches (b)	8
Figure.8. Graines de chardon Marie : libres (a) et attachés à la fleur (b)	8
Figure.9. Structure des principaux acides gras	10
Figure.10. Origine des différents radicaux libres oxygénés	14
Figure.11. Sites de production intracellulaire des ERO	16
Figure.12. Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène	20
Figure.13. Structure de la vitamine E	22
Figure .14. Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes	23
Figure.15. Structure des polyphénols	24
Figure.16. Les flavonolignanes de <i>Silybum marianum</i>	27
Figure.17. Protocole d'étude expérimental	32
Figure .18. Rendements des extraits de <i>Silybum marianum</i>	37
Figure .19. IC ₅₀ des extraits et des standards par le test DPPH	39
Figure.20. IC ₅₀ des extraits et des standards par le test ABTS	40
Figure .21. A0.5 des extraits et des standards par le test CUPRAC	41
Figure.22. Teneur en polyphénols des extraits	42
Figure.23. Teneur en flavonoïdes des extraits	43
Figure .24. Courbe d'étalonnage d'IC ₅₀ d'extraits de <i>Silybum marianum</i> .	54
Figure .25. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Moy.± ET de trois essais)	54
Figure.26. Courbe d'étalonnage de la quercétine (Moy.± ET de trois essais)	55

Liste des tableaux

Tableau.1. Acides gras et leurs formules chimiques contenus dans l'huile extraite des graines de <i>Silybum marianum</i>	10
Tableau .2. Principales classes des flavonoïdes	25

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale	1
Partie 1 Revue bibliographique	
1 <i>Silybum marianum</i>	3
1.1 Historique de la plante	3
1.2 Appellations de la plante	3
1.3 Systématique de la plante	4
1.4 Localisation géographique	4
1.5 Description morphologique	5
1.5.1 Racines	6
1.5.2 Tiges	7
1.5.3 Feuilles	7
1.5.4 Fleurs	8
1.5.5 Fruits	8
1.6 Composition chimique	9
1.6.1 Composition chimique des fruits	9
1.6.2 Huile et acides gras des graines	9
1.7 Utilisation traditionnelle et pharmacologie de <i>Silybum marianum</i>	11
1.7.1 Utilisation traditionnelle	11
1.7.2 Pharmacologie	12
1.7.3 Toxicité	13
2 Stress oxydant	13
2.1 Définition	13
2.2 Radicaux libres	13
2.2.1 Espèces réactives dérivées de l'oxygène	13
2.2.1 Espèces azotées réactives	15
2.2.3. Espèces libres non oxygénées	16
2.3 Production de radicaux libres	16
2.3.1 Production intra-cellulaire	16
2.3.2 Production extra-cellulaire	17

2.4 Rôles physiologiques des radicaux libres	17
2.5 Cibles des radicaux libres	17
3 Antioxydants	18
3.1 Classification des antioxydants	19
3.1.1 Antioxydants enzymatiques	19
a. Superoxyde dismutase(SODEC)	19
b. Catalase	19
c. Glutathion peroxydase (GPx)	20
3.1.2 Antioxydants non enzymatiques	20
a. Glutathion	20
b. Vitamine C	21
c. Vitamine E	21
d. Acide urique	22
e. Bilirubine	22
f. Acide lipoïque	22
g. Coenzyme Q	22
h. Caroténoïdes	23
i. Oligoéléments	23
j. Polyphénols	24
k. Flavonoïdes	24
3.1.3 Antioxydants synthétiques	26
3.2 Antioxydants de <i>Silybum marianum</i>	26
3.3 L'efficacité préventive de la silymarine et de la silibinine	27
3.3.1 Effets hépatoprotecteurs	27
3.3.2 Effet sur le diabète	28
3.3.3 Effet sur le cancer	28

Partie 2 Protocole expérimental

3 Objectif du travail	30
4 Echantillonnage	30
5 Lavage	30
6 Séchage	30
7 Broyage	31
8 Préparations de matériel végétal	31

9	Evaluation de l'activité antioxydante	33
9.1	Test de piégeage du radical libre DPPH	33
9.1.1	Principe	33
9.1.2	Procédure	33
9.2	Réduction du radical-cation ABTS	34
9.2.1	Principe	34
9.2.2	Procédure	34
9.3	Test CUPRAC	35
9.3.1	Principe	35
9.3.2	Procédure	35
10	Détermination de la teneur en composés phénoliques	35
10.1	Dosage des polyphénols totaux	35
10.1.1	Principe	35
10.1.2	Procédure	35
10.2	Dosage des flavonoïdes	36
10.2.1	Principe	36
10.2.2	Procédure	36

Partie 3 Résultats et Discussion

1	Rendements d'extraction	37
2	Activité antioxydante	38
2.1	Activité anti radicalaire au DPPH	38
2.2	Activité ABTS	39
2.3	Test CUPRAC	40
3	Teneur en composées polyphénols	41
3.1	Teneurs en polyphénols totaux	41
3.2	Teneur en flavonoïdes	42
	Conclusion générale	44
	Références	46
	Annexes	54
	Résumés	



Introduction

générale

Introduction générale

La plupart des maladies sont causées par le stress oxydant, induit par les espèces réactives oxygénées (EROs). Car l'accumulation des EROs dans la cellule aboutit à une chaîne de réactions radicalaires qui dégrade les molécules vitales biologiques, et aboutit par la suite à des pathologies très graves. Pour faire face à ce problème, des antioxydants sont préconisés, notamment ceux d'origine naturelle. C'est pourquoi, l'accent est, de plus en plus, mis sur la recherche de nouvelles sources d'antioxydants. Le règne végétal est d'excellence la meilleure source d'antioxydants (Liu et *al.*, 2017 ; Wang et *al.*, 2018). Ce sont les polyphénols, qui sont très abondants dans notre alimentation, ils sont synthétisés par métabolisme secondaire de la plante.

L'extraction des polyphénols à pouvoir antioxydant à partir de la matière végétale, est une étape très importante dans l'étude et l'identification de ces composés. En conséquence, beaucoup d'études sont portées sur l'influence des différentes conditions d'extraction et sur les rendements d'extraction de composés phénoliques de source végétale. De plus, la solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante et par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la même plante (Garcia-Salas et *al.*, 2010 ; Jokić et *al.*, 2010 ; Bonnaillie et *al.*, 2012).

Depuis la préhistoire, l'homme a toujours utilisé les plantes comme principale source de nourriture et médicaments. Environ 170 000 molécules biologiquement actives ont été identifiées à partir des plantes, mais malheureusement, moins de la moitié des plantes ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques (Chaabi, 2008). *Silybum marianum* ou le chardon-Marie ; une plante médicinale bisannuelle courante, qui se propage dans les endroits secs et ensoleillés. Elle est très commune dans la région méditerranéenne, plus précisément en Algérie. Autrefois, elle est utilisée en cuisine et en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies (hépatiques, digestives, cancéreuses...).

Dans ce concept, nous nous sommes intéressés à l'étude du *Silybum marianum*. De plus, les travaux rares sur son activité antioxydante et ces propriétés thérapeutiques mentionnées dans la littérature justifient le choix de celle-ci. Par conséquent, notre recherche vise à élucider en particulier le potentiel antioxydant des différents extraits de *Silybum marianum*,

par évaluation *in-vitro* de son activité anti radicalaire et de son contenu en composés polyphénoliques.

Le présent manuscrit est structuré en trois chapitres. Le premier chapitre synthétise les données bibliographiques sur la description de la plante *Silybum marianum*, le stress oxydatif, les radicaux libres et les antioxydants. Le deuxième est consacré à la présentation du site d'étude, des caractéristiques du matériel biologique utilisé ainsi que la description des méthodes suivies. Le troisième présente les résultats et discussion. Le travail se termine par une conclusion et des perspectives.

Partie 1

Revue

bibliographique

1 *Silybum marianum*

1.1 Historique de la plante

Silybum marianum est utilisée par l'homme en alimentation, est considérée également comme un agent thérapeutique précieux depuis plus de deux mille ans ; elle est utilisée en médecine populaire en Europe et en Asie (Morazzoni et al., 1993). C'est une plante résistante car ses graines sont réparties sur et sous la surface du sol. Elle ne cède pas facilement aux diverses tentatives de pâturage (Bonnier, 1990).

Le nom Chardon-Marie, est donné à cette plante tant en Anglais qu'en Français ou en latin. Le terme *Silybum* désigne en grec et en latin un chardon comestible (Foster, 1995). Par ailleurs, le terme *marianum* se réfère à la Vierge Marie (Morazzoni et al., 1995), qui voyageait de l'Égypte à Palestine et aurait donné le sein à son enfant Jésus près d'un bosquet de chardon, quelques gouttes de son lait tombèrent sur les feuilles, d'où les nervures blanches caractéristiques de cette plante (Lupper, 1998).

Le terme *Silybum* était déjà cité dans la Bible et dès le Moyen-Âge, elle est cultivée dans les monastères et utilisée en médecine (Hostettmann, 1997). *Silybum marianum* était également citée par Pline et Discoride (1969) dans leur livre « *Materia Medica* » comme une plante médicinale du genre chardon ; le nom dérive du grec *Silybon* ou *Silybos* qui signifie houppe (Rodzko, 2000). Le nom a été donné à d'autres chardons comestibles et plus précisément aux deux espèces de ce genre (Rodzko, 2000).

1.2 Appellations de la plante

A travers les siècles, le nom de cette plante est changé d'un pays à un autre. Les différentes appellations de la plante en français, en berbère, en anglais et en arabe sont les suivantes :

- Noms communs en français : Chardon-Marie, Chardon argenté ou marbré, Chardon de Notre-Dame, artichaut sauvage, silybe de Marie (Rodzko, 2000).
- Nom botanique : *Silybum marianum* Gaerthn. (Peris et al., 1996).
- Nom anglais: Milk thistle, Blessed Milkthistle (Dubé, 2010)
- Nom arabe: Chouk el djemel, Bou-zeroual, Ousûkez-zerwal, Chouqboutli, Hacoub et Lichilich, Qortom, Harshafbarri, Shouk el-nasar. (Belkhada, 1997; Beloued, 1998).

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

1.3 Systématique de la plante

La systématique du chardon Marie selon Winston et *al.*, (2008) est comme suit :

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

1.4 Localisation géographique

Silybum marianum est une plante endémique de la région méditerranéenne (Volak et *al.*, 1984). C'est une plante cosmopolite, elle aime les sols secs et les endroits ensoleillés. Elle se trouve dans les champs, les friches, les gravats et les bords des routes (Beniston et Beniston, 1984). Elle s'étend de la mer à 700-1100 m d'altitude, sur les terrains incultes secs et rocaillieux de toutes l'Europe occidentale et centrale et méridionale, ainsi qu'en Afrique du nord et au Moyen- Orient, et elle s'est naturalisée en Amérique du Nord (Morazzoni et *al.*, 1995 ; Charrié et *al.*, 2017). *Silybum marianum* est également cultivée dans les jardins ornementaux (Roche ,1991).

Le chardon -Marie est présente partout en Amérique du Nord, donc on la retrouve également au Canada qu'au Mexique, Nouvelle-Zélande, Australie, Afrique du Sud, Chili et Argentine (Winston et *al.*, 2008).

En Algérie, selon Belouahem (2009) et Quenzel et Santa (1963), *Silybum marianum* est particulièrement répandu dans les hauts plateaux, les prairies, le sud de l'Atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides (**Fig.1**).

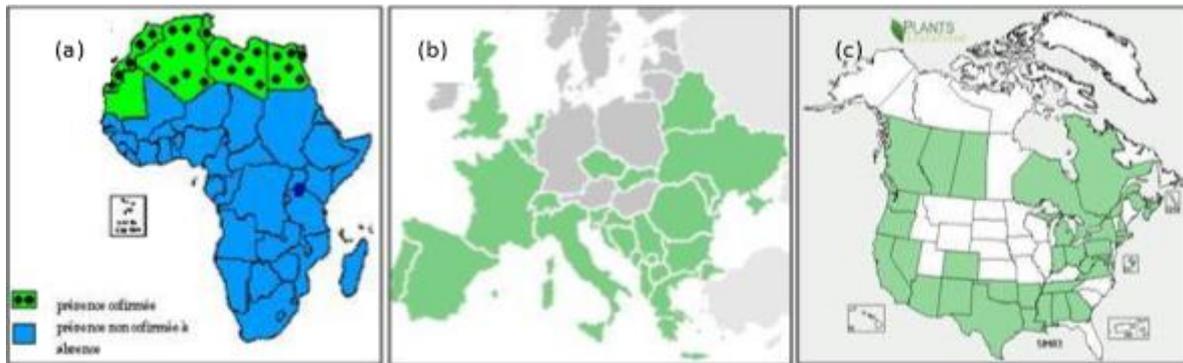


Figure.1. Répartition de *Silybum marianum* en Afrique (a), en Europe (b) et en Amérique (c) (www.plants.usda.gov)

1.5 Description morphologique

Silybum marianum est une plante annuelle ou bisannuelle, elle pousse le long des champs et des routes. Elle se reconnaît grâce à sa belle tête violacée qu'entoure les collerettes un peu défraîchies de leurs longues bractées épineuses (Pepping, 1999) (**Fig.2.**).

Les espèces de cette plante diffèrent les unes des autres grâce à leurs parentés phylogénétiques, qui existent entre les classes règne végétal.



Figure.2. *Silybum marianum* (Martinez, 1997)

Les différents organes de la plante ainsi que leurs parties sont schématisés dans la figure3.



Figure.3. Parties de la plante de *Silybum marianum* (www.alchemy-works.com)

1.5.1 Racines

La tige du *Silybum marianum* s'appuie sur une épaisse racine principale développée, fibreuse, pivotante, forte, longue et épaisse. La figure 4 montre la forme des racines.



Figure.4. Morphologie des racines (Maztinez, 1997)

1.5.2 Tiges

Silybum marianum possède une tige de plus d'un mètre d'hauteur, de type cannelée, dressée et rameuse, comme il est montré dans la figure 1.5. (Hauf, 1989 ; Guittonneau et huon, 1983) (Fig.5).



Figure.5. Tiges de chardon Marie (www.discoverlife.org)

1.5.3 Feuilles

Les feuilles de *Silybum marianum* sont vertes, luisantes, généralement tachetées de blanc le long des nervures et bordées de dents épineuses. Les épines sont jaunes et très puissantes. 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) (Fig.6).



Figure.6. Feuilles de chardon Marie (www.themediteckwellnessgateway.com)

1.5.4 Fleurs

Les capitules des fleurs sont violets (**Fig.7.**). Les fleurs sont à cinq étamines qui forment un tube autour du style. Elles fleurissent depuis le mois de juin jusqu'au mois d'août (Guignard, 1998).



Figure.7. Fleurs de chardon Marie : fraîches (a) et sèches (b) (www.freeflowerpictures.net)

1.5.5 Fruits

Les fruits de *Silybum marianum* sont sous forme de graines noires, luisantes, légèrement aplaties, plus ou moins marbrées de jaune. Ces graine 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 (**Fig.8.**).

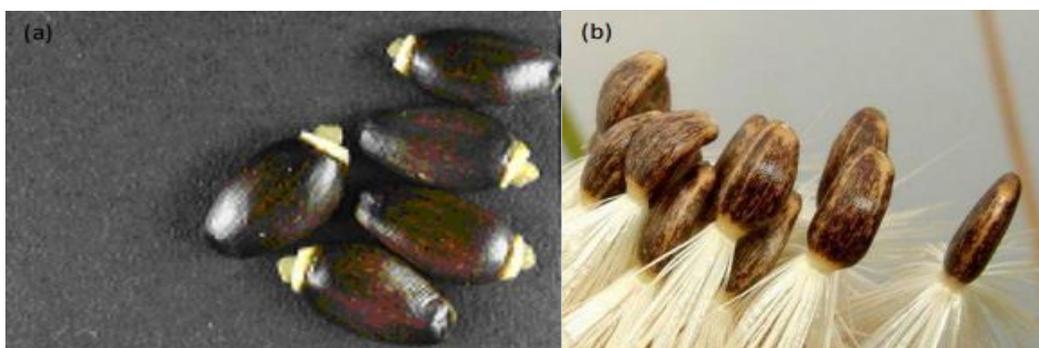


Figure.8. Graines de chardon Marie : libres (a) et attachés à la fleur (b)

(www.sciencephoto.com)

1.6 Composition chimique

Le Chardon-Marie est une plante riche en composés actifs. D'ailleurs les graines contiennent un taux élevé en silymarine (La silymarine est, en fait, constituée de trois flavonoïdes, la silychristine, la silydianine et la silybine) qui peut être extraite séparément des différents composés de l'huile d'où l'intérêt porté à cette partie de la plante (Karkanis et *al.*, 2001).

1.6.1 Composition chimique des fruits

Les graines contiennent entre 1 à 3 % de silymarine. Cette dernière a été isolée pour la première fois en 1968. Elle a comme formule moléculaire $C_{25}H_{22}O_{10}$ et son poids moléculaire est de 482,45g/mol (Saller, 1995).

La silymarine est un mélange de différents flavonolignanes issus de la taxifoline et de l'alcool coniférylique (Saller, 1995). Il s'agit notamment de la silybine (silybine A, silybine B), la silychristine, la silydianine et l'isosylibine (isosylibine A, isosylibine B) (Anonyme, 1995). Ce sont les principaux composés responsables de l'action thérapeutique de cette plante. Mis à part ces flavonolignanes principaux, le fruit contient également d'autres flavonolignanes en plus faible quantité (déhydrosilibinine, 3- desoxysilychristine, silymonine, siliandrine, silybinome, silyhermine et neosilyhermine) (Halbach et *al.*, 1971), des flavonoïdes (quercétine, taxifoline, kampferol, apigénine), mais aussi des protéines (25-30%), ainsi que de lipides (20-30%) et des stérols (0.63%) (cholestérol, campesterol, stigmastérol et sitostérol.) (Meyer et *al.*, 1999).

1.6.2 Huile et acides gras des graines

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%) (Li et *al.*, 2011) (**Fig.9**). 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).

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.

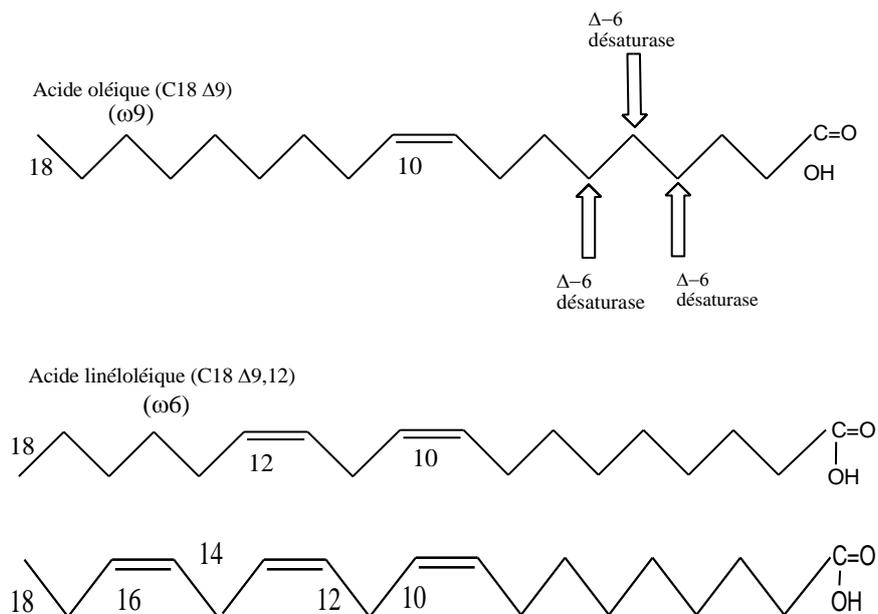
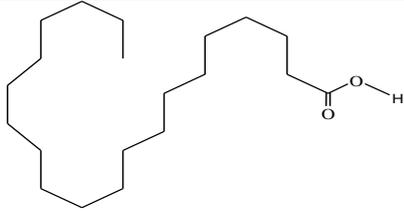
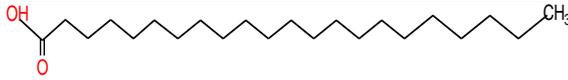
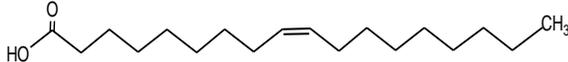
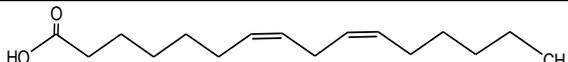
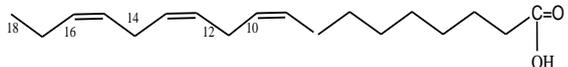


Figure.9. Structure des principaux acides gras (Touitou, 2006)

Dans les acides gras, la chaîne carbonée est symbolisée par une succession d'atomes de carbone reliée entre eux par des liaisons covalentes. Le tableau 1 illustre les acides gras et leurs formules chimiques contenus dans l'huile extraite des graines de *Silybum marianum* (Cuvelier et al., 2004).

Tableau 1. Acides gras et leurs formules chimiques contenus dans l'huile extraite des graines de *Silybum marianum* (Cuvelier et al., 2004).

Structure	Taxonomies	Nom commun	Formules chimique
C12:0	Acide didécanoïque	Acide laurique	
C14:0	Acide tétradécanoïque	Acide myristique	
C16:0	Acide hexadécanoïque	Acide palmitique	
C16:1	Acide -7 Cis-9 hexadécaenoïque	Acide palmitoléique	
C18:0	Acide octadécanoïque	Acide stéarique	

C20:0	Acide eicosanoïque	Acide arachidique	
C22:0	Acide docosanoïque	Acide behénique	
C18:1	Acide -9 Cis-9 octadécaénoïque	Acide oléique	
C18:2	Acide -6 Cis-9,12 octadécadiénoïque	Acide linoléique	
C18:3	Acide -6 Cis-6,9,12 octadécatriénoïque	Acide linoléique	

1.7 Utilisation traditionnelle et pharmacologie de *Silybum marianum*

1.7.1 Utilisation traditionnelle

L'extrait de Chardon-Marie est utilisé en médecine traditionnelle depuis 2000 ans. Son fruit n'apparaît pas dans la pharmacopée européenne actuellement en vigueur, mais dans le DAB 9 (pharmacopée Allemande) (Hartek, 1987). *Silybum marianum* est utilisée en médecine traditionnelle en tant qu'aide digestif, anti-inflammatoire, tonique anti-tumoral diurétique.

Au dix-neuvième siècle, la fleur de *Silybum marianum* était employé pour des problèmes du foie, du rein, de la rate, de calculs biliaires, des problèmes de grossesse et de menstruation (Meschy et *al.*, 1995).

Au seizième siècle Paracelse préconisait le chardon-Marie contre les brûlures intérieures. Un siècle plus tard, Gerarde a indiqué leur efficacité contre la dépression. Ses feuilles ont été employées, surtout aux Etats-Unis, pour stimuler l'appétit et favoriser la digestion.

Les racines se consomment comme celles des salsifis. Les jeunes pousses peuvent être consommées crues ou cuites. Les feuilles développées, débarrassées des épines qui leur sont adjacents, constituent un légume délicat. En Afrique du nord, la nervure des feuilles et le

pétiole s'emploient comme les cardes. Avant la floraison, les tiges sont tendres et juteuses. Les capitules, cuits comme des artichauts, sont d'un goût très fin. Le chardon-Marie a connu les honneurs de la culture potagère, mais il est depuis longtemps tombé dans l'oubli (Debuigne et *al.*, 2006).

1.7.2 Pharmacologie

Les graines de chardon-Marie peuvent être parmi les meilleurs régénérateurs de foie. Dans les années 1950, les composants des fruits du chardon-Marie (qui représentaient 4 % à 6% des fruits séchés) ont été séparés et distribués dans des capsules standard avec des autres contenus (70-80%) (Meschy et *al.*, 1995).

- Une étude des solvants industriels hépatotoxiques (toluène) a montré que le chardon-Marie a un potentiel de détoxification. Après 30 jours de traitement au chardon-Marie, tous les paramètres hépatique (enzymes sanguines) et plaquettaires ont été significativement améliorés (Szila et *al.*, 1988).
- Plusieurs rapports ont confirmé l'efficacité du chardon-Marie dans le traitement de l'empoisonnement à l'amanite (Carducci, 1996).
- Sa teneur élevée en acides gras insaturés lui permet d'être utilisé pour les régimes hypocholestérolémiantes et la prévention des maladies cardiovasculaires. (Venkataraman, 2000).
- Des épreuves cliniques réalisées sur divers désordres hépatiques comprenant l'hépatite virale, la cirrhose suggèrent que le chardon-Marie diminue l'activité de l'aminotransférase et améliore certains paramètres cliniques (Amrani, 2006).
- le chardon-Marie joue un rôle dans la prévention des maladies infectieuses. D'autres études ont montré qu'il favorise la différenciation neuronale (Amrani, 2006).
- Il est considéré comme un agent cytoprotecteur, car il peut réduire les dommages du foie causés par l'empoisonnement par les champignons vénéneux (Widmer., 1999).
- Des expériences sur des patients diabétiques montrent que la prise de chardon-Marie peut réguler de manière significative les niveaux de sucre et d'insuline dans le sang, il a donc la capacité de protéger le pancréas (Amrani, 2006).
- Le chardon Marie est aussi utilisé dans le cas des patients atteints de VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine) (El-Mallah et *al.*, 2003).
- Une étude sur des patients recevant un médicament pour la maladie d'Alzheimer, la

tacrine, démontre que le chardon-Marie diminue les effets secondaires gastro-intestinaux et cholinergiques du médicament (Allain et *al.*, 1999).

1.7.3 Toxicité

Le *Silybum marianum* est utilisée depuis l'antiquité dans l'alimentation et divers traitements et dans les préparations médicales traditionnelles, et elle n'a présenté aucun symptôme nocif ou toxique.

Dans une étude expérimentale réalisée sur des souris, les résultats ont montré qu'elles pouvaient tolérer une dose de 20gkg⁻¹. Toutes fois des réactions allergiques ont été rapportées pour des doses supérieures (Saller, 1995).

2 Stress oxydant

2.1 Définition

Le stress oxydant est défini comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), en raison d'un déséquilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants en faveur de la formation des espèces réactives. Ce déséquilibre conduit à des dommages potentiels des lipides, des protéines et de l'ADN (Anderson, 1997 ; Fu et *al.*, 2011).

Le stress peut être causé par des substances toxiques (pollution, tabac, drogues, etc.) ou des conditions physiologiques (comme l'hypoxie et le vieillissement), qui peuvent entraîner une production accrue de radicaux libres (Chatard, 2005).

2.2 Radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules très instables, ils portent au moins un électron non apparié. Ils sont produits naturellement par l'organisme, comme ils peuvent également se produire en présence de rayonnement radioactif. Leur accumulation conduit à des endommages des molécules voisines (Letkessas et *al.*, 2017). La plupart des radicaux libres proviennent de l'oxygène, et certains peuvent provenir de l'azote (NO) (**Fig.10**).

2.2.1 Espèces réactives dérivées de l'oxygène

La production des radicaux libres est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions

dités de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production des radicaux libres oxygénés (Kooppenol, 2001 ; Poston *et al.*, 2004).

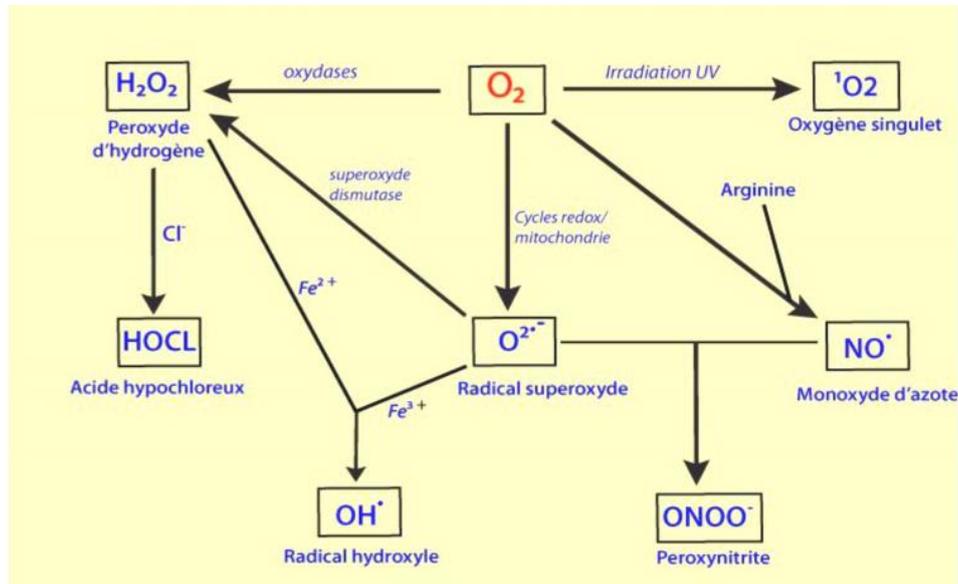
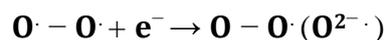


Figure.10. Origine des différents radicaux libres oxygénés (Favier, 2003).

➤ Ion superoxyde (O_2^-) : c'est un dérivé très réactif de l'oxygène. Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire selon la réaction suivante:



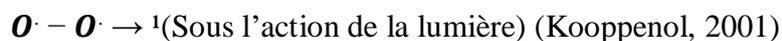
C'est un radical relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives (Favier, 2003).

➤ Radical libre hydroxyle (OH^\bullet) : c'est un radical très réactif. Son temps de demi-vie en milieu aqueux est de 10⁻⁶ secondes. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides et les protéines. Il peut être produit à la suite de diverses réactions.

- La réaction d'Haber-Weiss : $O_2^- + H^+ + H_2O_2 + Fe^{3+} \rightarrow HO^\bullet + H_2O + Fe^{2+}$ (Judde, 2004).

- La réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + H_2O + HO^\bullet$ (Cesarini, 2004).

➤ L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) : lorsque l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée (Hadi, 2004). C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



➤ Le peroxyde (H_2O_2) : il est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène même s'il n'a pas une structure radicalaire. C'est une espèce relativement faible, mais il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs et de réagir avec les ions partiellement réduits de Fe^{2+} et de Cu^+ pour former le radical hydroxyle dans la réaction de Fenton (Wardman ; Candeias, 1996) :



Comme il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les équations suivantes :



2.2.2 Espèces azotées réactives

Parmi toutes les espèces susceptibles de se former dans les cellules, il y a un ensemble des espèces qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons espèces azotées réactives. On distingue deux types :

- Espèces azotées radicalaires : Le monoxyde d'azote ($\text{NO} \cdot$), malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation et ses effets anti-inflammatoires, il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives (Droge, 2016).
- Espèces azotées non radicalaires : Elles sont caractérisées par leur grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et leur réactivité moyenne. Le monoxyde d'azote radicalaire ($\text{NO} \cdot$) peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO_2), lequel peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3), pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO_2^-) (Droge, 2016).

2.2.3. Espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les EROs. Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par exemple, les acides gras peroxydés, les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques (Sorg, 2004).

2.3 Production de radicaux libres

2.3.1 Production intra-cellulaire

La production des ERO dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles, mais elle est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire (**Fig.11.**) (Mazat et *al.*, 2010).

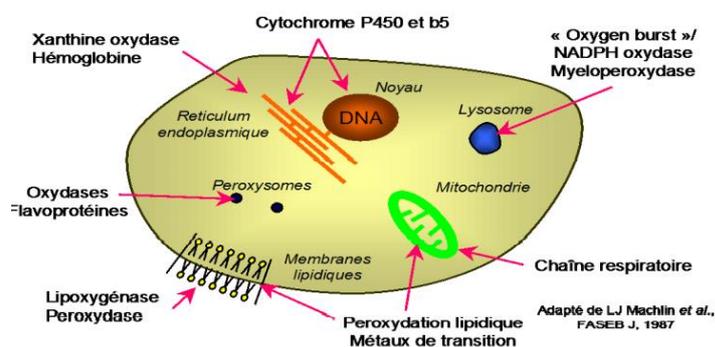


Figure.11. Sites de production intracellulaire des ERO (Moure et *al.*, 2001).

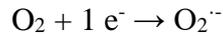
La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon la réaction suivante :



Les cytochromes P450, accepteurs terminaux d'électrons du complexe (IV) de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, ils catalysent la réaction :



Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde :



Compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire chez les organismes aérobies, cette fuite d'électrons semble devancer les activités de la NAD(P)H. De plus, dans les mitochondries, l'oxydation de coenzymes, telles que les flavoprotéines réduites, s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de la chaîne de transport, sont ensuite transférés à l'O₂. D'autres sources peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme la xanthine oxydase, les peroxysomes, enzymes de la voie de l'acide arachidonique (Delattre et *al.*, 2005).

2.3.2 Production extra-cellulaire

À côté des productions endogènes, il existe des sources exogènes des formes radicalaires oxygénées, liées à une mauvaise hygiène de vie. Ils sont consécutifs au tabagisme, à une ingestion excessive d'alcool, à l'ingestion d'huiles oxydées, ou à des agents physiques, tels que la chaleur, les rayons ultraviolets ou encore divers polluants (Riché et Chos, 2008).

2.4 Rôles physiologiques des radicaux libres

Les rôles des EROs ont très compliqués, car selon leur concentration, ils peuvent produire des effets physiologiques ou toxiques. Ils sont produits en faible quantité dans des conditions normales et agissent comme des substances messagères secondaires régulant l'apoptose cellulaire ou l'activité du facteur de transcription. Ces EROs assurent la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovule pendant la fécondation, ils assurent également la défense immunitaire contre les agents pathogènes, et ils régulent l'expansion des capillaires et la fonction et la mémoire de certains neurones (Poortmans et *al.*, 2003 ; Valko et *al.*, 2007).

2.5 Cibles des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être à l'origine de multiples lésions cellulaires. Leurs structures cibles essentielles sont : les lipides membranaires, les protéines les acides nucléiques notamment l'ADN. Et c'est pourquoi, les EROs seraient impliqués dans le

développement de maladies telles que le cancer, les maladies neuro-dégénératives et la pathogénèse des infections virales.... Ils peuvent s'attaquer aux cellules du système immunitaire et donc altérer les réactions de défenses de l'organisme (Poston et *al.*, 2004).

L'attaque des radicaux libres dans les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés de la membrane provoque un processus de peroxydation en cascade, qui conduit à la désintégration complète de la membrane et modifie sa fluidité et sa perméabilité, conduisant par la suite à une altération des propriétés fonctionnelles des cellules (Poston et *al.*, 2004).

Les EROs peuvent réagir efficacement avec divers acides aminés de la chaîne protéique et modifier sa structure et sa fonction. Ce qui conduit à la rupture des liaisons peptidiques et la formation des fragments de protéines. Les acides aminés les plus touchés sont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine (Cherubini et *al.*, 2005).

L'ADN (nucléaire ou mitochondrial) est également une cible importante des EROs. Ceux-ci peuvent interagir avec le désoxyribose et ses bases puriques et pyrimidiques. Ces changements structurels conduiront à des changements génétiques éventuellement à long terme (Koechlin-ramonatxo, 2006).

Les conséquences biologiques des EROs varient selon leur dose et le type cellulaire. Un stress léger augmente la prolifération cellulaire et l'expression des protéines d'adhésion, un stress modéré favorise l'apoptose cellulaire, et un stress élevé conduit à la nécrose. La membrane cellulaire provoque une lyse immédiate. De nombreuses autres anomalies biologiques sont causées par le stress oxydatif : mutations, carcinogénèse, malformations fœtales, dépôt anormal de protéines, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression... (Favier, 2003).

3 Antioxydants

Un antioxydant est défini comme une substance, ajoutée à faible dose, qui peut ralentir ou empêcher l'oxydation d'un produit dans l'air (Park et *al.*, 2001). Cette définition peut être élargie de sorte que le terme antioxydant englobe toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques des effets potentiellement nocifs des processus ou des réactions qui produisent une oxydation excessive (Shimizu, 2004).

L'un des mécanismes les plus importants auxquels participent les antioxydants est l'interruption des réactions d'oxydation en empêchant les réactions en chaîne par oxydation des radicaux libres, et inhibant ainsi leurs effets. Beaucoup de ces propriétés se retrouvent dans les thiols et les phénols (Mette et *al.*, 2006).

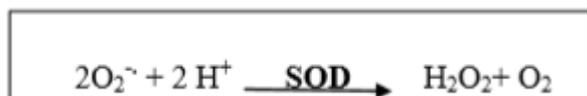
3.1 Classification des antioxydants

On distingue deux grandes classes des antioxydants : les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

3.1.1 Antioxydants enzymatiques

a. Superoxyde dismutase (SOD : EC 1.15.1.1)

La SOD est un antioxydant enzymatique largement utilisé par l'organisme. Ce sont des métalloprotéines, ils sont parmi les premières lignes de défense contre le stress oxydatif en transformant l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, par la réaction de dismutation, en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Haleng et *al.*, 2007) :



Cet enzyme se trouve chez la plupart des organismes vivants. Il existe plusieurs types de superoxyde dismutase (SOD), qui diffèrent par leurs cofacteurs (Manganèse, Cuivre, Zinc), la structure cellulaire et la localisation (Redler et *al.*, 2012).

Chez l'homme, trois isoformes de la SOD ont été caractérisées: la SOD1 cytosolique et la SOD3 extracellulaire, utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Cu/Zn-SOD), alors que la SOD2 mitochondriale utilise le manganèse (Mn-SOD) (Afonso et *al.*, 2007).

b. Catalase (CAT : 1.11.1.6)

Cette enzyme se trouve principalement dans les peroxysomes. Elle permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (composés stables) selon la réaction de Fenton (Valko et *al.*, 2006 ; Jacques et *al.*, 2004).



La catalase est composée de quatre sous-unités, chaque sous-unité a un groupe de fer (ferriprotoporphyrine) et une molécule de NADPH dans son site actif. L'un des atomes de fer

est à l'état Fe^{3+} . La liaison du NADPH à la catalase confère une protection contre l'attaque de l' H_2O_2 (Delattre et *al.*, 2005).

c. Glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase est l'un des systèmes enzymatiques protecteurs les plus importants, car elle détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras (Ganther, 1999). L'action des antioxydants au cours du métabolisme, dont la Glutathion peroxydase, est montrée dans la figure 12.

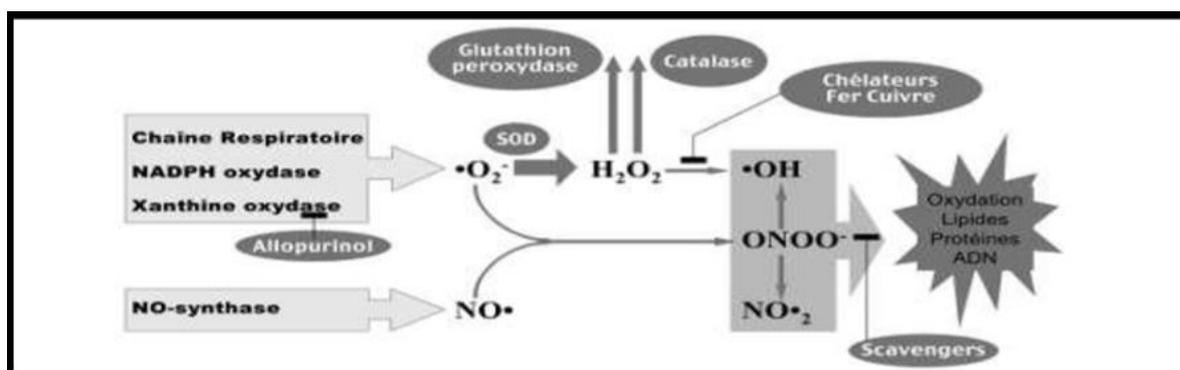
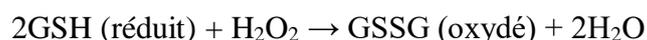


Figure.12. Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène (Belmimoun, 2016)

C'est une enzyme à cofacteur de sélénium, se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle est capable de dégrader des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction suivante (Lehucher et *al.*, 2012):

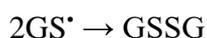
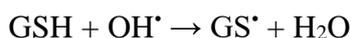


3.1.2 Antioxydants non enzymatiques

a. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide ubiquitaire (γ -glutamyl-cystéylglycine), produit dans divers tissus. Il est présent dans de nombreux compartiments intracellulaires (noyau, cytoplasme, mitochondries) sous forme réduite (GSH). Un ratio GSH/GSSG élevé est important pour assurer une protection contre le stress oxydatif (Valko et *al.*, 2006).

Le glutathion joue un rôle important en tant qu'antioxydant endogène et maintient l'équilibre redox. En effet, le GSH est impliqué dans l'élimination d'H₂O₂ et d'hydroperoxydes lipidiques (Seghaouil et *al.*, 2017). Le GSH peut inhiber la peroxydation lipidique. C'est un piègeur direct de certains types d'ERO tels que les radicaux OH• et le monoxygène 1O₂• (Halliwell, 1996). C'est un antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire :



b. Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est considérée comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant. Les aliments ayant la plus grande teneur en vitamine C sont les agrumes, les kiwis et les légumes (brocolis, chou-fleur) (Gulcin., 2012).

L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés, puisqu'il réagit avec les radicaux hydroxyles (OH•), les radicaux superoxydes (O₂•) (Gardès -Albert et *al.*, 2003). Elle piège les radicaux peroxydes en phase aqueuse avant qu'ils initient la réaction de peroxydation lipidique. La vitamine C peut avoir un effet pro-oxydant et ainsi se lier avec des ions métalliques, dont Fe³⁺ pour le réduire en Fe²⁺, et qui pourra ensuite catalyser différentes réactions, dont celle de Fenton (Gulcin, 2012).

c. Vitamine E

La vitamine E ou α-tocophérol est un bon antioxydant alimentaire. Elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane. Elle est utilisée par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (**Fig.13.**) (Bentafar et *al.*, 2016).

La vitamine E est un antioxydant liposoluble, elle prévient l'apparition d'hydropéroxydes en piégeant les radicaux LOO• (Packer, 2015). La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice. Celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α-tocophéryle ; ceci capte les radicaux superoxydes, les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet (Letkessas et *al.*, 2017)

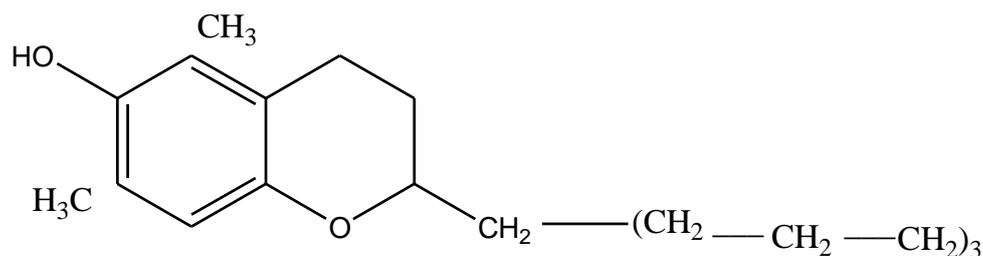


Figure.13. Structure de la vitamine E (Letkessas et *al.*, 2017)

d. Acide urique

Les tissus humains ne contiennent pas l'urate oxydase pour dégrader l'acide urique en allantoiné, ce qui conduit à son accumulation en tant que produit final du catabolisme des purines. Il est également présent dans le plasma humain en quantités importantes avant d'être éliminé par la voie rénale.

L'acide urique ayant des propriétés antioxydantes. Au pH physiologique, l'acide urique s'ionise et se transforme en urate. Ce dernier est un puissant piègeur de radicaux libres (OH^\bullet , ROO^\bullet , NOO^\bullet ...) (Haleng et *al.*, 2007), et il possède des propriétés antioxydantes contre les HO^\bullet et RO_2^\bullet , tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine (Delattre et *al.*, 2005).

e. Bilirubine

La bilirubine résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. C'est un composé liposoluble, capable de piéger les radicaux peroxyde, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Algeciras-Schimnich et *al.*, 2007).

f. Acide lipoïque

C'est un antioxydant puissant qui peut régénérer d'autres antioxydants tels que les vitamines C et E (David, 2015). Il est capable de piéger le HO^\bullet , ROO^\bullet , HOCl^\bullet et 1O_2 (Packer et *al.*, 2001), de chélater les métaux lourds, de réduire la glycation et interviendrait dans la réparation de l'ADN. Il existe sous forme oxydée et sous forme réduite. Il est produit en petite quantité par le foie, il se trouve également dans certains aliments (la levure, la viande de bœuf, l'épinard, le brocoli...) (Medart, 2009).

g. Coenzyme Q

Le coenzyme « Q » est un composé de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il permet le transport d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Il est également présent dans les lipoprotéines, où il a un effet antioxydant : il inhibe la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes. Son effet antioxydant s'exerce aussi au niveau de l'ADN et des protéines, étant donné que le coenzyme « Q » est le seul antioxydant liposoluble endogène (Bentinger et *al.*, 2010).

h. Caroténoïdes

Les plus importants sont le bêta-carotène, l'alpha-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. Ce sont des excellents piègeurs des espèces radicalaires, particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures (Belmimoun, 2016).

i. Oligoéléments

Les oligoéléments ou les éléments-trace (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (**Fig.14**). Comme les vitamines du groupe B, le chrome ou le magnésium agissent comme des antioxydants indirects *via* la régulation de l'homocystéinémie (vitamines du groupe B), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (chrome) ou la lutte contre l'inflammation (magnésium) (Roussel, 2009).

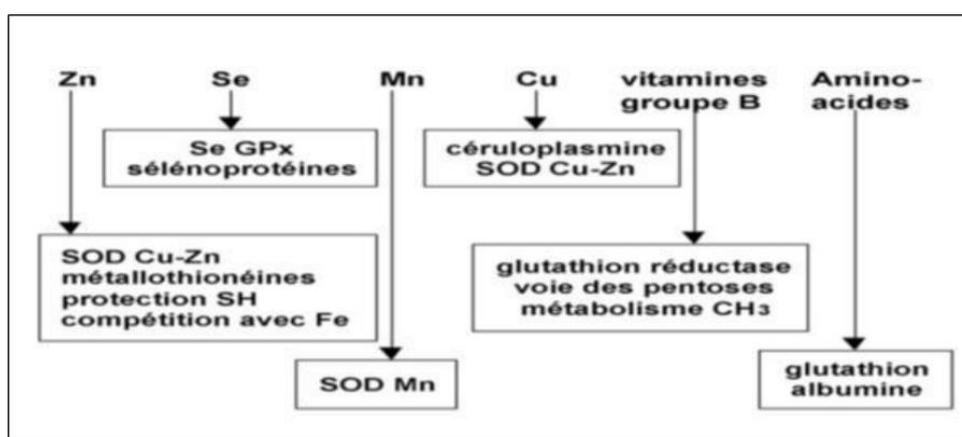


Figure .14. Oligoéléments nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (Roussel, 2009).

j. Polyphénols

Les composés phénoliques constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux (Haleng, 2007). Ils sont capables de neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène grâce à leurs groupements hydroxyles. Ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote (Letkessas et *al.*, 2017) (**Fig.15**).

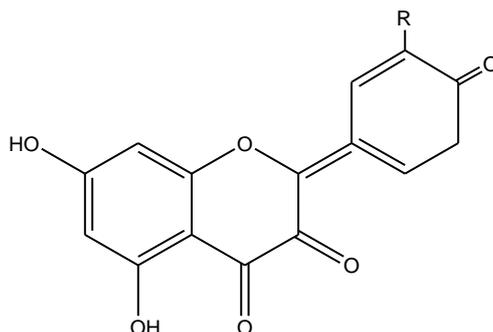
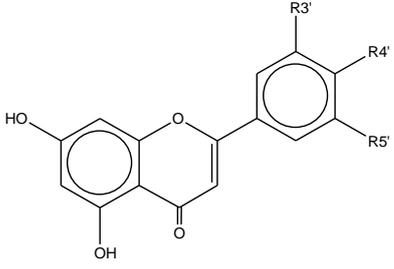
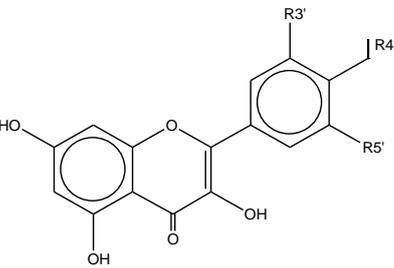
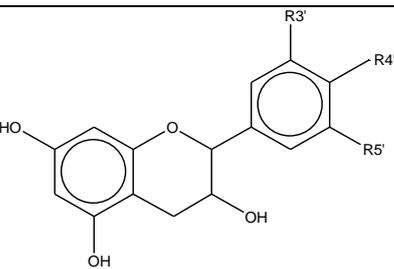
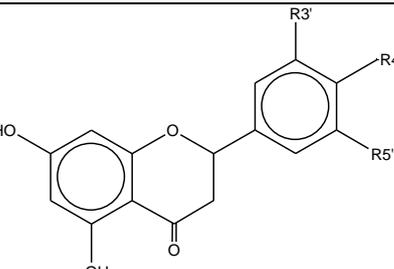
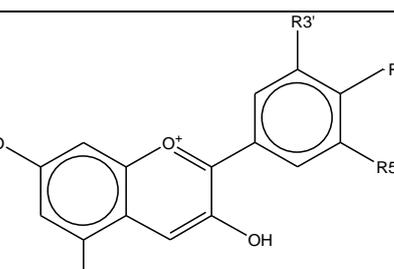


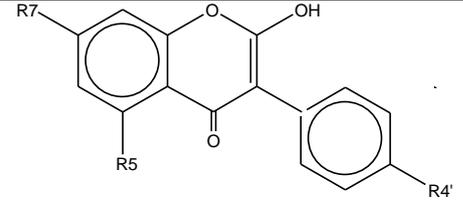
Figure.15. Structure des polyphénols <http://www.omicsonline.org/>

k. Flavonoïdes

L'appellation « flavonoïdes » rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones. Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié (Sarni-Manchado et Cheynier 2006), dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (**Tableau 2**) (Derijke et *al.*, 2006).

Tableau .2. Principales classes des flavonoïdes (Narayana et *al.*, 2001).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavone		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonol		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanol		OH	OH	H	Catéchine
Flavanone		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidine		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine

Isoflavone		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Diadézine

3.1.3 Antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Mais, récemment, beaucoup d'études ont porté sur leur toxicité élevée dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytoluène (BHT), butylhydroxyanisole (BHA), le tétra butyl hydroquinone (TBHQ), etc. (Buzzini et *al.*, 2003). La réduction d'utilisation des antioxydants synthétiques impose d'orienter le marché vers des antioxydants d'origine naturelle, et stimule la recherche dans ce domaine (Wang et *al.*, 2002). Les plantes représentent une source très riche et renouvelable d'antioxydants naturels (Gauche et *al.*, 2006). L'industrie des aliments propose plusieurs antioxydants naturels comme additifs alimentaires. Le développement de méthodes de production de ces substances naturelles, spécialement à partir de plantes, est un domaine prometteur et en pleine croissance (Stöckigt et *al.*, 2002).

3.2 Antioxydants de *Silybum marianum*

Il existe une grande famille connue sous le nom des flavonolignanes présente uniquement au niveau des graines de *Silybum marianum*. En fait, la silymarine était isolée en 1968, est considérée comme la substance active qui fournit les effets thérapeutiques de la plante. Il s'agit en fait d'un mélange de substances dont le composé principal est la silibinine. Plusieurs auteurs 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 16. (Foster, 1990 ; Brown, 1993 ; Hadi, 2004). Le composé le plus actif biologiquement est la silybine, plusieurs études ont prouvé son efficacité thérapeutique par rapport aux autres composants de la silymarine (Foster, 1990).

L'administration de la silymarine augmente les activités des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx), la

glutathion réductase (GR) et la glutathion s-transférase (GST) avec une diminution des taux de malondialdéhyde (MDA), un marqueur de la peroxydation lipidique, dans les globules rouges exposés à H_2O_2 (Qavami et al., 2013).

La silymarine contient un grand nombre de constituants actifs incluant les flavonoïdes aux propriétés antioxydantes, empêchant ainsi certains produits toxiques de causer des lésions du foie (Foster, 1997). La silymarine a été appliquée dans le traitement adjuvant des hépatites aiguës ou chroniques et des cirrhoses causées par l'alcool, les drogues ou les toxines, et dans le traitement de l'indigestion et des calculs biliaires. En plus de traiter la ménopause, la constipation, le diabète, le rhume des foins, les saignements utérins et les varices (Pierre-André, 2010).

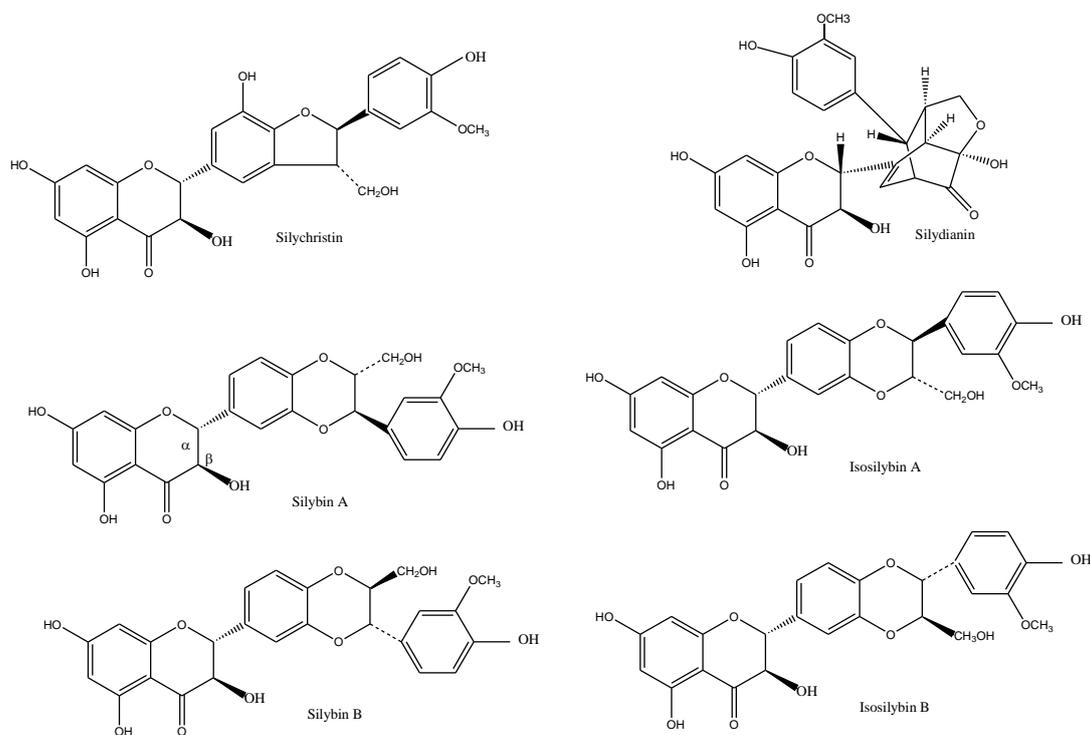


Figure.16. Flavonolignanes de *Silybum marianum* (Foster, 1990.)

3.3 Efficacité préventive de la silymarine et de la silibinine

3.3.1 Effets hépatoprotecteurs

Ces dernières années, certaines études ont en partie éclairé certains aspects des mécanismes hépatoprotecteurs de la silymarine. En cas de maladies alcooliques du foie, où le stress oxydatif et l'inflammation sont la clé dans le cas de la pathogénèse, la silymarine a pu

exercer des pouvoirs hépatoprotecteurs en atténuant les facteurs de la nécrose des tumeurs, en diminuant l'activité de la production de l'alanine aminotransférase sérique (ALAT), inhibant la peroxydation des lipides et l'augmentation du contenu de la glutathion intracellulaire (Song et *al.*, 2006).

Les effets hépatoprotecteurs de la silymarine ont également été observés dans le cas de la toxicité hépatique induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) et l'acétaminophène (PAA), due en partie à son pouvoir antioxydant (Luper, 1998). La silibinine exerce aussi des effets hépatoprotecteurs en partie par inhibition de la formation des leucotriènes par les cellules de Kupffer (Dehmlow et *al.*, 1996), et il est estimé comme un des médiateurs de la réponse immunitaire *in vivo* (Schumann et *al.*, 2003). La silymarine a également été signalée pour exercer un effet protecteur contre les lésions mitochondriales dans le foie du rat, survenant pendant la transplantation et / ou la chirurgie du foie, en empêchant les altérations de la mitochondrie, la diminution de peroxydation membranaire et la sensibilité accrue à la transition de perméabilité mitochondriale (MPT) (Rolo et *al.*, 2003).

3.3.2 Effet sur le diabète

Plusieurs études cliniques ont été menées afin d'étudier l'efficacité de la silymarine dans diverses pathologies dans d'autres organes. L'administration de 600 mg de silymarine par jour à deux groupes de patients diabétiques atteints de cirrhose alcoolique et traités à l'insuline, a permis d'observer après 4 mois de traitement, une diminution significative de la glycémie (Pares et *al.*, 1998).

3.3.3 Effet sur le cancer

➤ Cancer de la peau

La silymarine a la capacité de réduire l'expression des tumeurs cutanées de la souris (Zi et *al.*, 1997). L'effet thérapeutique de la silymarine a également été rapporté lorsqu'elle est administrée dans l'alimentation, elle favorise le DMBA (7,12-diméthyl (a) anthracène) et le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) du papillome initié dans la peau des souris SENCAR *in vivo*.

➤ **Cancer du sein**

Des études ont révélé que la silbinine exerce des effets synergiques anticancéreux avec des médicaments et des agents chimiothérapeutiques utilisés dans le cancer du sein (Tyagi et *al.*, 2004).

➤ **Cancer de la vessie**

Les travaux de Vinh et *al.* (2002) ont constaté que la silybinine inhibe la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses de la vessie chez l'être humain en provoquant un arrêt du cycle cellulaire et en induisant l'apoptose *in vivo*.

➤ **Cancer du côlon**

Volate et *al.* (2005) signalent que lorsque des rats sont nourris avec la silymarine, une diminution importante du nombre de colonies adénomiques au niveau du cancer du côlon chez le rat est obtenue .

Dans une expérience à long terme, la silymarine réduit significativement l'incidence et la multiplicité des adénocarcinomes du côlon lors de la phase d'initiation ou la phase de post-initiation de cancérogenèse colique induite par l'azoxyméthane (l'AOM) (Kohno et *al.*,2002).

➤ **Cancer des ovaires**

Giacomelli et *al.* (2002) ont rapporté que Silipide a augmenté le potentiel de la cytotoxicité des médicaments anticancéreux comme le cisplatine (CDDP) *in vitro* et donc réduire le cancer des ovaires.

Partie 2

**Matériel
et
méthodes**

1 Objectif du travail

Ce mémoire a pour but d'étudier l'activité antioxydante de la partie aérienne d'une plante médicinale, *Silybum marianum*. Le travail était réalisé au laboratoire de Biochimie, au niveau du Centre de Recherche de Biothechnologie (CRBT), Constantine, Algérie.

L'objectif principal de cette étude est d'élucider, *in vitro*, le pouvoir antioxydant de quatre extraits de la partie aérienne (feuille, fleurs, graines et tiges) de *Silybum marianum* au moyen de trois tests à savoir : le balayage des radicaux libres de DPPH (2,2'diphényl-1-picrylhydrazyl), d'ABTS (2,2'- azino-bis (3 éthylbenzothiazoline -6- sulfonique Acide), le test CUPRAC, et la détermination des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans ces mêmes extraits.

2 Echantillonnage

L'échantillonnage de la plante est effectué durant la période de floraison et de la fructification (Février, 2020), dans la commune de Djellalde, la wilaya de Khenchela au niveau de la région des Aurès. L'échantillonnage était loin de toute pollution et ceci pour éviter tout changement éventuel dans la composition chimique de cette plante.

3 Lavage

Les échantillons sont nettoyés et rincés à l'eau courante et à l'acétone pour éliminer toutes les poussières et matières étrangères tels que le sable, la saleté et autre impureté, puis stockées dans un endroit sec et sombre.

4 Séchage

Une fois les échantillons sont nettoyés, ils sont séchés à température de laboratoire, dans un endroit bien aéré. Ils sont protégés de la lumière dans le but de:

- Obtenir un meilleur broyage (plus la plante est sèche, cela nous aide à obtenir une meilleure mouture).
- Standardiser le taux d'humidité résiduelle de nos échantillons.

5 Broyage

Les différentes parties de la plante sont broyées par un broyeur électrique (pour réduire les échantillons en poudre). La poudre ainsi obtenue est portée dans une boîte en verre couverte avec du papier aluminium, afin d'éviter la photooxydation des substances actives.

6 Préparations de matériel végétal

L'extraction des substances bioactives contenues dans la partie aérienne de la plante est réalisée par une macération de la poudre des feuilles, fleurs, tiges et grains. 150g de la poudre sont divisés en quatre parties égales. Chacune est mélangée, indépendamment, avec le même volume d'éthanol, de dichlorométhane, d'acétate d'éthyle et de butanol (**Fig.17.**).

Les quatre mélanges sont laissés 24 heures sous agitation pour la macération selon le protocole modifié de Ozer et *al.*(2000). Les extraits obtenus sont ensuite filtrés sur du papier filtre (20*20 cm). Les filtrats sont évaporés par la suite à sec et chacun à une température précise (l'extrait éthanolique à 40 °C pendant 45 min, l'extrait butanolique, l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de dichlorométhane à 43°C pendant 1 h), sous pression réduite avec un évaporateur rotatif (BÜCHI R-210). Chaque extrait est récupéré dans une boîte de Pétri, puis conservé dans le réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité jusqu'à son utilisation (**Fig.17.**).

Les rendements de l'extraction sont obtenus par la formule suivante :

$$R\% = PE / PMV * 100$$

R (%) = Rendement de l'extraction exprimé en %,

PE = Poids de l'extrait après l'évaporation du solvant exprimé en gramme (g),

PV = Poids de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimé en gramme (g).

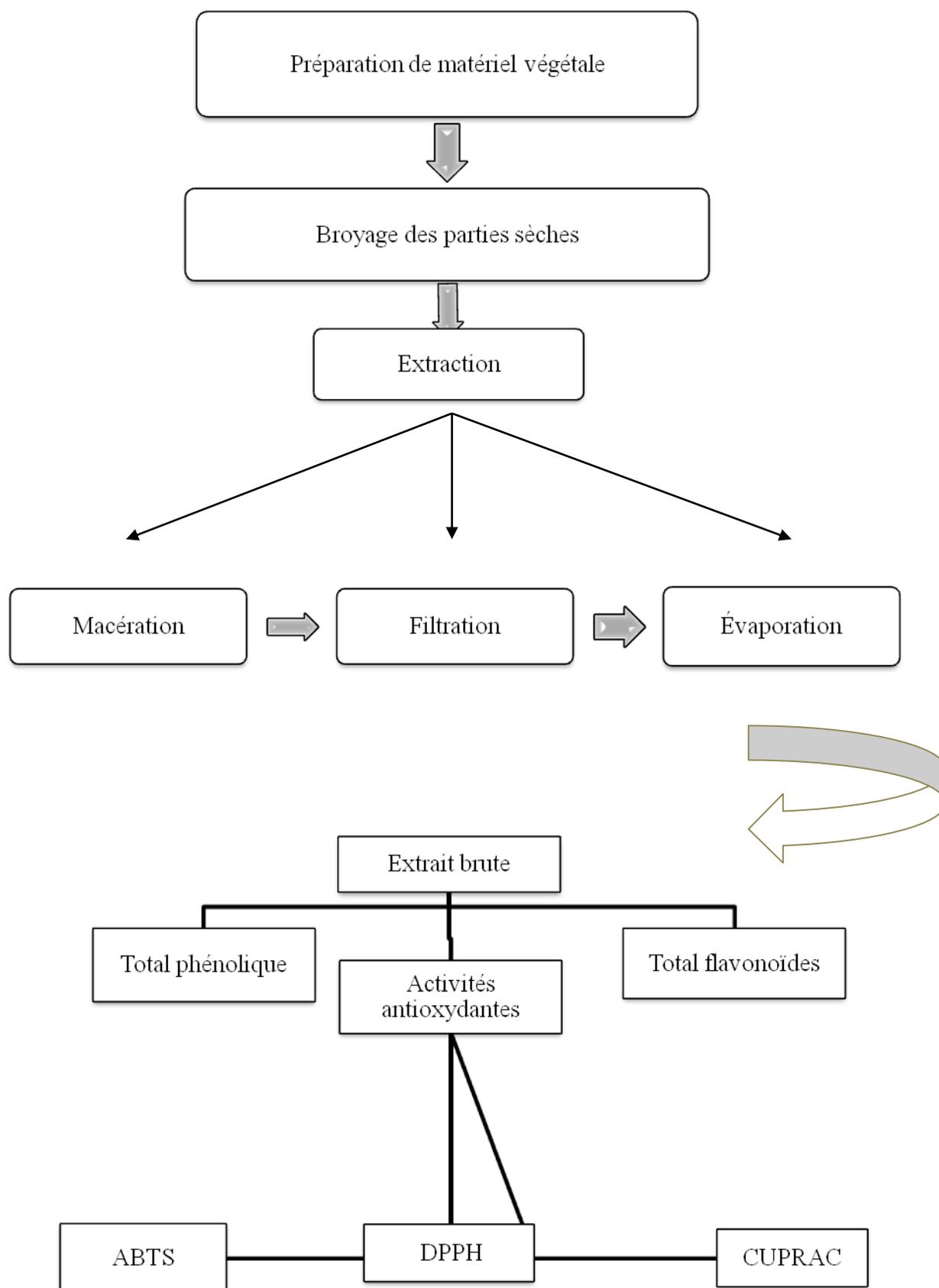


Figure.17. Protocol d'étude expérimental.

7 Evaluation de l'activité antioxydante

Trois méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits: le test du DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), le test ABTS (2,2'- azino-bis -3 éthylbenzothiazoline -6- sulfonique Acide) et le test CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity).

7.1 Test de piégeage du radical libre DPPH

7.1.1 Principe

Le test DPPH mesure l'activité antioxydante des composés capable de transférer des atomes d'hydrogène. Le composé (DPPH⁺) est un cation radical de couleur violette qui montre un maximum d'absorbance à 517 nm. Les composés antioxydants, capables de le réduire en 2,2 Diphenyl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Brand-Williams et *al.*, 1995).

7.1.2 Procédure

Les tests ont été réalisés selon le protocole décrit par Blois (1958). 40 µL de chaque extrait ont été ajoutés à 160 µL de solution méthanolique de DPPH (0,6 %). Après incubation pendant 30 min à 30 °C à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm en utilisant la solution méthanolique de DPPH comme blanc.

Le Butyl Hydroxy Toluène (BHT) et le Butyl Hydroxy Anisole (BHA) sont pris comme standards antioxydants et qui ont été préparés dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été obtenu par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition (DPPH)} = ((A C - A E) / A C) \times 100$$

A C : Absorbance du standard.

A E : Absorbance de l'extrait.

La concentration inhibitrice 50 % (IC₅₀) est la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Elle a été déterminée graphiquement par la régression linéaire (Dangles et *al.*, 1999), selon l'équation suivante : $IC_{50} = Y - b / a * 100$ µg/mL.

Sachant que :

IC_{50} = La concentration inhibitrice 50 %

Y = Pente du témoin

b = Pente du test

a = pente du témoin

Où, le témoin est le signal témoin, obtenu avec la xanthine oxydase ; et le test est le signal test, obtenu en présence de l'antioxydant. Les mesures sont effectuées en trois répliques.

7.2 Réduction du radical-cation ABTS

7.2.1 Principe

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de Re et *al.* (1999). Le radical cationique ABTS réagit avec la plupart des antioxydants, notamment les phénols, les thiols et la vitamine C. Au cours de ces réactions, il perd sa couleur bleue et retrouve son état neutre, incolore. Ces réactions peuvent être suivies par spectrophotométrie. La capacité antioxydante est mesurée comme la capacité des composés tests à diminuer l'intensité de la coloration obtenue à partir de l'ABTS à 734 nm.

7.2.2 Procédure

Le persulfate de potassium a été ajouté comme agent oxydant à l'ABTS dans le méthanol pour former la solution aqueuse d'ABTS. Le mélange a été laissé dans l'obscurité pendant 12 h à 16 h. L'absorbance de la solution ABTS ainsi obtenue est ajustée par l'éthanol ou l'eau à 0.700 ± 0.020 à 734 nm. Ensuite, 40 μ l de l'échantillon sont ajoutés à 160 μ l de la solution d'ABTS. L'absorbance est lue après 10 min à 734 nm.

L'activité ABTS^{•+} a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{Effet de piégeage de l'ABTS}^{\bullet+} (\%) = (A_{\text{Control}} - A_{\text{Echantillon}} / A_{\text{Control}}) * 100$$

7.3 Test CUPRAC

7.3.1 Principe

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est une nouvelle méthode. Elle est basée sur le suivi du changement de l'absorbance du complexe néocuproïne (Nc)-ions cuivrique $[\text{Nc}_2\text{-Cu}^{+2}]$ qui subit une réduction en présence d'un agent antioxydant (Apack et *al.*, 2004).

7.3.2 Procédure

Une quantité de 40 μl de chaque extrait a été mélangée avec 60 μl du tampon d'acétate d'ammonium ($M=1 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 7$), 50 μl d'une solution de néocuproïne ($M=7.4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) et 50 μl d'une solution de CuCl_2 ($M=0.01 \text{ mol/l}$). Les mélanges sont ensuite incubés à l'obscurité pendant 1h à 30°C. Les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde $\lambda = 456 \text{ nm}$.

Le BHT est pris comme standard. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0.5}$ correspondant à la concentration ($\mu\text{g} / \text{mL}$) indiquant 0,50 d'absorbance.

8 Détermination de la teneur en composés phénoliques

8.1 Dosage des polyphénols totaux

8.1.1 Principe

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965), selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller et *al.* (2010).

Le réactif du Folin est un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$), il est réduit lors de l'oxydation des phénols. La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm (Müller, 2010).

8.1.2 Procédure

Une masse de 1 mg de la poudre de l'échantillon est dissoute dans 1 mL de l'eau distillée ou de méthanol. 100 μL d'une solution de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10ème) et 75

μl de bicarbonate de sodium (7,5%) sont ajoutés à 20 mL de la solution précédemment préparée. Le mélange est incubé pendant 2h à température ambiante et à l'obscurité. La lecture est effectuée à 765 nm et en utilisant l'acide gallique comme standard, contre un blanc préparé de la même manière et en remplaçant l'extrait par le méthanol.

8.2 Dosage des flavonoïdes

8.2.1 Principe

La teneur en flavonoïdes des extraits est déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium décrite par Topçu et *al.* (2007), et modifiée pour des dosages sur microplaque de 96 puits.

8.2.2 Procédure

Une masse de 1 milligramme de l'échantillon est dissoute dans 1 mL de méthanol. 50 μl de cette solution sont ajoutés à 130 μl du méthanol, 10 μl de la solution d'acétate potassium (CH_3COOK) et 10 μl d'une solution de nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (10%). L'absorbance est lue à 415 nm après 40 min d'incubation en utilisant la quercétine comme étalon.

Partie 3

Résultats et

Discussion

Ce projet de fin d'étude en Master a été réalisé pour estimer la capacité antioxydante de *Silybum marianum*. Pour une estimation fiable, la capacité antioxydante de cette plante ne doit pas être conclue sur la base d'un seul biomarqueur antioxydant. Pour cela, elle a été mesurée dans différents extraits de *Silybum marianum*, et sur la base de plusieurs biomarqueurs les plus utilisés et potentiellement complémentaire à savoir : le test de piégeage des radicaux DPPH et ABTS, le test CUPRAC et le dosage des polyphénols.

1 Rendements d'extraction

La figure 18 illustre les résultats des rendements d'extraction de *Silybum marianum*, qui varient selon le solvant d'extraction utilisé. La comparaison des valeurs de rendement montre que l'extrait butanolique (EB) a enregistré un fort rendement de l'ordre de 20,5%, suivi de l'extrait dichlorométhane (ED) avec 18,17 %, puis l'extrait l'acétate d'éthyle (EAE) avec 16 % et enfin, l'extrait l'éthanolique (EE) avec le plus faible rendement de 12,17%.



Figure .18. Rendements des extraits de *Silybum marianum*.

L'extraction des polyphénols par macération reste la méthode la plus utilisée dans le cas de l'extraction des molécules fragiles ; bien qu'elle est généralement longue et exige des solvants organiques qui sont chers et dangereux pour la santé (Garcia-Salas et *al.*, 2010 ; Ben Amor, 2008).

L'utilisation de quatre solvants différents pour l'extraction, permet de séparer les composants qui se trouvent dans la plante à étudier, selon leur degré de solubilité dans chaque solvant (Hagerman et *al.*, 2000).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en métabolites secondaires, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et *al.*, 2003).

Ainsi, les rendements d'extraction varient en fonction de l'espèce végétale étudiée et de ces propriétés génétiques, de l'organe utilisé dans l'extraction, des conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), de la durée de séchage ainsi que de la période de récolte (Chaouch, 2013 ; Mohammedi, 2013). Il s'ensuit que les rendements d'extraction et la composition des extraits varient d'un solvant à l'autre et d'un végétal à l'autre.

2 Activité antioxydante

Les quatre extraits de *Silybum marianum* sont examinés pour leur pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH, d'ABTS et celle de CUPRAC, en mesurant l'IC₅₀. Rappelant que l'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) est déterminée pour les extraits et les standards utilisés. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH ou d'ABTS, ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour diminuer 50% de l'absorbance de la solution de DPPH ou d'ABTS. Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenge des radicaux libres, dont les valeurs faibles reflètent un effet antiradicalaire important (Villano et *al.*, 2007).

2.1 Activité anti radicalaire au DPPH

La réduction du radical libre DPPH^{*} (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm (Molyneux, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune.

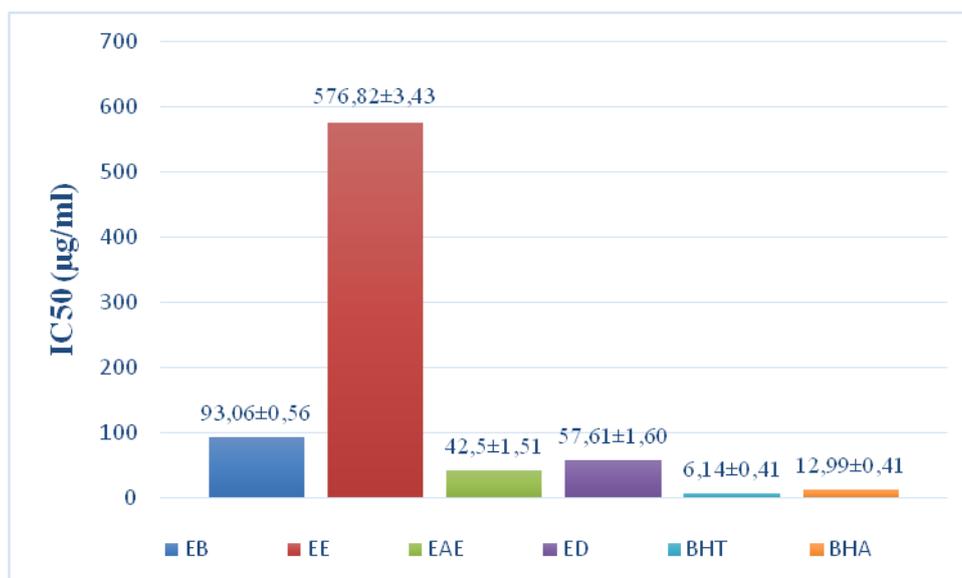


Figure .19. IC₅₀ des extraits et des standards par le test DPPH.

La figure 19 représente les valeurs d'IC₅₀ des extraits et des standards. Elle montre que les valeurs obtenues pour les extraits EB, EAE et ED sont 93,06±0,56, 42,50±1,51 et 57,61±1,60 µg/mL, respectivement. Ces valeurs révèlent que les extraits de *Silybum marianum* possèdent une activité anti oxydante modérée en comparaisent avec les standards (6,14 pour le BHT et 12,99 µg/mL pour le BHA). Par ailleurs, la valeur de l'IC₅₀ de l'extrait EE (576,82±3,43 µg/mL) révèle une faible activité par rapport aux standards (BHT et BHA). La réduction du radical DPPH la plus élevée a été observé par l'extrait acétate d'éthyle (EAE).

Les quatre extraits étudiés ont montré des activités antioxydantes différentes. Les extraits EB, EAE et ED ont été très actif. L'extrait EE, avec une CI₅₀ largement supérieure aux celles des standards, a été moins actif. Toutefois, cet extraits pourrait servir de piègeurs de radicaux libres, agissant éventuellement comme un antioxydant primaire (Sahgal et *al.*, 2009 ; Kadri et *al.*, 2011).

2.2 Activité ABTS

La méthode du radicale ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres. Elle est basée sur la neutralisation d'un radical cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 éthylbenzothiazoline -6- sulfonique Acide) (ABTS^{•+}).

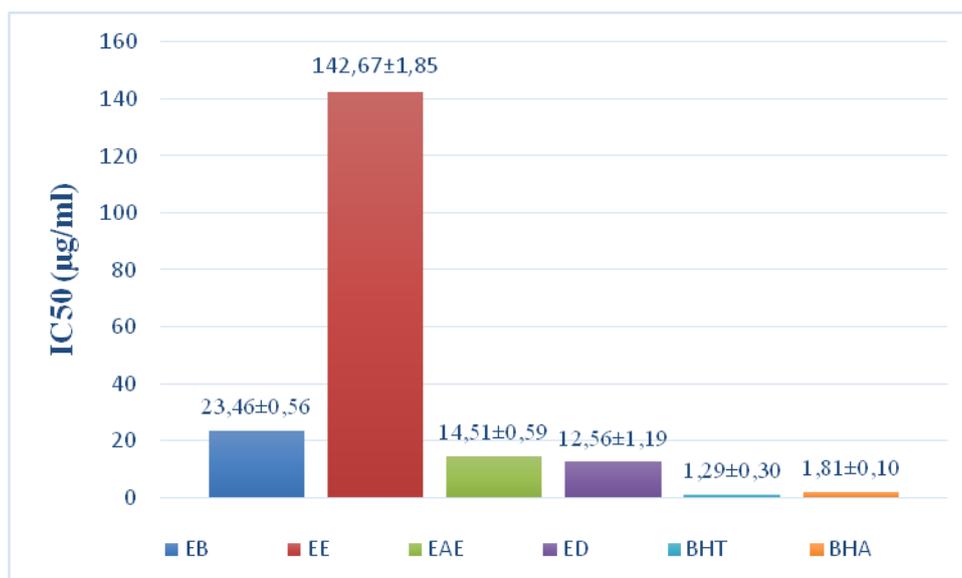


Figure.20. IC₅₀ des extraits et des standards par le test ABTS.

D'après la figure 20, on constate que les valeurs de l'IC₅₀ des extraits EB, EAE et ED (23,46±0,56, 14,51±0,59 et 12,56±1,19 µg/mL, respectivement) sont approximatives proches, et moyennement actifs par rapport aux celles des standards BHT et BHA (1,29 et 1,81 µg/mL, respectivement). Ces résultats dévoilent que ces trois extraits sont dotés d'une bonne activité antiradiclaire contre l'ABTS. Cependant, la valeur de l'IC₅₀ de l'extrait EE (142,67±1.85 µg/mL) montre une faible activité en comparant avec les standards utilisés.

2.3 Test CUPRAC

La méthode CUPRAC est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc)-cuivre (Cu²⁺) [Nc₂ - Cu²⁺]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, ce complexe est réduit et cette réaction est mesurée à 450 nm (Apak et *al.*, 2004).

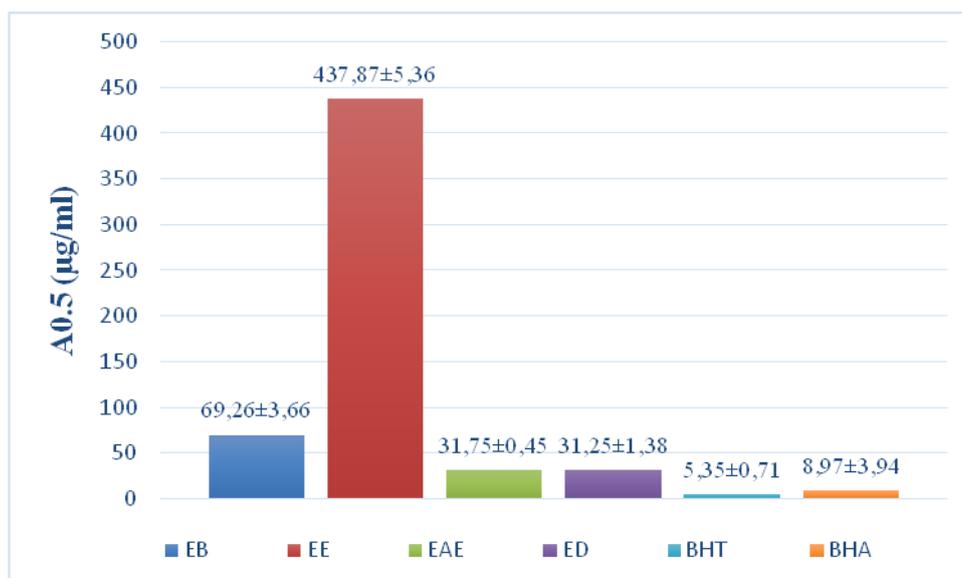


Figure .21. A_{0.5} des extraits et des standards par le test CUPRAC.

D'après la représentation graphique portée dans la figure 21, les valeurs d'A_{0.5} des extraits EB, EAE et ED (69,26±3,66, 31,75±0,45 et 31,25±1,38 µg/mL, respectivement) montrent une activité modérée par comparaison aux standards, BHT et BHA (5,35±0,71 et 8,97±3,94 µg/mL, respectivement). En revanche, la valeur d'A_{0.5} de l'extrait EE (437,78±5,36 µg/mL) montre une activité très faible par rapport à celles des standards (BHT et BHA).

3 Teneur en composés polyphénols

L'extraction des composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques.

3.1 Teneurs en polyphénols totaux

L'extraction quantitative des composés phénoliques d'une poudre végétale pose plusieurs problèmes comme:

- La présence de différents types d'enzymes végétales susceptibles de modifier les composés phénoliques, en particulier les polyphénols oxydases et les glycosidases.
- Le séchage du matériel végétal est une bonne méthode pour éliminer les activités enzymatiques mais, la température de séchage peut être un facteur destructeur des polyphénols (Ribéreau-Gayon, 1968).

La teneur en polyphénols totaux est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu pour chaque extrait. La teneur est calculé à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

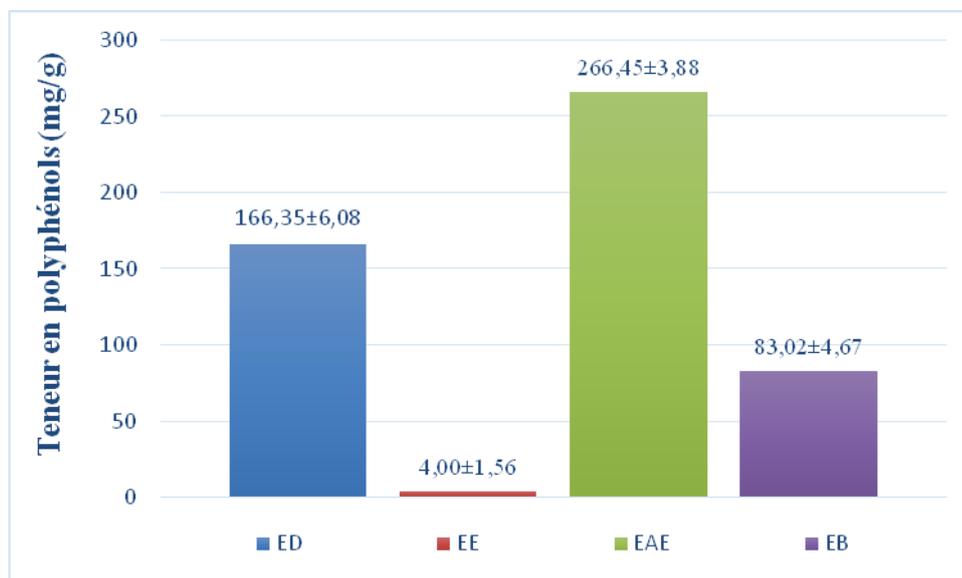


Figure.22. Teneur en polyphénols des extraits.

Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 22. Ils montrent que la quantité des composés phénoliques extraite est différente selon le solvant utilisé. En effet, la teneur en polyphénols de l'extrait EE est $4,00 \pm 1,56$ mg/g, et celle de l'extrait EB est de $83,02 \pm 4,67$ mg/g, tandis que celles des extraits ED, EAE sont de $166,35 \pm 6,08$ et $266,45 \pm 3,88$ mg/g, dans cet ordre.

Ces données montrent que les deux premiers extraits renferment des teneurs faibles à moyennes en composés polyphénoliques. Par contre, les deux derniers extraits sont très riches en ces composés. Cette différence est liée à la solubilité des composés phénoliques, le type de solvant utilisé et le degré de leurs polymérisations (Naczki et Shahidi, 2004). De plus, les composés phénoliques sont le plus souvent combinés à d'autres substances comme les protéines, les polysaccharides, les terpènes, la chlorophylle, les lipides, les composés inorganiques, ...) (Mompon et al., 1996).

3.2 Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes, composés les plus importants des polyphénols, sont aussi déterminés dans la partie aérienne (feuilles, tiges, grains et fleurs) de *Silybum marianum*.

Les taux des flavonoïdes des quatre extraits sont déterminés par la méthode au trichlorure d'ammonium en utilisant la quercitrine comme étalon.

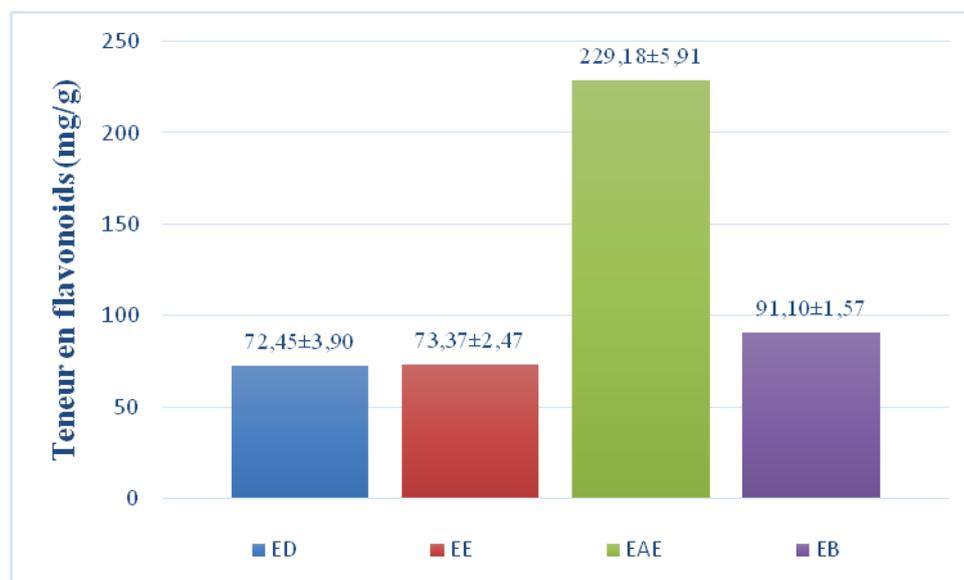
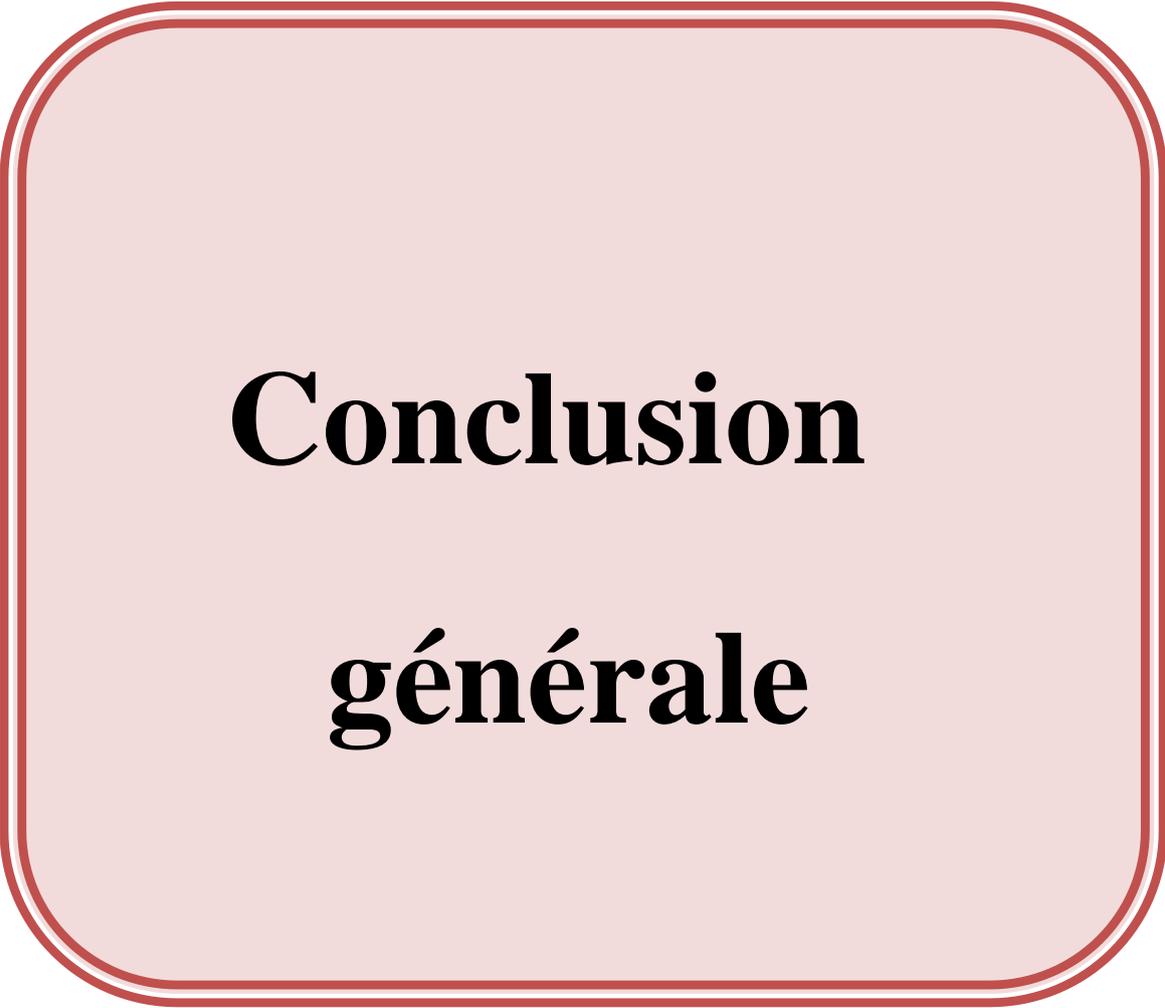


Figure.23. Teneur en flavonoïdes des extraits.

D'après la figure 23, on constate que la concentration des flavonoïdes dans les divers extraits ED, EE et EB (72,45 ± 3,90, 73,37 ± 2,47 et 91,10 ± 1,57 mg/g, dans cet ordre.) sont considérées comme des teneurs moyennes. Tandis que, l'extrait EAE (229,18 ± 5,91 mg/g) est le plus riche en composés flavonoïdes. Ces variations peuvent s'expliquer par le fait que la quantité des composés phénoliques dans les extraits de la plante étudiée dépend essentiellement de leur solubilité dans les solvants utilisés (méthanol, eau distillée) ainsi que la polarité de ces derniers (Escribano-Bailon ; Santos-Buelga, 2003).

Tous les extraits organiques de *Silybum marianum* ont montré des quantités significatives de composés phénoliques. L'activité antioxydante observée pourrait se justifier par la présence de ces composés. Par ailleurs, des études phytochimiques sur les alcaloïdes des plantes ont montré également leurs propriétés antioxydantes.

Les travaux de Syed Muhammad et al. (2011), Benchaachoua et al., (2018) et ceux de Falah (2019), portés sur l'évaluation des substances bioactives de *Silybum marianum*, ont montré la richesse de cette plante en composés phénoliques et antioxydantes.



Conclusion
générale

Conclusion générale

La présente étude s'est proposée pour l'évaluation de l'activité antioxydante de *Silybum marianum*, une plante endémique de la flore algérienne utilisée dans le traitement de plusieurs maladies. Le travail était basé sur l'évaluation du pouvoir antioxydant dans différents extraits de cette plante et la quantification de leur teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Les résultats montrent que les extraits EB, EAE et ED possèdent une activité antioxydante modérée en utilisant les tests DPPH, ABTS et CUPRAC. Dans l'ensemble, ces activités restent nettement inférieures à celles des standards BHT et BHA. Ces activités pourraient être améliorées et probablement se rapprocher de celles des standards, avec la purification des molécules actives.

Les résultats du dosage des composés phénoliques dans les quatre extraits de *Silybum marianum* révèlent, d'une part, que les extraits ED et EAE ayant les teneurs la plus élevées en polyphénols totaux par rapport aux extraits EB et EE, dont le premier contient une teneur moyenne alors que le deuxième contient une très faible quantité en ces composés. D'autre part, le dosage des flavonoïdes a montré que l'extrait EAE ayant la teneur la plus élevée, par ailleurs, les extraits ED, EE et EB montrent des teneurs moyennes.

Ces résultats révèlent que *Silybum marianum* renferme des quantités importantes de composés polyphénoliques susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles: pharmaceutique, alimentaire, cosmétique....

En perspectives, dans le but de compléter ce travail, on propose de:

- Tester et exploiter d'autres systèmes de solvants pour améliorer l'extraction.
- Evaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes.
- Etudier l'activité antioxydante des huiles essentielles de cette plante.
- Purifier et identifier les principes actifs de cette espèce avec des méthodes chromatographiques.
- Tester *in-vitro* l'activité enzymatique des extraits (Alpha amylase, acétylcholinestérase...).

- Détecter la présence des autres métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et les quinones, tanins, saponines, stérols et polyterpènes.
- Faire des essais de l'activité antalgique, anti-inflammatoires, antivirale et anticancéreusesur des souris ou des rats.

Références

1. Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydesdismutases : Rôle dans les maladies rhumatismales. Rev. Rhum. 74 : 636-643.
2. Algeciras-Schimmich A., Cook W. J., Milz T. C., Saenger A. K., Karon B. S.2007. Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. ClinicalBiochemistry. 40: 1311 – 1316.
3. Allain H, Schuck S. 1999. Aminotransferase levels and silymarin in the novo tacrine treated patients with Alzheimer's disease. Dement.Geriarrtr. Cogn
4. Amrani O .2006. Valeur nutritive du chardon marie (*Silybum marianum*(1) Gaerthn) "Tawra".Magister de la faculté des sciences del'Algérie Batna :25-27.
5. Anderson. T.J. 1997. Oxidative stress, endothelial function and coronary ather osclerosi s.Cardiologia. 42:701-714.
6. Apak R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index fordietary polyphenols and vitaminsCand E, using their cupric ion reducing capability in the presence of Neocuproine: CUPRAC Method. J. Agric. Food Chem. 52:7970–7981.
7. Belkhada J. 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. ISBN. IBIS Press: 202.
8. Belmimoun A. 2016. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales, thèse du doctorat 3ème cycle en science technologie et santé. Université De Mustapha Stambouli De Mascara : 7-9.
9. Belouahem A.D. 2009. Biodiversité floristique et vulnérabilité des aulnaies glutineuses de la Numidie Algérienne (N.E Algérien). European journal of scientific research.32 (3):345.
10. Beloued A. 2009. Plantes médicinales d'Algérie. 5emme edition, office des Publications Universitaires INA El-Harrach : 68.
11. Beloued A. 1998.Plantes médicinales d'Algérie, ED, Office des publications Universitaires INA EL Hrach: 68.
12. . Ben Amor B.2008. Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs. Texturation par détente instantanée contrôlée DIC. Thèse de doctorat en génie des procédés industriels. université de La Rochelle. France :187.
13. Benchaachoua A., Mahdjoubbessam H., Saidi I.2018. Effects of different extraction methods and solvents on the phenolic composition and antioxidant activity of Silybum Marianum leaves extracts. International journal of medical science and clinical invention, 5(03):3643-3645.
14. Beniston N.T., Beniston W.S .1984. Fleures d'Algérie .Ed entreprise nationale de livre, alger :274.
15. Bentafar.S., Chaib.M .2016. Contribution a l'étude phytochimique et a l'effet antioxydantde l'extrait méthanolique d'*Eruca Vesicaria* . Mémoire master en biochimie moléculaire et santé,Université des frères mentouri constantine :21-32.
16. Bentinger M., Tekle M., Dallner G. 2010. Coenzyme Q—biosynthesis and functions. Biochembiophysres commun. 396(1): 74-79.
17. Bonnier G.1990. La grande flore en couleurs. Edition belin Paris. 4 ; 582-589.
18. Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C.1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-wissenschaft und technologie: 28- 25-30.

19. Brown D.1993.Silymarin Education Monograph. Herbalres Update: 23-36
20. Buzzini. P ., Pieroni A .2003. Antimicrobial activity of extracts of clematis vitalba towards pathogenic yeast and yeast-like microorganisms fitoterapia. 74:397–400.
21. C. Bonnaille., M. Salacs ., E. Vassilova., I. Saykova.2012. Etude de l'extraction de composés phénoliques a partir de pellicules d'arachide (*Arachishypogaea L.*). Revue de génie industriel. Vol. 7 :35-45.
22. Carducci R .1996. Silibinin and acute poisoning with *Amanita phalloïdes*, *Minerva Anestesiol*; 62(5):187-93.
23. Cesarini J.P. 2004. Le sélénium. actualité. 2em éd. John libby eurotext: 145. 24.
24. Chaouch TM. 2014. Contribution a l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. thèse de doctorat. université abou bekrbelkaid - Tlemcen (UABT) : 18-35.
25. Charrié JC., Chastel B., Cieur C., Combe P., Damak M., Hedayat K., Saigne-Soulard C. 2017. Plantes médicinales phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique. Tec & Doc lavoisier ed Paris : 256.
26. Chatard JC. 2005. Lutter contre le dopage en gérant la récupération physique, publications de l'université de saint-etienne amazon France : 157. 27.
27. Cherubini A et al., 2005.Potential markers of oxidative stress in Stroke. *Free radical biology & medicine*. 39: 841-852.
28. Cuvelier C., Cabaraux J-F., Dufrasne I., Hornick JL., Istasse L. 2004. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Ann. Méd. Vét* :148- 133-140.
29. Dangles O., Fargeix G., Dufour C.1999. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *Journal of the Chemical SocietyPerkin Transactions 2*: 1387-1395.
30. Davide, G. W. 2015. *Encyclopedia Of Mind Enhancing, Foods, Drugs And Nutritional Substances*. Seconded, Edmcfarland& Company, Iuc, Publishers Jefferson, North Carolina:166.
31. Debuigne. G., Couplan .F. 2006. *Petit larousse des plantes qui guérissent*, ED. Larousse : 296-297.
32. Dehmlow C., Erhard J., De Groot H.1996. Inhibition of kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 23: 749–754
33. Delattre J., Beaudeau J.L., Bonnefont-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Ed. Tec et Do., lavoisier. Paris : 547 .
34. Droge W.2016. Free radicals in the physiological control of cell function, *cellular physiol. Rev.* 82:47-95.
35. El-Mallah MH.,Safinaz M., El-Shami M., Hassanein M .2003. Detailed studies on some lipids of *Silybum marianum (L.)* seed oil. *Grasas y Aceites*. 54. Fasc4: 397-402.
36. Falah S M., PehlivanM ., Sevindik M. 2019.Antioxidant, antibacterial and antifungal activities of different extracts of *silybummarianum* collected from duhok iraq :25-36.
37. Favier A. 2003.Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique* : 108-115.

38. Foster S. 1990. Milk thistle: *Silybum marianum*. Austin (TX): American Botanical Council:203-205.
39. Foster S. 1995. Milk Thistle: Herbal Seeds And Medicinal Needs. Better Nutrition For Today's Living 64-710.
40. Foster S.1997. Milk Thistle. *Silybum Marianum*. Houston, TX: American Botanical Council: 7 42.
41. Fu L., Zhang Y. 2011. Antioxidant Capacities And Total Phenolic Contents Of 62 Fruits. Food Chemistry. 129: 345-350.
42. Ganther H.E. 1999. Selenium Metabolism, Selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase, Carcinogenesis, 20 (9):1657- 1666.
43. Garcia-Salas P., A. Morales-Soto., A. Segura-Carretero., Fernández-Gutiérrez. A. 2010. Phenolic-Compound-Extraction systems for fruit and vegetable samples .Molecules. Vol. 15 : 8813-8826.
44. Gardès-Albert M., Dominique B.R., Zohreh A. Z., Daniel J. D. 2003. Espèces Réactives De L'oxygène: Comment L'oxygène Peut-Il Devenir Toxique ? L'actualité Chimique:91-96.
45. Garner., Joseph P., Weisker., Sandra M .2004. Dufour, Brett; Mench, Joy A. Comparative Medicine, American association for laboratory animal science(9): 216-224.
46. Gauche E., Hausswirth C.2006. Stress Oxydant, Complémentation Nutritionnelle En Antioxydants Et Exercice. Science & Motricité. 58: 43-66.
47. Giacomelli S., Gallo D., Apollonio P., Ferlini C., Distefano M., Morazzoni P., Riva A., Bombardelli E., Mancuso S., Scambia G. 2002. Silybin and its bioavailable phospholipid complex (Idb 1016) Potentiate in vitro and in vivo the activity of cisplatin. Life Sci, 70:1447–1459.
48. Guinard JL. 1998. Botanique 11ème ed révisée .Masson, Paris :49-152-272. 50.
49. Guittoneau G., Huon A .1983. Connaître et reconnaître la flore et la végétation méditerranéenn. Ed Ouest France: 331.
50. Gulcin I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Arch toxicol 86(3): 345-391.
51. Hadi M.2004. La Quercétine et ses dérivés: molécules A caractère pro-oxydant ou capteur deradicaux libres; Etudes et applications thérapeutiques: Chapitre I. Thèse Doctorat: 13-28.
52. . Hagerman A.E.2002. Tannin Chemistry (Www.Users.Muohio.Edu/Hagermae). institute of animal nutrition, university of hohenheim (Germany).
53. Haleng J., Pincemail J., Defraigne, J. O., Charlier C., Chapelle J. P. 2007. Le stress oxydant. revue médicale de liège. 62 : 628 – 638.
54. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine, 4 ème ed oxford university press New York: 851.
55. Hartek K.1987.DAB9:Kommentar WissensechaftlickVerlags-Gesells chaft Mbh ,Stuttgart, 187:p2226-2227.
56. Hauf M. 1989 : Les adventices d'Europe, leurs plantules, leurs semences, Ed BASF :90.
57. Hostettmann K., Potterat O.1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fragaria vesca*. Helv. Chim. Acta 80: 1144-1151.

58. Jacques B., André R. 2004. Biochimie métabolique ed ellipses .Paris: 217-219-220- 223-225.
59. Jokić S., Velić D., Bilić M., Bucić-Kojić A M..2010. Plan InićAnd S. Tomas. Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. J. Food Sci. Vol. 28: 206- 212.
60. Judde A .2004. Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications? oleagineux, Corps Gras, Lipides: 414-418.
61. Kadri A., Zarai A., Békir A et *al.*, 2011. Chemical composition and antioxidant activity of Marrubium Vulgare L essential oil from tunisia. Afr J Biotechnol 10(19): 3908–14.
62. Karkanis A., Dimitrios B., Efthimiadou A .2011.Cultivation of milk thistle (*Silybummarianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. Industrial crops and products, Volume 34, Issue 1: 825–830.
63. Karkanis A., Dimitrios B., Efthimiadou A. 2011. cultivation of milk thistle (*Silybummarianum* L. Gaertn.), A medicinal weed. Industrial crops and products, Volume 34, Issue 1: 825–830.
64. Koechlin-Ramonatxo C. 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. nutrition clinique et métabolisme. 20 : 165-177.
65. Kohno H., Tanaka T., Kawabata K., Hirose Y., Sugie S., Tsuda H., Mori H. 2002. silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane induced colon carcinogenesis in male F344 Rats. Int. J. Cancer 101: 461–468.
66. Kooppenol W.H. 2001. The Haber- Weiss Cycle, 70 years later. Redox Report: 229-234.
67. Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. & Lee C. Y. 2003.Cocoa has more phenolic phytochemi-cals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. J. Agric. Food chem 51 :7292-7295.
68. Letkessas H., Adraa I. 2017. Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits de ceratoniasiliqual,mémoire master en biochimie moléculaire et santé,université des frères mentouri constantine : 21-27-28-33-37.
69. Liu Z., Mo K., Fei S., Zu Y., Yang, L. 2017. Efficient approach for the extraction of proanthocyanidins from *Cinnamomum longepaniculatum* leaves using ultrasonic irradiation and an evaluation of their inhibition activity on digestive enzymes and antioxidant activity in vitro. Journal of separation science, 40(15):3100-3113.
70. Luper S . 1998. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. Alteranative medecine review volume ,3(6) : 410-21.
71. Martinez F. 1997. La Chromatographie de fluides en conditions supercritiques : une méthode potentiellement utile pour l'analyse des flavonolignanes. ann.Pharmaceutiques Francaises : 47- 162- 168 .
72. Mazat J.P., Ransac S. 2010. Le Complexe Bc1 de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l'hypothèse du cycle q de Mitchell. La preuve par une approche stochastique. Med Sci (Paris). 26 : 1079-86 .

73. Médart J. 2009. Manuel Pratique De Nutrition: L'alimentation préventive et curative, 2^{ème} ed, ED De Boeck Supérieur : 51 - 52.
74. Meschy F., Guenguen L. 1995. Ingestion et absorption des éléments minéraux majeurs: nutrition des ruminants domestiques ; ingestion et digestion. Ed. INRA: 721-758.
75. Mette M. 2006. Berger manipulations nutritionnelles du stress oxydant : Etat des connaissances. Nutrition clinique et métabolisme : 20-48-53.
76. Meyer ., Buchtela . 1999 . Tee-rezepturen-ein. hund buch for apotheker und frzte.
77. Mohammedi Z., Atik F. 2013. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from tamarixaphylla (L.) Karst. International journal of pharma and bio sciences ; 2 : 609-615.
78. Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical of diphenyl-1- picrylhydrazyl (dpph) for estimation antioxidant activity . Songklanakarinj. sectechnol . 26:211-219.
79. Mompon B., Lemaire P., Mengal Et M. Surbled. 1998. Extraction des polyphénols : du laboratoire a la production industrielle. Polyphenols. Ed. INRA, Paris : 289.
80. Morazzoni P., Bombardelli E. 1995. *Silybum Marianum* (Carduus Marianus). . Fitoterapia. 66 : 3-42.
81. 82. Morazzoni P., Montalbetti A., Malandrino S., Pifferi G. 1993. Comparative pharmacokinetics of silypide and silymarin in rats Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 18:289-97.
82. Moure A., Cruz J. M., Franco D., Manuel D. J., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Carlos P. 2001. Natural Antioxidants from residual sources. Food chemistry. 72(2) : 145-171.
83. Mukhopadhyay M., Sastry S.V.G.K. 1995. process for cyclic supercritical fluid CO₂ extraction of fragrances (absolute or essential oils) from jasmine flowers. Indian Patent 183454 : 72--96.
84. Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT - Food Science and Technology, 43: 992-999.
85. Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology., 33 : 2-16.
86. Ozer E. ,Platin S., Akman U., Ortascu O., Goto M .1992. Turkish J. Chem, , 16, 273. Papamichail I., Louli V., Magoulas KJ. Supercritical fluid extraction of celery seed oil. (2000). Journal of supercritical fluids, 18: 213.
87. Packer K.J. 2015. Protective role of vitamin e in biological systems, Am. J. Clin.Nutr. 53: 1050.
88. Packer L., Kraemer K., & Rimbach G. 2001. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. Nutrition. 17 (10): 888 - 895.
89. Pares A., Planas R., Torres M., Caballeria J., Viver J.M., Acero D., Panes J., Rigau J., Santos, J., Rodes J. 1998. Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. J. Hepatol. 28,615-621.

90. Park. J., Jung .W. K et *al.*,2001. "Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk." *Journal of the american oil chemists society*,78 (6): 651.
91. Pepping J.1999.Milk thistle: *Am. J Health –system. Pharm*, 56: 1195-1197.
92. Peris. JB., Stubing. G.,Figuerola. R. 1996. *Guide des plantes médicinales de la communauté de valence, Valence : Les Provinces : 127.*
93. .Pierre-André D. 2010.La silymarine dans l'intoxication aux amatoxines. *Bulletin d'information toxicologique* , 26 (2) : 1-7.
94. Poortmans J-R., Boisseau N. 2003. *Stress et exercices. In « biochimie des activités physiques ».*2em Ed. De Boeck Supérieur : 416- 417.
95. Poston L., Raijmakers M-T-M.2004. *Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome*, 18: 72-78.
96. Qavami N., Naghdibad H., Labbafi MR., Mehrafarin A. 2013.A review on pharmacological, cultivation and biotechnology aspects of milk thistle (*Silybum Marianum* (L.) Gaertn.), 12 : 20- 25-28-29-30-31.
97. Quenzel P., Santa S. 1963. *Nouvelle flore de l'algérie et des régions désertiques méridionale. Tome 2* Ed CNRS :1011.
98. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.1999.
99. Redler R. L., Dokholyan N. V. 2012. *The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Prog mol bioltranslsci.* 107: 215-262. (Afonso et *al.*, 2007).29-40
100. Ribéreau-Gayon P. 1968. *Les composés phénoliques des végétaux. Editions dunod, Paris : 254.*
101. Riché D., Didier C. *Micronutrition .2008. Santé et performance : Comprendre ce qu'est vraiment la micronutrition. De Boeck Ed : 36.*
102. Roche. C. 1991. *Milk Thistle (Silybum Marianum (L.) Gaertn.) Pacific northwest extension publication, washington state university, oregon state university and university of idaho cooperative extension: 382.*
103. Rodzko V.2000. *Abécédaire de phytothérapie :65*
104. Rolo AP., Oliveira PJ., Moreno AJ., Palmeira CM. 2003.*Protection Against Post-Ischemic Mitochondrial Injury In Rat Liver By Silymarin Or TUDC. Hepatol. Res.* 26:217– 224.
105. Roussel A M. 2009. *Qui manque d'antioxydants et comment le savoir ? cahiers de nutrition et de diététique : 7.*
106. Sahgal G., Ramanathan S., Sasidharan S., Mordi M. N., Ismail S., Mansor S. M. 2009. *In Vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic Swietenia mahagoni sed Extracts. Molecules*, 14(11): 4476-4485.
107. Saller R. 1995. *Phytotherapie. Haug, Heidelberg, 267-274.*
108. Sarni-Manchado P., Cheynier V. 2006. *Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier: 02-11.*
109. Schumann J., Prockl J., Kiemer AK., Vollmar AM., Bang R., Tiegs G. 2003. *Silibinin protects mice from t cell-dependent liver injury. J. Hepatol*,39: 333–340.

110. Seghaouil M., Zermane A. 2017. contribution a l'étude phytochimique et activités biologiques in vitro de l'espèce myrte scommunisl, Mémoire master en biochimie moléculaire et santé, université des frères mentouri Constantine :30-31-35 - 36-37-38.
111. Shimizu H. 2004. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population : the hisayama study, *Stroke*, 35 (9) : 2072.
112. Singleton V., Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.
113. Slater A.F et al., 1995. Signalling mechanism and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology letters.* 82/83: 149-153.
114. Song Z., Deaciuc I., Song M., Lee D.Y., Liu Y., Ji X., McClain C. 2006. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30: 407-413.
115. Sorg O. 2004. Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality. *Comptes rendus de l'Académie des sciences et des lettres de Paris.* 327: 649-662.
116. Stöckigt Jet al., 2002. High performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electro spray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* 967: 85-113.
117. Syed M.S., Khan A.K., Syed M.H.S., Kamran A.C., Syed M. P., Muhammad A.K. 2011. Arshad F. Evaluation of phytochemicals and antimicrobial activity of white and blue capitulum and whole plant of *Silybum Marianum*. *World applied sciences journal* ; 12 (8): 1139-1144.
118. Szila S., Szentgui D., Demeter J. 1988. Protective effect of legalon in workers exposed to organic solvents: *Acta Med Hung.*; 45(2), 249-56.
119. Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., and Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816-822
120. Touitou Y. 2006. *Biochimie : Structure des glucides et lipides université pierre et marie curie* :33.
121. Tyagi AK., Agarwal C., Chan D C., Agarwal R. 2004. Synergistic anticancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 And MDAMB468 cells. *Oncol. Rep*; 11:493-499.
122. Valko M, E et al., 2007. Free radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84.
123. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Et Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico biological interactions.* 160: 1-40.
124. Venka taramanan R. 2000. Milk thistles, an herbal supplement, decrease the activity of CY3A4 and uridine diphosphoglucosyl transferase in human hepatocyte culture. *Drug metabolism and disposition* ; 28(11) :1270-1273.
125. Villano., M.S. Fernandez-Pachon., M.L. Moya B., A.M. Troncoso., M.C. Garcia-Parrilla. 2007. *Talanta.* 71, 230-235.
126. Vinh PQ., Sugie S., Tanaka T., Hara A., Yamada Y., Katayama M., Deguchi T., Mori H. 2002. Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant Silymarin On N-Butyl-N-

- (4- Hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR Mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 93:P42–49.
127. Volak J., Stodola J. 1984. *Plantes médicinales, illustrations de frantise ksevera*, ED. ARITA Grund Paris: 319.
128. Volate S.R., Davenport D.M., Muga S.J., Wargovich M.J. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (Quercetin, Curcumin, Silymarin, Ginseng And Rutin). (2005) *Carcinogenesis*, 26 :1450–1456.
129. Wang J., Mazza G. 2002. Effect of anthocyanins and other phenolic compounds on the mproduction of tumor necrosis factors α in LPS/IFN- γ -Activated RAW.264.7. Macrophages. *J. Agric.Food.Chem.* 50:4183-4189.
130. Wang, J; Mazza, G. 2002. Effect of anthocyanins and other phenolic compounds on the mproduction of tumor necrosis Factors α in LPS/IFN- γ -Activated RAW.264.7. Macrophages. *J. Agric.Food.Chem.* 50 :4183-4189.
131. 133. Wardman P., Candeias LP. 1996. *Fenton Chemistry: an introduction*. *Radiat Res.* 145 (5): 523-531.
132. Widmer N. 1999. *Carduimariae fructus dosage des flavonolignanes*.
133. Winston R., Hansen R., Schwarzländer M., Coombs E., Bell Randall C., Lym R. 2008. *Biology and biological control of exotic thistles*. edition federal recycling program , 2-112.
134. Zi X., Mukhtar H., Agarwal R. 1997. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant Silymarin: Inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter tnf alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*:239-334–339.

Sites internet :

1. www.plants.usda.gov, consulté le 27/05/2021
2. www.alchemy-works.com, consulté le 04/06/2021
3. www.discoverlife.org, consulté le 12/06/2021
4. www.themediteckwellnessgateway.com, consulté le 21/06/2021
5. www.freeflowerpictures.net, consulté le 01/07/2021
6. www.sciencephoto.com, consulté le 16/08/2021
7. <http://www.omicsonline.org/>, consulté le 23/08/2021

Annexes

Annexe 1

Courbes d'étalonnage

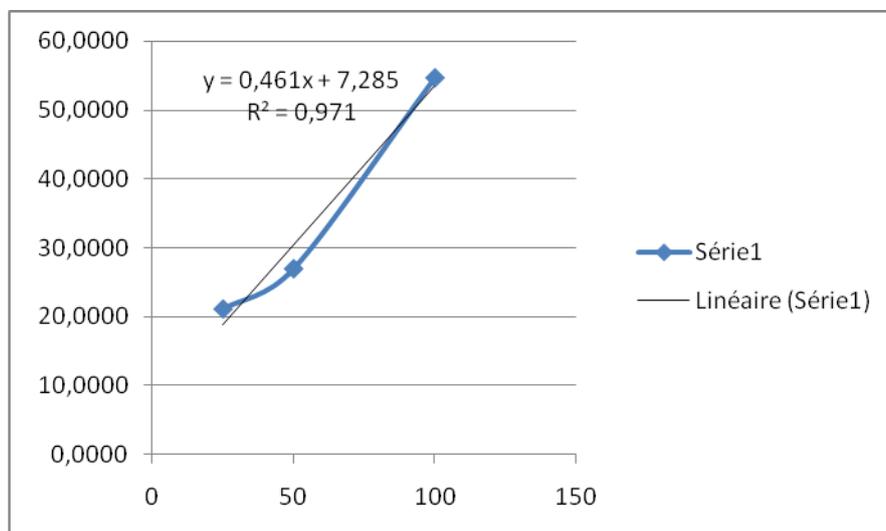


Figure .24. Courbe d'étalonnage d'IC₅₀ d'extraits de *Silybum marianum*.

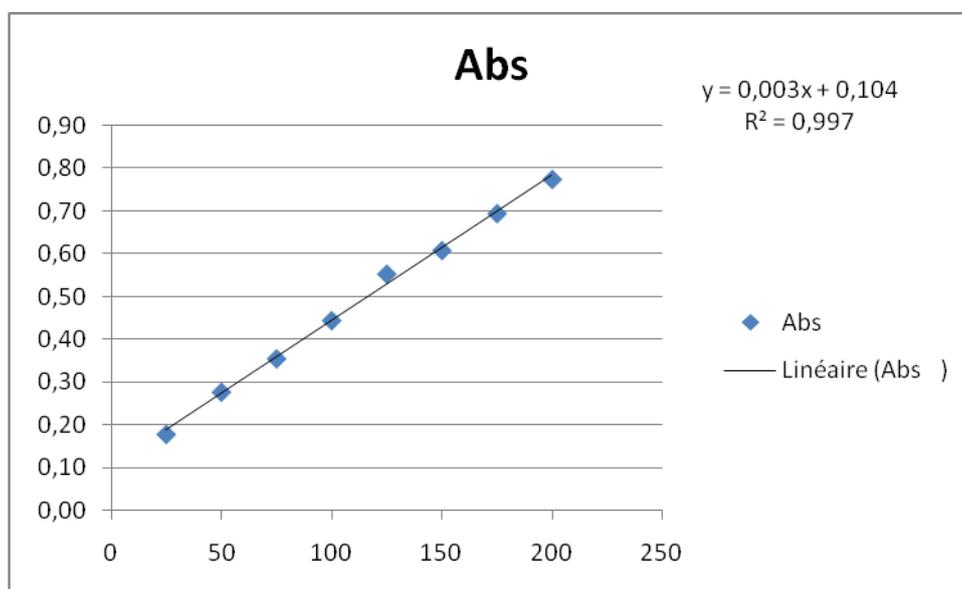


Figure .25. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Moy. ± ET de trois essais).

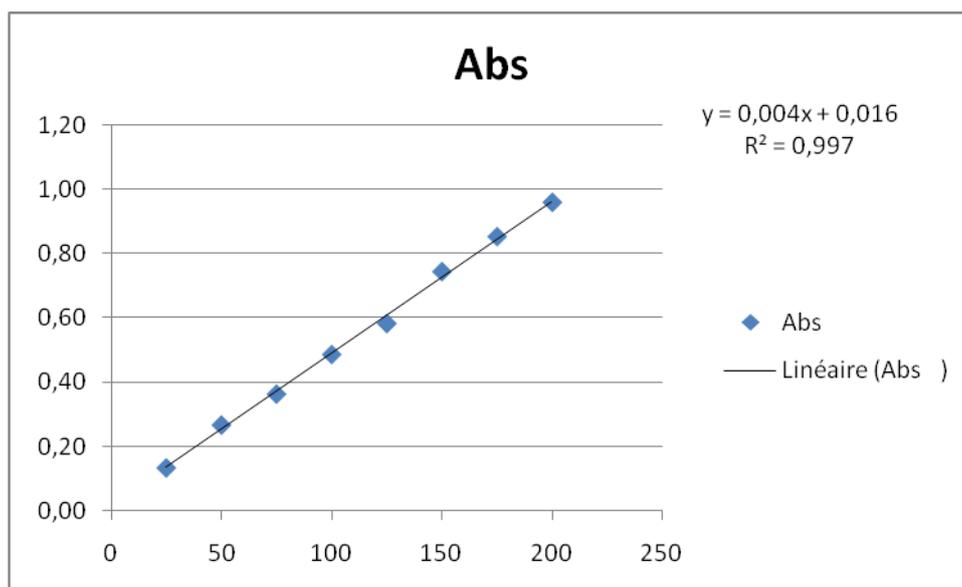


Figure.26. Courbe d'étalonnage de la quercétine (Moy.± ET de trois essais).

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. Elles ont été évaluées, *in vitro*, pour leurs activités antioxydantes et leurs teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes. Pour la présente étude, quatre extraits (éthanolique (EE), butanolique (EB), acétate d'éthyle (EAE) et dichlorométhane (ED)) ont été préparés, à partir de la partie aérienne de la plante médicinale *Silybum marianum*. Le pouvoir antioxydant a été réalisé en utilisant les tests de piégeage radicalux libres, DPPH et ABTS, et le test CUPRAC. Les polyphénols totaux et les flavonoïdes ont été dosés par des méthodes spectrophotométriques.

Les résultats ont révélé que les rendements d'extraction varient selon le solvant utilisé, ils sont compris entre 12,17% et 20,5 %. Les CI_{50} varient de $576,82 \pm 3,43 \mu\text{g/mL}$ à $42,5 \pm 1,51 \mu\text{g/mL}$ avec le DPPH, dont l'extrait acétate d'éthyle de *Silybum marianum* a été le plus actif ($CI_{50} = 42,50 \pm 1,51 \mu\text{g/mL}$) que les autres extraits. Pour le test avec L'ABTS, les CI_{50} sont comprises entre $142,67 \pm 1,85 \mu\text{g/mL}$ et $12,56 \pm 1,19 \mu\text{g/mL}$, et l'extrait de dichlorométhane était le meilleur piègeur de ce radical avec une IC_{50} de $12,56 \pm 1,19 \mu\text{g/mL}$. Concernant le test CUPRAC, les extraits ont montré une activité comprise entre $31,25 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$ et $437,78 \pm 5,36 \mu\text{g/mL}$, où l'extrait acétate d'éthyle et dichlorométhane des $A_{0.5}$ les plus faible ($31,75 \pm 0,45$ et $31,25 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$, respectivement), et par conséquent, les activités antioxydantes les plus importantes. La quantification des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode $AlCl_3$ a donné des valeurs élevées dans l'extrait acétate d'éthyle, où la valeur la plus élevée est estimée par : $266,45 \pm 3,88 \text{ mg/g}$ et $229,18 \pm 5,91 \text{ mg/g}$. Ces résultats prouvent que *Silybum marianum* est très riche en différents composés phénoliques et présente une bonne activité antioxydante. Elle pourrait être utilisée dans le domaine pharmaceutique comme une source potentielle des molécules bioactifs ayant des propriétés antioxydantes.

Mots clés : activité antioxydante, radicaux libres, teneur en polyphénols, teneur en flavonoïdes, *Silybum marianum*.

Summary

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. They have been evaluated, in vitro, for their antioxidant activities and their total polyphenol and flavonoid content. For the present study, four extracts (ethanolic (EE), butanol (EB), ethyl acetate (EAE) and dichloromethane (ED) were prepared from the aerial part of the medicinal plant *Silybum marianum*. Antioxidant power was achieved using the free radical scavenging tests, DPPH and ABTS, and the CUPRAC test. Total polyphenols and flavonoids were determined by spectrophotometric methods.

The results revealed that the extraction yields vary depending on the solvent used, they are between 12,17% and 20,5%. The IC_{50} vary from $576,82 \pm 3,43 \mu\text{g} / \text{mL}$ to $42,5 \pm 1,51 \mu\text{g} / \text{mL}$ with DPPH, of which the ethyl acetate extract of *Silybum marianum* was the most active ($IC_{50} = 42,50 \pm 1,51 \mu\text{g} / \text{mL}$) than other extracts. For the test with ABTS, the IC_{50} are between $142,67 \pm 1,85 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $12,56 \pm 1,19 \mu\text{g} / \text{mL}$, and the dichloromethane extract was the best scavenger of this radical with an IC_{50} of $12,56 \pm 1,19 \mu\text{g} / \text{mL}$. Regarding the CUPRAC test, the extracts showed an activity of between $31,25 \pm 1,38 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $437,78 \pm 5,36 \mu\text{g} / \text{mL}$, where the ethyl acetate and dichloromethane extract of $A_{0,5}$ the lowest ($31,75 \pm 0,45$ and $31,25 \pm 1,38 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectively), and therefore, the most important antioxidant activities. The quantification of total phenols by the Folin-Ciocalteu method and of flavonoids by the $AlCl_3$ method gave high values in the ethyl acetate extract, where the highest value is estimated by: $266,45 \pm 3,88 \text{ mg} / \text{g}$ and $229,18 \pm 5,91 \text{ mg} / \text{g}$. These results prove that *Silybum marianum* is very rich in different phenolic compounds and exhibits good antioxidant activity. It could be used in the pharmaceutical field as a potential source of bioactive molecules with antioxidant properties.

Keywords: Antioxidant activity, free radicals, polyphenol content, flavonoid content, *Silybum marianum*.

الملخص

شوك الحليب هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة الأزهار الشوكية ، الأكثر استخدامًا في جميع أنحاء العالم ، لغناه بالمواد النشطة بيولوجيًا. تم تقييمها ، في المختبر ، لأنشطتها المضادة للأكسدة ومحتواها الكلي من البوليفينول والفلافونويد. في هذه الدراسة ، تم تحضير أربعة مستخلصات (الإيثانول (EE) ، البوتانول (EB) ، أسيتات الإيثيل (EAE) وثنائي كلورو ميثان (ED)) من الجزء الجوي للنبات الطبي شوك الحليب. تم الحصول على الطاقة المضادة للأكسدة باستخدام اختبارات مسح الجذور الحرة ، DPPH و ABTS ، واختبار CUPRAC. تم تحديد مجموع البوليفينول والفلافونويد بالطرق الطيفية. أوضحت النتائج أن إنتاجية الاستخلاص تختلف باختلاف المذيب المستخدم حيث تراوحت بين 12,17% و 20,5%. تختلف IC50s من 3,43 ± 576,82 ميكروغرام / مل إلى 1,51 ± 42,5 ميكروغرام / مل مع DPPH ، والتي كان مستخلص أسيتات الإيثيل من شوك الحليب هو الأكثر نشاطًا (IC = 42,50 ± 1,51 ميكروغرام / مل) من المستخلصات الأخرى. بالنسبة للاختبار باستخدام ABTS ، تتراوح قيم التركيز المثبط 50% بين 1,85 ± 142,67 ميكروغرام / مل و 1,19 ± 12,56 ميكروغرام / مل ، وكان مستخلص ثنائي كلورو ميثان أفضل كاسح لهذا الراديكالي مع IC50 من 12 ، 1,19 ± 56 ميكروغرام / مل. فيما يتعلق باختبار CUPRAC ، أظهرت المستخلصات نشاطًا يتراوح بين 1,38 ± 31,25 ميكروغرام / مل و 5,36 ± 437,78 ميكروغرام / مل ، حيث يكون مستخلص أسيتات الإيثيل وثنائي كلورو ميثان A0,5 أدنى (0,45 ± 31,75 و 1,38 ± 31,25 ميكروغرام / مل) ، على التوالي) ، وبالتالي أهم الأنشطة المضادة للأكسدة. أعطى التقدير الكمي لمجموع الفينولات بطريقة الفولان والفلافونويد بطريقة ثلاثي الكلور يوم: قيمًا عالية في مستخلص أسيتات الإيثيل ، حيث تقدر أعلى قيمة بـ: 3,88 ± 266,45 مجم / جم و 229,18 ± 5,91 مجم / جم . تثبت هذه النتائج أن نبات شوك الحليب غني جدًا بالمركبات الفينولية المختلفة ويظهر نشاطًا جيدًا مضادًا للأكسدة. يمكن استخدامه في المجال الصيدلاني كمصدر محتمل للجزيئات النشطة بيولوجيًا ذات الخصائص المضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للأكسدة، الجذور الحرة، مستوى البوليفينول، مستوى الفلافونويد، شوك الحليب.