



Département : Microbiologie

قسم : علم الأحياء الدقيقة

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques / Biotechnologies / Écologie et Environnement

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique (MBF)

N° d'ordre :/2025

N° de série :.....

Intitulé :

Screening phytochimique & évaluation des activités biologiques d'une plante médicinale du genre *Silybum*

Présenté par :

Le : 25/06/2025

- DIF Roufeida

Sous la direction de : Dr. ALIOUCHE Lamia

Jury d'évaluation :

Dr. MEZIANI Meriem (MCA) Université des Frères Mentouri, Constantine1

Présidente

Dr. ALIOUCHE Lamia (MCA) Université des Frères Mentouri, Constantine1

Encadrante

Dr. ZATER Hanène (MCA) Université Larbi Ben M'Hidi ,Oum El Bouaghi

Examinateuse

**Année universitaire
2024 - 2025**

Remerciement

J'exprime ma profonde reconnaissance à ***ALLAH*** le Tout-Puissant pour Sa guidance, Sa force, ainsi que la santé et la volonté qu'Il m'a accordé, et grâce auxquelles j'ai pu entreprendre et mener à bien ce mémoire.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme ***Alioucha Lamia*** pour son encadrement précieux. Ce travail n'aurait jamais atteint cette qualité sans son accompagnement attentif, sa patience, sa rigueur et sa constante disponibilité tout au long de mon parcours.

Son soutien et ses encouragements ont été d'une grande valeur.

Je tiens à dédier ce travail aux membres éminents du jury, **Mme Meziani Meriem, Mme Aliouche Lamia, et Mme Zater Hanène**, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'évaluer ce mémoire. Votre engagement, votre rigueur scientifique et votre bienveillance incarnent les valeurs académiques que j'admire profondément.

Merci de consacrer de votre temps à la lecture et à l'appréciation de ce modeste travail, fruit de plusieurs mois

d'efforts et de passion. Votre présence et vos remarques seront, sans nul doute, une source d'enrichissement et de motivation dans mon parcours scientifique et personnel.

Mes remerciements s'étendent à l'ensemble des enseignants et au personnel de l'université, pour leur bienveillance et leur contribution à ma formation scientifique,

ainsi qu'aux à tous les techniciens et les responsables des **Centre de Recherche en Biotechnologie** (CRBT).

J'adresse enfin une gratitude particulière à *Pr. Ramdane Seghiri*, directeur de recherche, pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer mes manipulations au sein de son laboratoire.

Dédicace

Je tiens de dédier ce travail

A mes Parents grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux.

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi,

A mes Grands Parents, ma Soeur Rayene

Mon frère Haider, mes Amis

A ceux qui n'ont jamais cessé de nous encourager et de nous motiver
Et à tous ceux qui ont une relation de proche ou de loin Avec la
réalisation du présent mémoire

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| <i>Introduction</i> | 1 |
| <i>Chapitre1 : Étude de la plante</i> | 3 |
| <i>1.Étude de la plante</i> | 3 |
| <i>1.1 Les plantes médicinales</i> | 3 |
| <i>1.2 Famille des Asteraceae.....</i> | 3 |
| <i>1.3Le genre Silybum.....</i> | 5 |
| <i>2.2 Classification des métabolites secondaires</i> | 8 |
| <i>3. Screening phytochimique</i> | 10 |
| <i>4.Les activités biologiques</i> | 10 |
| <i>4.1. Activité antioxydante</i> | 10 |
| <i>4.2. Activité antibactérienne.....</i> | 10 |
| <i>ChapitreII Partie expérimentale</i> | 12 |
| <i>1.Travaux antérieurs.....</i> | 12 |
| <i>1.1. Préparation du matériel végétal</i> | 12 |
| <i>1.2 Extraction</i> | 12 |
| <i>2.Les tests préliminaires du screening phytochimique.....</i> | 12 |
| <i>2.1 .Les flavonoïdes</i> | 12 |
| <i>2.2. Les terpènes</i> | 13 |
| <i>2.3. Les alcaloïdes.....</i> | 13 |
| <i>2.4. Les saponosides.....</i> | 13 |
| <i>2.5. Les tanins</i> | 14 |
| <i>2.6.Les composés réducteurs (Les sucres)</i> | 14 |
| <i>2.7.Les anthraquinones.....</i> | 14 |
| <i>2.8.Les stérols</i> | 15 |
| <i>2.9. Les protéines</i> | 15 |
| <i>3.Analyse quantitative</i> | 16 |
| <i>3.1.Dosage des flavonoïdes totaux.....</i> | 16 |
| <i>4. L'activité antioxydante.....</i> | 16 |
| <i>4.1.La méthode du test DPPH</i> | 16 |
| <i>4.2. La méthode de test ABTS</i> | 18 |
| <i>4.3. La méthode de test FRAP.....</i> | 19 |
| <i>5. La méthode de test Alpha amylase</i> | 20 |

| | |
|---|-----------|
| <i>5.1. Principe de la réaction</i> | 20 |
| <i>5.2 Protocol</i> | 20 |
| <i>Chapitre III : Résultats et discussions</i> | 23 |
| <i>1.Résultats du screening phytochimique</i> | 23 |
| <i>2. Résultats des analyses quantitatives</i> | 29 |
| <i>3.Résultats des activités antioxydante</i> | 30 |
| <i>3.1. Résultats du test DPPH</i> | 30 |
| <i>3.2. Résultats du test ABTS</i> | 31 |
| <i>4.Résultats des activités antibactériennes</i> | 34 |
| <i>Conclusion</i> | 38 |
| <i>Références</i> | 41 |

Liste de figures :

| | |
|--|----|
| Figure 01:Exemples des plantes de la famille Asteraceae. | 4 |
| Figure 02: Trois plantes du genre <i>Silybum</i> . | 5 |
| Figure 03: la morphologie des feuilles et des fleurs du <i>Silybum Marianum</i> . | 7 |
| Figure 04 : Distribution mondiale de <i>Silybum Marianum</i> . | 7 |
| Figure 05 :Les différentes classes de flavonoïdes. | 9 |
| Figure 06: Réaction de réduction du radical DPPH• par un antioxydant | 17 |
| Figure 07 :Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant | 18 |
| Figure 08: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique | 19 |
| Figure 09 :Réactions de fonctionnalisation chimique de l'amidon. | 21 |
| Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la quercétine. | 29 |
| Figure 11 : Histogramme représente la quantité en (μg) des flavonoïdes dans les trois extraits. | 29 |
| Figure 12: Courbe représentative du pouvoir d'inhibition des trois extraits par le test DPPH. | 31 |
| Figure 13 : Courbe représentative du pouvoir d'inhibition des trois extraits par le test ABTS. | 32 |
| Figure 14:L'effet des trois extraits (CHCl ₃ ,AcOEt, <i>n</i> -BuOH) sur la souche bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> . | 35 |
| Figure 15: L'effet des trois extraits (CHCl ₃ ,AcOEt, <i>n</i> -BuOH) sur la souche bactérienne <i>Escherichia coli</i> . | 35 |
| Figure 16: L'effet de l'amoxicilline sur les deux souches testées (<i>S.aureus</i> , <i>E. coli</i>) . | 36 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01 : Les classifications taxonomiques de genre <i>Silybum</i> (Royal Botanic Gardens, Kew, 2024) | 6 |
| Tableau 02: Résultats du screening phytochimique de la phase chloroformique. | 23 |
| Tableau 03: Résultats du screening chimique de la phase acéate d'éthyle. | 25 |
| Tableau 04: Résultats du screening chimique de la phase butanolique. | 27 |
| Tableau 05: Résultats du dosage des flavonoïdes. | 29 |
| Tableau 06: Inhibition du radical DPPH par les extraits CHCl ₃ , AcOEt, <i>n</i> -BuOH | 30 |
| Tableau 07 : Inhibition du cation ABTS ⁺ par les extraits CHCl ₃ , AcOEt, <i>n</i> -BuOH | 32 |
| Tableau 08 : Résultats des A _{0.50} des extraits obtenus avec le test FRAP. | 33 |
| Tableau 09: Résultats des IC ₅₀ des extraits et standards obtenus avec le test alpha amylase. | 34 |
| Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition indiquant l'activité antibactérienne des trois extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> | 35 |

Liste d'abréviation

Pb(OAc)4: Tétra acétate de plomb.

CHCl₃: Extrait de chloroforme.

AcOEt: Extrait d'acétate d'éthyle.

n-BuOH: Extrait de butanol.

FCR: Folin Ciocalteu.

Na₂CO₃: Le carbonate de sodium

NaNO₂: Le nitrite de sodium.

AlCl₃: Chlorure d'aluminium.

NaOH: Hydroxyde de sodium.

DPPH: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.

ABTS: L'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

K₂S₂O₈: Persulfate de potassium.

FeCl₃: Chlorure de fer.

Fe²⁺: Les ions ferreux

***E.coli*:** *Escherichia coli*.

***S.aureus*:** *Staphylococcus aureus*.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

IC₅₀: Concentration inhibitrice médiane.

BHA: Butyl Hydroxy Anisole.

BHT: Butyl Hydroxy Toluène

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

TPTZ: 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine

IKI: Iodine Potassium Iodide solution (solution d'iodure/iode)

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans le système thérapeutique humain. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 65 à 80% de la population mondiale dans les pays en développement manque d'accès à la médecine moderne à cause de la pauvreté et dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire. Malgré les avancées significatives en chimie organique de synthèse au cours du vingtième siècle, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays industrialisés trouvent leurs origines, qu'elles soient immédiates ou dérivées, dans les plantes. (Newman et al., 2000 ; Calixto, 2005).

Les constituants bioactifs essentiels des plantes médicinales incluent les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes, les anthraquinones et les composés phénoliques.

Ces substances jouent un rôle crucial dans les propriétés thérapeutiques des plantes et sont largement étudiées pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. (Liu et al., 2011).

Dans ce contexte notre thème de recherche s'insère dans le cadre du programme de recherche lancé par l'unité de recherche VARENBIOMOL, sur les plantes médicinales, et porté sur une contribution à l'étude phytochimique d'une plante saharienne de la famille des Astéracées. L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de cette plante en principes actifs et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude englobera deux aspects : le premier d'ordre phytochimique sera basé principalement sur la teneur de composés polyphénoliques présente dans les trois extraits (CHCl_3 , EtOAc , $n\text{-BuOH}$) de cette plante et le second sera consacré à une évaluation des activités biologiques : activité antioxydante et antibactérienne dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des trois extraits.

Le mémoire est structuré en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique sur les généralités de la famille des asteraceae, suivie d'un aperçu bibliographique de métabolites secondaires et de l'activité antioxydante et antibactérienne. Le deuxième chapitre est consacré aux travaux expérimentaux, il renferme les travaux relatifs à l'extraction de la matière végétale, au screening phytochimique des trois extraits ; chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique. De plus leurs activités biologiques en passant par le dosage des flavonoïdes totaux. Le troisième chapitre comporte l'interprétation des résultats obtenus et en dernier une conclusion générale.

Aperçu bibliographique

ChapitreI : Étude de la plante

1.Étude de la plante

1.1 Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des organismes végétaux riches en composés bioactifs, utilisés depuis l'Antiquité pour prévenir, soulager ou traiter diverses affections humaines et animales. Elles peuvent être administrées sous différentes formes galéniques telles que les infusions, décoctions, poudres, extraits ou huiles essentielles, et sont traditionnellement employées dans le traitement des troubles digestifs, respiratoires, inflammatoires ou nerveux (WHO, 2002 ; Fabricant & Farnsworth, 2001). En plus de leurs effets curatifs, ces plantes jouent un rôle dans la prévention en renforçant le système immunitaire, en apaisant le stress, en améliorant la qualité du sommeil, et sont également utilisées dans la formulation de produits cosmétiques et de compléments alimentaires, contribuant ainsi au bien-être général (Liu, 2013).

De nombreux principes actifs isolés à partir de plantes médicinales ont servi de base à la découverte de médicaments modernes, illustrant leur rôle fondamental en pharmacologie (Newman et al., 2003). Face aux effets indésirables associés aux traitements de synthèse et à l'émergence croissante de résistances antimicrobiennes, l'intérêt pour les solutions thérapeutiques naturelles ne cesse de croître. L'étude scientifique de ces plantes permet non seulement d'identifier de nouveaux composés bioactifs, mais aussi de valoriser les savoirs traditionnels dans un cadre rigoureux, en assurant leur sécurité d'utilisation et leur potentiel thérapeutique (Calixto, 2005).

1.2 Famille des Asteraceae

1.2.1.Présentation de la famille Asteraceae

La famille des Asteraceae, représente l'une des plus vastes et anciennes familles de plantes à fleurs (angiospermes). Son origine est estimée entre 80 et 90 millions d'années, avec une probable émergence en Amérique du Sud, avant de se disperser sur l'ensemble des continents, à l'exception de l'Antarctique, grâce à une remarquable capacité d'adaptation écologique (Mandel et al., 2019 ; Barreda et al., 2015). Cette aptitude à coloniser divers habitats a favorisé sa diversification, en faisant aujourd'hui l'une des familles les plus riches en espèces, avec plus de 1 600 genres et environ 25 000 à 30 000 espèces (Funk et al., 2009).

Le nom « Asteraceae » dérive du genre *Aster*, du grec *aster* signifiant « étoile », en référence à l'aspect étoilé des capitules floraux, caractéristique distinctive de cette famille. L'étude botanique de ce groupe a été initiée dès le XVIII^e siècle, notamment par Carl von Linné, qui en posa les premières bases taxonomiques, puis approfondie par des botanistes tels

qu'Alexandre de Cassini, qui joua un rôle majeur dans la classification des genres et espèces au sein de cette famille (Bremer, 1994 ; Heywood et al., 2007).

Les caractères botaniques de la famille Asteraceae

La famille des Asteraceae, également appelée Compositae, se caractérise par des traits botaniques distinctifs qui la rendent facilement identifiable. Elle comprend essentiellement des plantes herbacées, bien que certains représentants soient des arbustes ou des arbres (Judd et al., 2016). Les feuilles sont généralement simples, alternes et dépourvues de stipules (Mabberley, 2017). L'inflorescence typique est le capitule, formé de fleurons très petits insérés sur un réceptacle commun, et entouré d'un involucre de bractées (Cronquist, 1981). Les fleurs sont souvent hermaphrodites, avec une corolle gamopétale à cinq lobes, cinq étamines soudées entre elles par les anthères (syngénésie), et un style bifide (Heywood & Humphries, 1997). Le fruit est un akène, fréquemment surmonté d'un pappus constitué de poils ou d'écaillles, facilitant sa dispersion anémophile (Mabberley, 2017).



Figure 01: Exemples des plantes de la famille Asteraceae.

Intérêt nutritionnel, économique et pharmacologique de la famille Asteraceae

La famille des Asteraceae revêt une importance considérable dans plusieurs domaines, notamment nutritionnel, économique et pharmacologique. Sur le plan nutritionnel, elle regroupe des espèces largement consommées à travers le monde, telles que la laitue (*Lactuca sativa*), l'artichaut (*Cynarascolymus*) ou encore le pissenlit (*Taraxacum officinale*), appréciées pour leur richesse en fibres, vitamines, antioxydants et minéraux (Mabberley, 2017). Du point de vue économique, certaines espèces comme le tournesol (*Helianthusannuus*) sont cultivées à grande échelle pour la production d'huile alimentaire et de biocarburants, tandis que d'autres, comme les *chrysanthèmes*, sont valorisées dans le secteur de l'horticulture ornementale (Heywood & Humphries, 1997). En pharmacologie, de nombreuses plantes de cette famille, telles que la camomille (*Matricariachamomilla*) ou l'échinacée (*Echinacea purpurea*), sont utilisées pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antispasmodiques et immunostimulantes, en raison de leur richesse en

composés bioactifs comme les flavonoïdes, les sesquiterpènes lactoniques et les huiles essentielles (Judd et al., 2016 ; Cronquist, 1981). Ainsi, les Asteraceae constituent une ressource précieuse pour l'alimentation, la médecine naturelle et l'économie agricole.

1.3 Le genre *Silybum*

Présentation du genre

Le genre *Silybum* fait partie de la famille botanique des Asteraceae, connue pour ses inflorescences en capitules et sa grande diversité florale (Funk et al., 2005). Il regroupe des plantes herbacées épineuses, généralement bisannuelles, qui prospèrent dans des climats tempérés à méditerranéens (Mabberley, 2017). Ce genre est caractérisé par des feuilles alternes, souvent marbrées de blanc, bordées d'épines, et des fleurs tubulées regroupées en capitules entourés de bractées rigides et piquantes (Le Floc'h et al., 2010).

Exemples de plantes médicinales du genre *Silybum*

Silybum marianum (L.) Gaertn. — *Chardon-Marie* c'est l'espèce la plus connue du genre *Silybum*. Elle est largement utilisée en phytothérapie pour ses propriétés hépatoprotectrices, principalement grâce à son composé actif : la silymarine. Cette substance est un complexe de flavonolignanes aux effets antioxydants et anti-inflammatoires, utilisés notamment dans le traitement des troubles hépatiques (Křen & Walterová, 2005 ; Abenavoli et al., 2010).

Silybum eburneum Coss. & Durieu *Silybum eburneum* est une espèce originaire d'Afrique du Nord, notamment d'Algérie et du Maroc. Elle est parfois considérée comme une variante ou sous-espèce de *S. marianum* par certains auteurs. Elle partage des propriétés médicinales similaires, bien que moins étudiée (Pottier-Alapetite, 1981 ; Quézel & Santa, 1963).



Figure 02: Trois plantes du genre *Silybum*.

.Classification taxonomique

Tableau 01 : Les classifications taxonomiques de genre *Silybum* (Royal Botanic Gardens, Kew, 2024)

| | |
|----------------|-------------------------|
| Règne | Plantae |
| Sous-règne | Tracheobionta |
| Super-division | Angiospermae |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Sous-classe | Asteridae |
| Ordre | Asterales |
| Famille | Asteraceae (compositae) |
| Sous-famille | Carduoideae |
| Tribu | Cynareae (ou Cardueae) |
| Genre | <i>Silybum</i> |

.Description morphologique du genre *Silybum*

Le genre *Silybum*, appartenant à la famille des Asteraceae, regroupe des plantes herbacées épineuses, généralement bisannuelles, pouvant atteindre jusqu'à 1,5 à 2 mètres de hauteur (Le Floc'h et al., 2010 ; Wichtl, 2004). La tige est érigée, robuste, ramifiée, et souvent légèrement cannelée.

Les feuilles sont alternes, grandes, marbrées de blanc, avec des bords épineux. Elles sont sessiles à embrassantes, surtout les feuilles supérieures, tandis que les feuilles basales sont généralement pétiolées (Pignatti, 1982).

Le fruit est un akène oblong, de couleur brun-noir, surmonté d'un pappus soyeux facilitant la dissémination par le vent. Les graines, appelées improprement "fruits", sont les parties les plus exploitées en phytothérapie, riches en flavonolignanes (Křen & Walterová, 2005).



Figure03: la Morphologie des feuilles et des fleurs du *Silybum marianum*.

.Localisation et répartition géographique du genre *silybum*

Le silybum est d'origine des régions méditerranéennes, notamment : Europe du Sud : (Espagne, Italie, Grèce), Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie) et l'Asie de l'Ouest : (Turquie, Syrie, Liban).

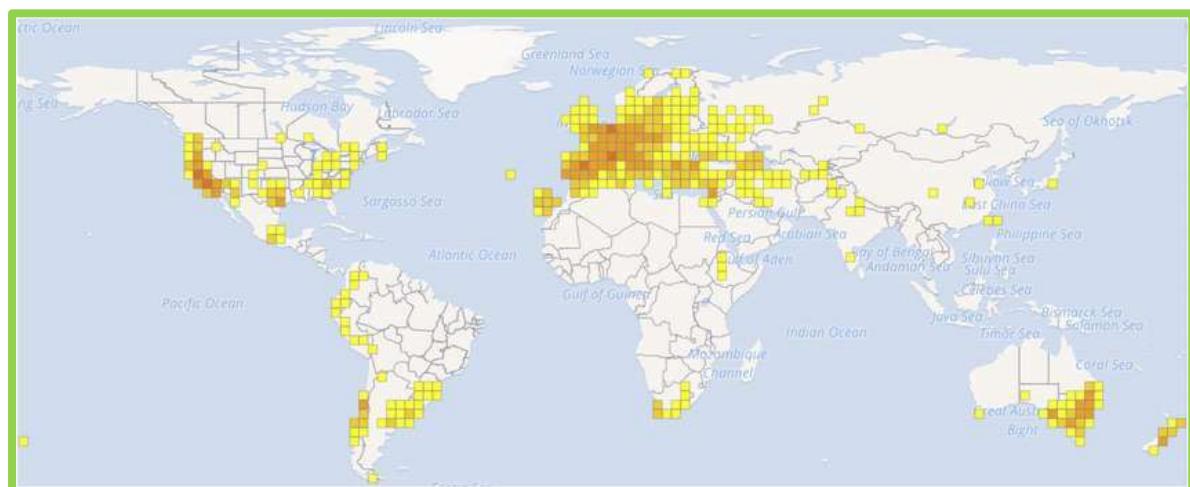


Figure 04 : Distribution mondiale de *Silybum marianum*.

2. Les Métabolites Secondaires

2.1 Généralités sur les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des substances naturelles produites par les plantes, distinctes des métabolites primaires tels que les protéines, les glucides et les lipides, indispensables aux fonctions vitales. Leur présence varie selon les espèces végétales et ils sont étroitement liés aux interactions écologiques des plantes avec leur environnement biotique. Ces composés jouent un rôle clé dans l'adaptation évolutive des plantes, en intervenant dans les mécanismes de défense

contre les parasites, les agents pathogènes, les prédateurs, mais aussi dans les relations mutualistes avec les polliniseurs et les agents de dissémination. Cette diversité fonctionnelle a conduit à une large spécialisation chimique au sein du règne végétal (Krief, 2003).

2.2 Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont classés en trois grandes familles : les composés phénoliques, les terpènes, et les composés azotés tels que les alcaloïdes, chacun regroupant une grande variété de structures et d'activités biologiques. (Krief, 2003).

Les composés phénoliques Les composés phénoliques représentent une vaste classe de métabolites secondaires présents dans une grande diversité d'aliments d'origine végétale tels que les fruits, les légumes, les céréales complètes, ainsi que dans les boissons comme le thé, le café et le vin rouge (Manach et al., 2004). Ils jouent un rôle crucial dans la défense des plantes contre les stress biotiques et abiotiques, notamment grâce à leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Bravo, 1998).

Parmi les composés phénoliques simples, on retrouve les acides hydroxybenzoïques (comme l'acide gallique) et les acides cinnamiques (comme l'acide férulique), souvent issus de la dégradation des tissus végétaux (Robbins, 2003). Leur structure chimique est fondée sur un noyau aromatique (noyau benzénique) portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (-OH), pouvant être libres ou engagés dans des liaisons ester ou éther (Dai&Mumper, 2010).

Les alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent une classe importante de métabolites secondaires azotés, largement étudiée pour leurs propriétés pharmacologiques. Issus principalement de plantes médicinales, ils représentent une source précieuse de molécules bioactives utilisées dans la recherche et le développement de nouveaux médicaments (Cordell, 2017). Plusieurs alcaloïdes ont démontré des activités antiprolifératives et anticancéreuses significatives, notamment contre des cellules tumorales humaines. Parmi les plus connus, on peut citer la vinblastine, la vincristine, la vinorelbine et la vindésine, extraites de *Catharanthus roseus*, qui sont actuellement utilisées en chimiothérapie pour traiter des cancers tels que la leucémie, le lymphome et le cancer du sein (Cragg & Pezzuto, 2016).

2.2.4 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés organiques de faible poids moléculaire, constitués de quinze atomes de carbone répartis selon un schéma C6–C3–C6. Leur structure comprend principalement deux cycles aromatiques, notés A et B, reliés par une chaîne de trois atomes de carbone formant généralement un hétérocycle C. Le cycle A dérive de la voie biosynthétique acéate/malonate, tandis que le cycle B provient de la voie du shikimate, à partir de la phénylalanine. La diversité des flavonoïdes s'explique par les variations de substitution du cycle C, donnant naissance aux principales classes telles que les flavonols, flavones, flavanones et flavanols (Balasundram et al., 2006) (figure 5).

Ces composés jouent un rôle fondamental dans la physiologie végétale et les interactions plantes-environnement. Ils interviennent notamment dans la coloration florale et la séduction des polliniseurs, tout en agissant comme répulsifs contre certains insectes grâce à leur odeur. Sur le plan médical, les flavonoïdes sont largement étudiés pour leurs propriétés antioxydantes, capables d'inhiber la formation de radicaux libres. Leur potentiel thérapeutique inclut également des effets antiviraux, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anticancéreux, ce qui renforce leur valeur dans les recherches pharmacologiques actuelles (Marfak, 2003).

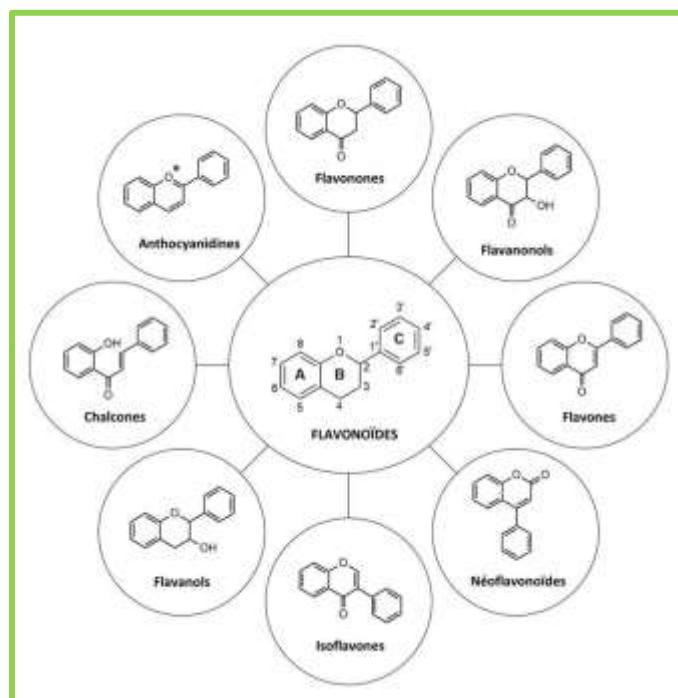


Figure 05 :Les différentes classes de flavonoïdes.

3. Screening phytochimique

Ce sont des analyses qualitatives qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal et elles sont des réactions physicochimiques qui permettent de définir la présence ou non des métabolites secondaires: (Alcaloïdes, Tanins, Stéroïdes, flavonoïdes, sucres, anthraquinones, terpenoïdes, protéines...).

4.Les activités biologiques

4.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante est définie « comme une limitation de l'oxydation des protéines, des lipides, de l'ADN ou d'autres molécules qui se produit en bloquant l'étape de propagation dans les réactions en chaîne oxydatives » et les antioxydants primaires éliminent directement les radicaux libres, tandis que les antioxydants secondaires empêchent indirectement la formation de radicaux libres. Pour évaluer cette efficacité, plusieurs tests sont utilisés, dont les plus importants sont : DPPH, ABTS ou FRAP (FerricReducingAntioxidant Power (Gazák et al., 2007).

4.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne se définit comme la capacité d'une substance à inhiber la croissance, empêcher la multiplication ou détruire des bactéries pathogènes. Elle est essentielle dans la lutte contre les infections bactériennes et constitue une piste importante dans le développement de nouveaux traitements, notamment face à l'émergence des résistances aux antibiotiques (Gould, 2016).

Plusieurs études ont montré qu'elles diverses plantes du genre *Silybum* sont capables d'inhiber la croissance de bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) et Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), en perturbant la perméabilité des membranes cellulaires bactériennes et en altérant le métabolisme microbien (Saller et al., 2001 ; Kooti et al., 2017).

Partie expérimentale

Chapitre II Partie expérimentale

Nos études photochimiques et biologiques ont été réalisées au niveau de l'unité de recherche *VARENBIOMOL* et le Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT).

1. Travaux antérieurs

La récolte et le séchage de la plante ont été réalisés antérieurement par Dr. Aliouche Lamia.

1.1. Préparation du matériel végétal

La plante a été récoltée dans la région d'Ouargla au mois de mai 2024. Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de cette plante ont été séchées dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires et l'humidité puis bien broyées et pesées (250g).

1.2 Extraction

Les parties aériennes (250 g) ont été mises à macérer dans un mélange éthanol /eau (7:3) pendant 24 heures, cette opération est répétée trois fois avec renouvellement de solvant. Après concentration à une température n'excédant pas 38°C, nous avons obtenu un extrait brut qui est dilué avec de l'eau distillée. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation après l'ajout du tétra acétate de plomb $Pb(OAc)_4$, cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle. Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, chloroforme, puis l'acétate d'éthyle, et en dernier le *n*-butanol. Les quatre extraits organiques récupérées sont séchés, concentrées sous pression réduite à sec et pesées.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux trois extraits obtenus. Ces derniers ont été soumis à un screening phytochimique ensuite à un dosage spectrophotométrique en vue d'évaluer leur taux de polyphénols et de flavonoïdes et d'examiner leur pouvoir antioxydant, et antibactérien.

2. Les tests préliminaires du screening phytochimique

2.1 .Les flavonoïdes

Définition

Les flavonoïdes sont l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans les plantes. Ils interviennent comme des composés de défense ainsi que dans la signalisation de la reproduction, de la pathogénèse et de la symbiose.

Test de Shinoda

Une petite quantité de l'extrait a été dissoute dans 5ml d'éthanol à 95% (v/v) puis traitée avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique HCl concentré et 0,5g de coupeau de

magnésium. L'apparition d'une couleur rose ou magenta en 1 ou 2min indique la présence des flavonoïdes (Harborne, J. B., & Baxter, H. 1999).

2.2. Les terpènes

Définition

Les terpènes sont des composés organiques présents dans une variété de plantes, classé avec les hydrocarbures. La plupart d'entre eux constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. La plupart des molécules terpéniques possèdent des propriétés antiseptiques (Pharmacognosie, B. J. 1999).

Test des terpènes

Les extraits des trois variétés sont additionnés chacun de 0,5 ml d'anhydride acétique puis 0,5ml de chloroforme, après dissolution, les solutions sont transférées dans des tubes à essai auxquels sont ajoutés 1ml d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid, la formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet avec coloration de la couche surnageante de vert ou de violet indique la présence des terpènes(Crete P. 1965).

2.3. Les alcaloïdes

Définition

Les alcaloïdes sont des molécules à bases azotées, le plus souvent hétérocycliques, très majoritairement d'origine végétale. Ils ont été classés en plusieurs catégories selon leur structure chimique : les pyrrolidines, les pyridines et les quinoléines. Ils ont de multiples utilisations en pharmacologie en raison de leur efficacité différente.

Test de Wagner

Avant de réaliser le test de Wagner, le filtrat a été préparé en ajoutant quelques mg de chaque extrait à 5 ml d'acide chlorhydrique (1,5%), puis filtré, et ces filtrats ont été utilisés pour détecter la présence d'alcaloïdes. 1,7 gramme d'iode sont dissous avec 2 grammes d'iodure de potassium dans 5 ml d'eau et complétés avec de l'eau jusqu'à obtenir 100 ml de solution. Le réactif de Wagner est ensuite ajouté au filtre de test. L'apparition d'un précipité brun indique la présence d'alcaloïdes (Bruniton, J. 2009).

2.4. Les saponosides

Définition

Les saponosides (ou saponines) sont des hétérosides à géniestéroïdique ou triterpénique, caractérisés principalement par leurs propriétés tensioactives et hémolytiques, ce sont des

composés non-volatils, et sont largement distribuées dans la nature, spécialement chez les plantes supérieures(Lásztity, R et al., 1998).

Test à la mousse

Quelques milligrammes de l'extrait sont mis dans un tube à essai, puis du bicarbonate de sodium et de l'eau sont ajoutés. Si la mousse prend l'apparence de nids d'abeilles stables, cela indique la présence de saponines.

2.5. Les tanins

Définition

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure complexe, ils ont des propriétés tannantes, ils ont astringentes, cytostatiques et bactéricides car ils interfèrent également avec les protéines du protoplasme, c'est pour ça elle est utilisable dans les préparations à usage local (cas de blessures, brûlures) (Chatterjee, A et al ., 2004).

Test au chlorure de fer (5%)

Un peu de chaque extrait est mis dans l'eau tiède avant de filtrer. Une solution de chlorure de fer à 5% est diluée dans l'éthanol à 90%. On place quelques gouttes de cette solution au-dessus du filtrat, l'apparition de la couleur verte ou bleu profond indique la présence des tanins.

Test à l'acétate de plomb (10%)

Une solution d'acide de plomb basique à 10% dans l'eau distillée est ajoutée au filtrat, l'apparition d'un précipité indique la présence des tanins.

2.6. Les composés réducteurs (Les sucres)

Définition

Le terme sucres désigne tous les glucides ayant un potentiel sucrant, principalement le fructose, le saccharose, le glucose, le maltose et le lactose. Les glucides sont des composants universels des organismes vivants et sont parfois appelés hydrates de carbone. Ce sont des composés organiques polyhydroxylés carbonylés (aldéhyde ou cétone).

Test de Fehling

On introduit dans un tube à essai 1ml de la liqueur de Fehling puis on lui rajoute 1ml de l'extrait. L'ensemble est incubé pendant 8 min dans un bain marie bouillant, l'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

2.7. Les anthraquinones

Définition

L'anthraquinone appartient à la famille chimique des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Il est dérivé de l'anthracène et est utilisé en médecine comme laxatif pour traiter les troubles digestifs. On le trouve naturellement dans de nombreux animaux et plantes, il est également une substance active de produit phytosanitaire, qui présente un effet répulsif à l'égard des oiseaux.

Test des anthraquinones

Quelques mg d'extrait sont dilués dans le chloroforme/éther de pétrole (1 :1, v/v) pour ensuite rajouter la soude (NaOH10%), La présence d'une couleur rouge indique la présence d'anthraquinone(Rizk, A., 1982).

2.8.Les stérols

Définition

Les stérols sont des graisses avec un noyau de stérane où l'atome de carbone 3 contient un groupe hydroxyle. Les stérols sont une sous-classe de stéroïdes et leur structure est très similaire à celle du cholestérol. Ils sont étudiés pour leurs activités pharmacologiques telles que : anticholestérol, antidiabétique, anti-inflammatoire, antitumorale et anticancéreuse (Boukes, G et al 2016).

Test de Salkowski

Quelques milligrammes de chaque extrait sont mis dans 2 ml de chloroforme, puis 2 ml de H₂SO₄ concentré sont ajoutés à chaque tube à essai. Secouez-le et laissez-le agir quelques minutes. L'apparition d'une couleur rouge dans la couche de chloroforme indique la présence de stérols (Bruneton J. 1993).

2.9. Les protéines

Définition

Les protéines ont été définies comme étant des macromolécules biologiques présentes dans toutes les cellules vivantes, elles sont le principal composant des cellules qui, représentant plus de 50% de leur poids sec. Elles sont formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques.

Test de Biuret

Quelques milligrammes de chaque extrait sont mis dans l'eau et 1 ml de sulfate de cuivre à 4 % (CuSO₄) est ajouté. Si une couleur violet clair à rose apparaît, cela indique la présence de protéines.

3. Analyse quantitative

3.1. Dosage des flavonoïdes totaux

3.1.1. Principe de la réaction

Le dosage des flavonoïdes repose sur leur capacité à former des complexes colorés avec certains réactifs, facilitant leur détection et leur quantification. En particulier, les flavonoïdes réagissent avec les ions aluminium (Al^{3+}), formant un complexe stable qui peut être détecté par spectrophotométrie. Pour cette analyse, une méthode inspirée de celle de (Topçu et al., 2007).a été appliquée, avec quelques ajustements pour une lecture en microplaques à 96 puits, afin d'optimiser la sensibilité et la reproductibilité du test.

3.1.2. Protocole

La teneur en flavonoïdes a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec des solutions de quercétine à différentes concentrations (200, 175, 150, 125, 100, 75, 50 et 25 $\mu g/ml$). La solution mère de quercétine (0,2 mg/ml) a été obtenue en dissolvant 1 mg de quercétine dans 5 ml de méthanol.

Pour établir la courbe d'étalonnage, 50 μl de chaque dilution ont été mélangés avec 20 μl de $NaNO_2$, 20 μl d' $AlCl_3$ et 20 μl de $NaOH$. Après incubation de 40 minutes à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 415 nm.

Concernant les extraits (chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol), 1 mg de chaque extrait a été dissous dans 1 ml de méthanol. Ensuite, 50 μl de chaque solution ont été mélangés aux mêmes réactifs que précédemment ($NaNO_2$, $AlCl_3$ et $NaOH$, 20 μl chacun).

Un blanc a été préparé selon le même protocole, en remplaçant l'extrait végétal par 50 μl de méthanol. Toutes les solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 40 minutes, puis l'absorbance a été relevée à 415 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (PerkinElmer).

4. L'activité antioxydante

4.1. La méthode du test DPPH

4.1.1 Principe de la réaction

L'activité antiradicalaire a été évaluée par spectrophotométrie à l'aide du radical libre DPPH \bullet (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), selon la méthode décrite par Blois (1958). Ce test repose sur la capacité des composés antioxydants à céder un atome d'hydrogène (AH) au radical violet DPPH \bullet , entraînant sa réduction en une forme incolore ou jaune pâle (DPPH-H), accompagnée de la formation du radical A \bullet . Cette réaction permet de mesurer le pouvoir réducteur de l'extrait étudié. L'efficacité antioxydante est exprimée par la concentration nécessaire de l'extrait pour réduire de 50 % la concentration initiale de DPPH \bullet (valeur IC_{50}),

un paramètre couramment utilisé dans les études d'évaluation de l'activité antioxydante (Brand-Williams et al., 1995).

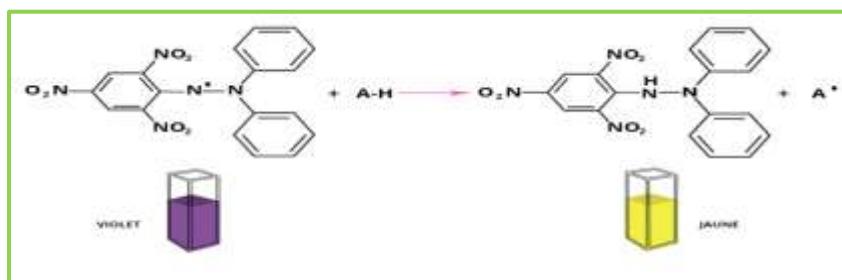


Figure 06: Réaction de réduction du radical DPPH• par un antioxydant

4.1.2. Protocole

La solution de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, C₁₈H₁₂N₅O₆ ; M = 394,33 g/mol) a été préparée en dissolvant 6 mg de DPPH dans 100 mL de méthanol, permettant d'obtenir une concentration finale de 26 µg/ml. Cette solution est conservée à l'abri de la lumière, à -20 °C, afin de préserver sa stabilité.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, trois extraits (chloroforme, acétate d'éthyle, et *n*-butanol) ont été utilisés. Pour chacun d'eux, une solution mère a été préparée, puis diluée afin d'obtenir une gamme de concentrations : 800, 400, 200, 100, 50, 25 et 12,5 µg/ml.

Le test a été réalisé en microplaques de 96 puits : 40 µl de chaque solution diluée a été mélangé à 160 µL de la solution de DPPH. Chaque concentration a été testée en triplicat. Un contrôle négatif a été réalisé en remplaçant l'extrait par 40 µl de méthanol.

Après une incubation de 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH• a été calculé selon la formule suivante :

$$I\% = [(A_{-DPPH} - A_{-ECH}) / A_{-DPPH}] \times 100$$

Où A_{-DPPH} est l'absorbance du contrôle négatif, et A_{-ECH} celle de l'échantillon.

L'activité antioxydante des extraits a été exprimée par la valeur IC₅₀, définie comme la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50 % des radicaux DPPH•.

4.2. La méthode de test ABTS

4.2.1. Principe de la réaction

L'activité antioxydante basée sur le radical ABTS [acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] a été initialement décrite par Re et al. (1999). Elle est couramment utilisée pour évaluer la capacité antioxydante globale des extraits de plantes. Ce test photométrique repose sur la neutralisation d'un radical cationique stable, ABTS^{•+}, en présence de composés antioxydants. Le radical ABTS^{•+}, de couleur bleue-verte, est réduit par les antioxydants présents dans l'échantillon, ce qui entraîne une décoloration proportionnelle à leur pouvoir réducteur. La diminution de l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm, après un temps d'incubation défini. Cette méthode permet une quantification rapide et sensible de l'activité antioxydante.

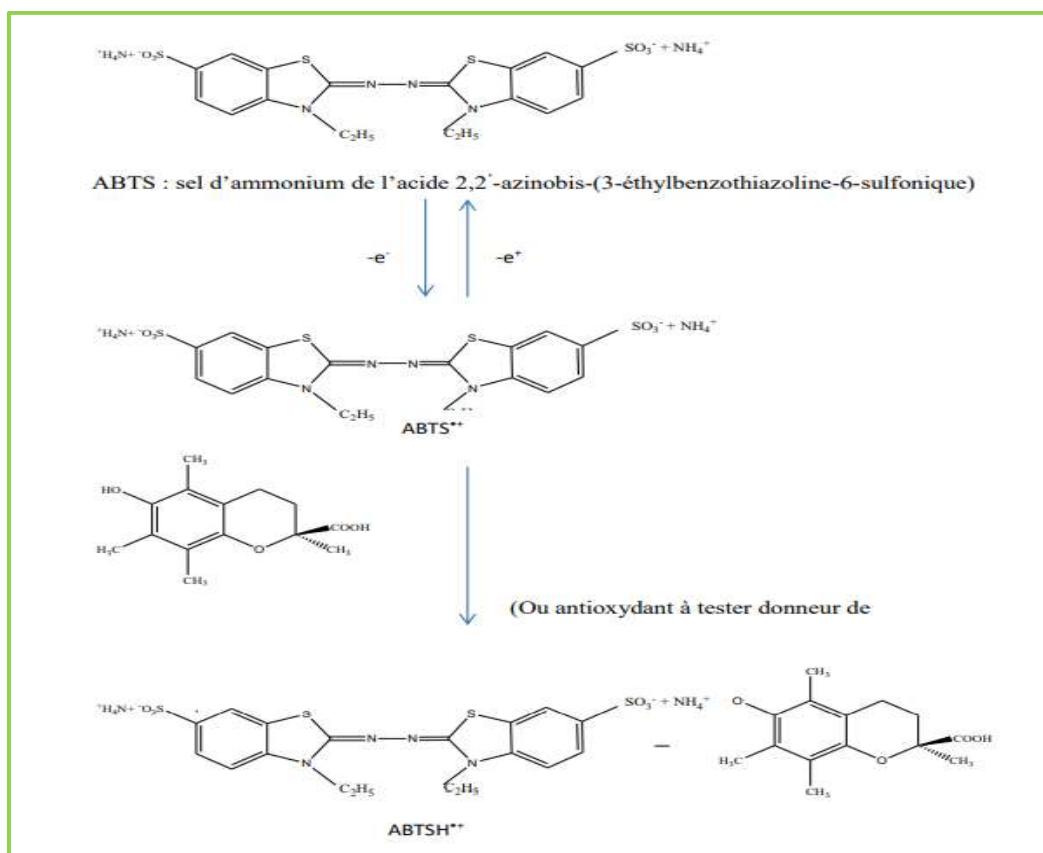


Figure 07 :Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant.

4.2.2 Protocol

La solution radicalaire ABTS^{•+} a été préparée en mélangeant une solution d'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) avec du persulfate de potassium

(K₂S₂O₈), puis incubée à l'abri de la lumière pendant 16 heures afin de permettre la formation du radical stable.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, trois extraits (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) ont été utilisés. Pour chacun, une solution mère a été préparée, puis diluée pour obtenir une gamme de concentrations suivantes : 800, 400, 200, 100, 50, 25 et 12,5 µg/mL. L'essai a été réalisé sur microplaquette de 96 puits, en mélangeant 160 µL de la solution ABTS•⁺ avec 40 µL de chaque dilution d'extrait. Chaque concentration a été testée en triplicat. Un contrôle négatif a été préparé de manière identique, en remplaçant l'extrait par 40 µL de méthanol.

Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaquette (PerkinElmer). Le pouvoir antioxydant a été évalué en pourcentage d'inhibition, selon l'équation suivante :

$$I\% = [(A_{-ABTS} - A_{-ECH}) / A_{-ABTS}] \times 100$$

Où A_{-ABTS} représente l'absorbance du contrôle négatif, et A_{-ECH} celle de l'échantillon testé. La concentration efficace pour inhiber 50 % du radical ABTS•⁺ (valeur IC₅₀) a été calculée afin de comparer la capacité antioxydante des extraits.

4.3. La méthode de test FRAP

4.3.1. Principe de la réaction

Le test FRAP (FerricReducingAntioxidant Power) repose sur la réduction du complexe ferrique (Fe³⁺) en complexe ferreux (Fe²⁺) par les antioxydants présents dans un échantillon. Cette réaction a lieu en milieu acide (pH 3,6) et conduit à la formation d'un complexe Fe²⁺-TPTZ (2,4,6-trypyridyl-s-triazine) de couleur bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon. L'absorbance du complexe formé est mesurée à 593 nm. Plus l'absorbance est élevée, plus l'échantillon possède une capacité antioxydante importante.

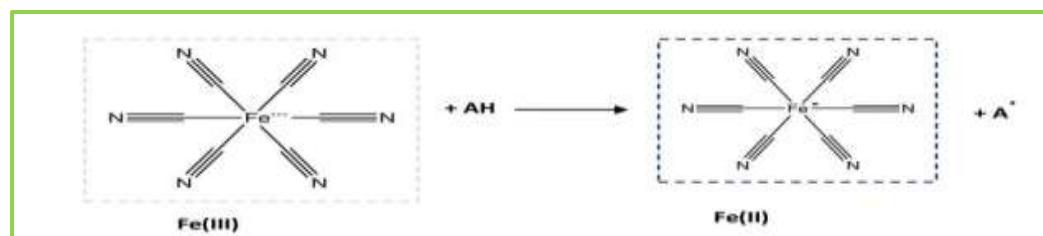


Figure 08: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique.

4.3.2 Protocol

Préparation du réactif FRAP ; en mélangeant 25 ml de tampon acétate (0,3 M) avec 2,5 ml de FeCl₃(20 mM).

Pour chaque extrait utilisé (CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH) une solution mère et 6 dilutions de concentration (800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5) µg/ml ont été préparées.

10 µl de chaque échantillon ont été mélangés avec 300 µL de réactif FRAP et incubés à 37°C pendant 10 à 15 minutes. L'absorbance a été lue à 593 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

5. La méthode de test Alpha amylase

5.1. Principe de la réaction

L'évaluation de l'activité inhibitrice de l'α-amylase a été réalisée selon la méthode à l'iodine/iodure de potassium (IKI), décrite par Zengin et al. (2014) avec quelques modifications. Cette méthode repose sur la capacité de l'α-amylase à hydrolyser l'amidon. En présence d'un extrait inhibiteur, la dégradation de l'amidon est partiellement ou totalement bloquée. L'amidon résiduel forme un complexe coloré bleu avec la solution IKI, dont l'intensité est inversement proportionnelle à l'activité enzymatique. La lecture se fait à 630 nm. Plus l'absorbance est élevée, plus l'inhibition est forte (Zengin et al., 2014 ; Randhir&Shetty, 2007).

5.2 Protocol

Préparation des solutions

Pour préparer la solution de IKI, on dissout 3 g de KI dans 100 ml d'eau et on ajoute 127 mg d'iodine (5mM) et on agite jusqu'à dissolution complète, pour l'amidon, on met la solution dans la microonde à plusieurs cycles de 15 sec.

Pour la solution d'amidon 0,1% : on dissout l'amidon dans l'eau distillée et on le chauffe au micro-ondes par cycles courts (15 s).

Pour le tampon phosphate (pH 6,9) : on mélange 35,1 mg de NaCl avec 142 mg de Na₂HPO₄ et 125 mg de NaH₂PO₄ dans 50 ml d'eau.

Pour les extraits : on dissout 4 mg de chaque extrait dans 1 ml de MeOH. A partir de cette solution on prépare les 7 dilutions suivantes (4 ; 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,06) (mg/ml).

Procédure

dans une microplaques 96 puis, 25 µl d'extrait est additionné à 50 µl de solution α amylase 1U, le mélange est incubé pendant 10 min à 37 °C, ensuite on ajoute 50 µl d'amidon 0,1% et on laisse la microplaques incuber encore une fois pendant 10 min, avant d'effectuer la lecture à 630 nm, on ajoute 25 µl de HCl (1M) pour arrêter la réaction enzymatique et 100 µl de IKI.

Calcul de l'inhibition

Le pourcentage d'inhibition d'alphaamylase est déterminé par rapport au blanc avec le tampon phosphate (PH6.9) par la formule suivante :

$$\% \text{INH} = 1 - [(A_c - A_e) - (A_s - A_b)] / (A_c - A_e)$$

A_c : Absorbance (Amidon + IKI + HCl + solvant + tampon + enzyme)

A_e : Absorbance (Enzyme + Amidon + IKI + HCl + solvant)

A_s : Absorbance (Enzyme + Extrait + Amidon + IKI + HCl)

A_b : Absorbance (Extrait + IKI + tampon)

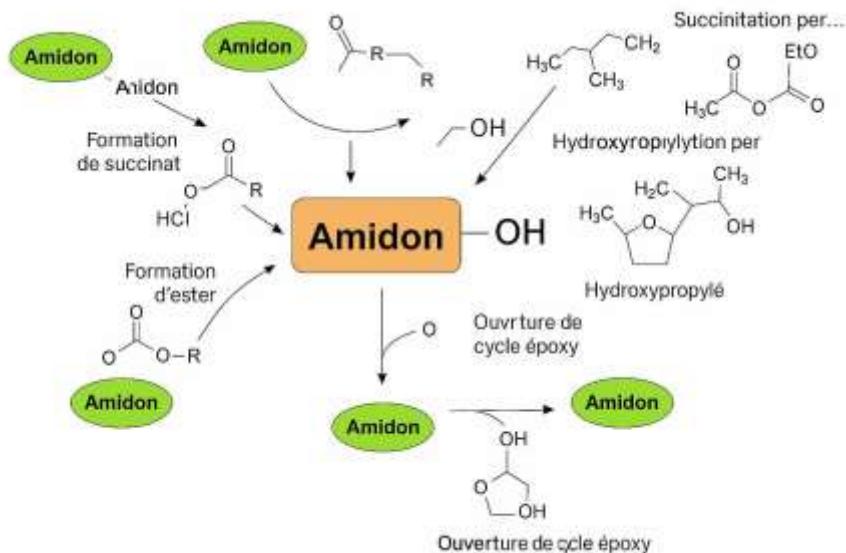


Figure 09 : Réactions de fonctionnalisation chimique de l'amidon.

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussions

1.Résultats du screening phytochimique

Les résultats rassemblés dans les tableaux 2, 3 et 4 sont obtenus après la réalisation des tests phytochimiques des trois extraits, selon les protocoles cités dans la partie précédente au niveau de l'unité *VARENBIOMOL*, ces résultats sont classés en fonction des différents critères d'observation :

Réaction très positive +++ : présence confirmée.

Réaction positive ++ : présence modérée.

Réaction positive + : présence en tant que trace.

Tableau 02: Résultats du screening phytochimique de la phase chloroformique.

| Les métabolites secondaires | Observation | | Résultats Extrait CHCl ₃ |
|-----------------------------|---|---|--|
| | Avant | Après | |
| Flavonoïdes |  |  | - |
| Terpènes |  |  | + |
| Saponosides |  |  | - |

| | | |
|-----------------------|--|-----|
| Sucres | | - |
| Tanins | | - |
| Anthraquinones | | +++ |
| Alcaloïdes | | ++ |
| Stérols | | +++ |

| | | |
|-----------|--|---|
| Protéines | | - |
|-----------|--|---|

Tableau 03: Résultats du screening chimique de la phase acétate d'éthyle.

| Les métabolites secondaires | Observation | | Résultats Extrait AcOEt |
|-----------------------------|-------------|-------|----------------------------|
| | Avant | Après | |
| Flavonoïdes | | | ++ |
| Terpènes | | | + |
| Saponosides | | | - |
| Sucres | | | + |

| | | |
|-----------------------|--|-----|
| Tanins |  | +++ |
| Anthraquinones |  | + |
| Alcaloïdes |  | - |
| Stérols |  | +++ |
| Protéines |  | - |

Tableau 04: Résultats du screening chimique de la phase butanolique.

| Les métabolites secondaires | Observation | | Résultats Extrait <i>n</i> -BuOH |
|-----------------------------|--|-------|-------------------------------------|
| | Avant | Après | |
| Flavonoïdes |  | | +++ |
| Terpènes |  | | + |
| Saponosides |  | | - |
| Sucres |  | | - |
| Tanins |  | | +++ |

| | | |
|-----------------------|---|-----|
| Anthraquinones |  | + |
| Alcaloïdes |  | - |
| Stérols |  | +++ |
| Protéines |  | - |

Le screening phytochimique des trois extraits (CHCl_3 , AcOEt et $n\text{-BuOH}$) a révélé une diversité qualitative en métabolites secondaires. L'extrait chloroformique s'est distingué par une forte présence d'anthraquinones, d'alcaloïdes et de stérols, tandis que l'extrait acétate d'éthyle a montré une richesse en tanins, flavonoïdes et stérols. L'extrait butanolique s'est révélé particulièrement riche en flavonoïdes, tanins et stérols également. Ces résultats suggèrent que les composés bioactifs sont répartis différemment selon la polarité des solvants, ce qui met en évidence l'intérêt d'une extraction sélective pour valoriser les propriétés pharmacologiques potentielles des extraits.

2. Résultats des analyses quantitatives

2.1. Résultats de dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard (la quercétine)

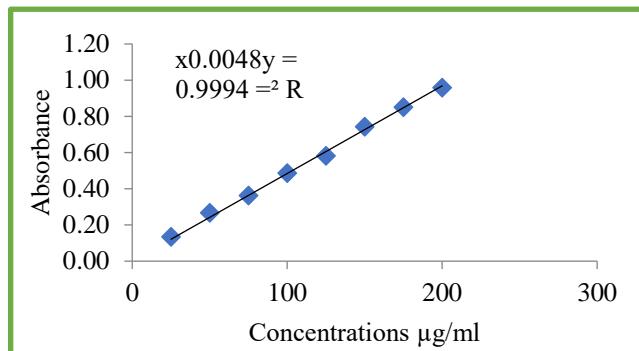


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et a été exprimée en microgrammes équivalent en quercétine par milligramme d'extrait et représentée dans le tableau 05 :

Tableau 05: Résultats du dosage des flavonoïdes.

| Extrait | CHCl ₃ | AcOEt | <i>n</i> -BuOH |
|---|-------------------|--------------|----------------|
| Teneur en flavonoïdes (µg EQ/mg) | 12,96±0,31 | 312,63 ±0,14 | 247,76±2,05 |

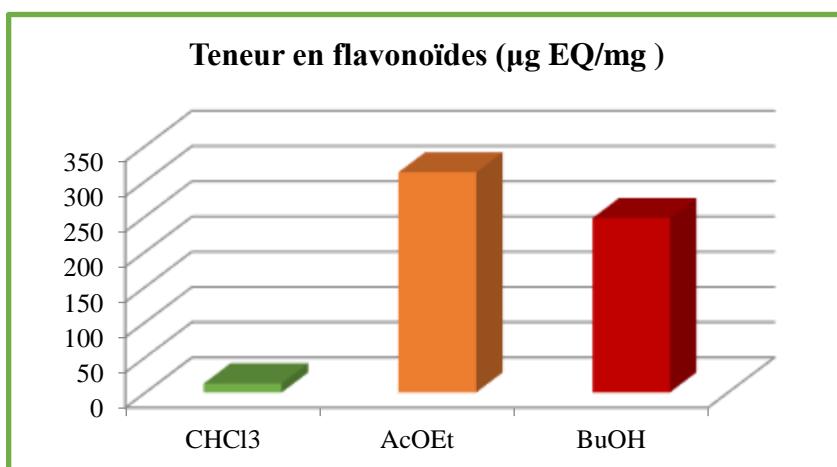


Figure11 : Histogramme représentant la quantité en (µg) des flavonoïdes dans les trois extraits.

L'analyse quantitative a mis en évidence une variation significative de la teneur en flavonoïdes selon les différents extraits. L'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) a présenté la concentration la plus élevée en flavonoïdes ($312,63 \pm 0,14 \mu\text{g EQ/mg}$), suivi par l'extrait butanolique ($247,76 \pm 2,05 \mu\text{g EQ/mg}$), tandis que l'extrait chloroformique (CHCl₃) a affiché la teneur la plus faible ($12,96 \pm 0,31 \mu\text{g EQ/mg}$). Ces résultats soulignent la richesse de la plante en flavonoïdes et corroborent les données obtenues lors du criblage phytochimique préliminaire.

3.Résultats des activités antioxydante

3.1. Résultats du test DPPH

Dans ce test, l'activité anti-radicalaire des trois extraits CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH a été évaluée par la mesure des concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀) selon la formule indiquée dans la partie précédente, en se basant sur la capacité d'une substance à réduire le radical DPPH par rapport à des antioxydants standards (α -tocophérol, BHT et BHA). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 06: Inhibition du radical DPPH par les extraits CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH

| Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Extraits | % d'inhibition | | | | | | | IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) |
|---|--------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|
| | 12,5 μg | 25 μg | 50 μg | 100 μg | 200 μg | 400 μg | 800 μg | |
| CHCl₃ | NA | NA | NA | 12,00 \pm 36,9 | 34,98 \pm 11,5 | 66,26 \pm 7,82 | 88,51 \pm 0,89 | 380,64 \pm 11,51 |
| AcOEt | NA | 6,04 \pm 19,57 | 7,53 \pm 0,30 | 29,78 \pm 24,74 | 53,96 \pm 36,9 | 77,18 \pm 20,55 | 73,35 \pm 17,5 | 20,25 \pm 0,71 |
| <i>n</i>-BuOH | NA | NA | NA | 12,01 \pm 11,3 | 45,12 \pm 18,1 | 52,65 \pm 19,10 | 57,97 \pm 24,9 | 51,21 \pm 0,40 |
| BHA^b | 76,55 \pm 0,48 | 79,89 \pm 0,26 | 79,89 \pm 0,26 | 84,18 \pm 0,10 | 87,13 \pm 0,17 | 89,36 \pm 0,19 | 90,14 \pm 0,00 | 6.14 \pm 0.41 |
| BHT^b | 49,09 \pm 0,76 | 72,63 \pm 2,06 | 72,63 \pm 2,06 | 94,00 \pm 0,31 | 94,97 \pm 0,08 | 95,38 \pm 0,41 | 95,02 \pm 0,23 | 12,99 \pm 0,41 |
| α- Tocopherol ^b | 37,21 \pm 1,82 | 81,53 \pm 1,51 | 81,53 \pm 1,51 | 89,38 \pm 0,19 | 89,45 \pm 0,22 | 89,99 \pm 0,23 | 89,52 \pm 0,33 | 13.02 \pm 5,17 |

NA=pas d'absorbance.

Les courbes de l'absorbance en fonction des différentes concentrations sont reportées sur la figure suivante :

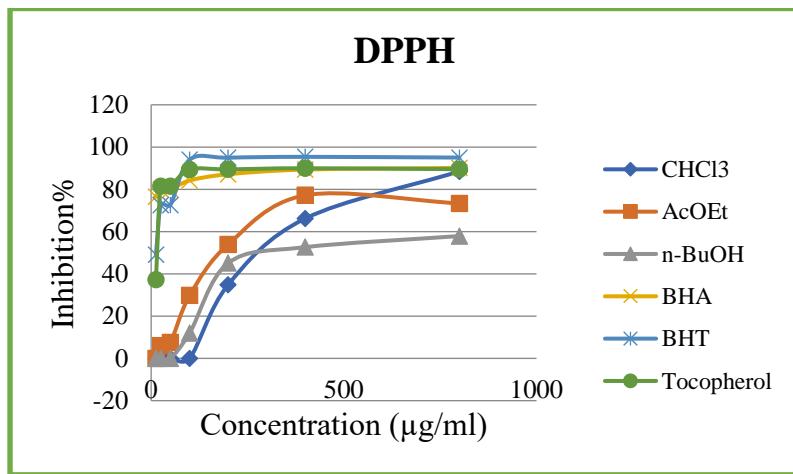


Figure12: Courbe représentative du pouvoir d'inhibition des trois extraits par le test DPPH.

Conclusion

Le test DPPH a permis d'évaluer l'activité antioxydante des extraits CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH en mesurant leur capacité à piéger les radicaux libres. Les résultats montrent que l'extrait AcOEt présente la meilleure activité antioxydante parmi les extraits testés, avec une IC₅₀ de 20,25 µg/ml, ce qui traduit une forte capacité de réduction du radical DPPH. En revanche, les extraits chloroformique et butanolique ont montré des IC₅₀ plus élevées, respectivement 380,64 µg/ml et 51,21 µg/ml, traduisant une activité antioxydante plus modérée à faible. En référence, les antioxydants standards (BHA, BHT et α -tocophérol) présentent des IC₅₀ nettement inférieures, confirmant leur puissance antioxydante. Ces résultats mettent en évidence le potentiel de l'extrait AcOEt en tant que source naturelle prometteuse de composés antioxydants.

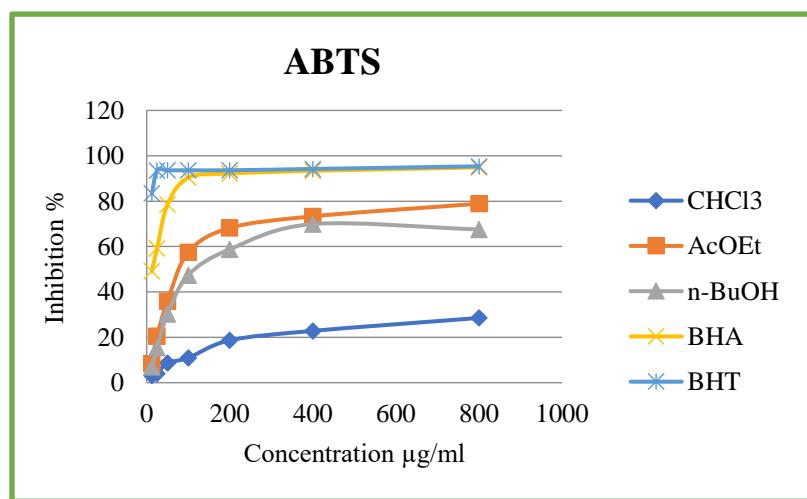
3.2. Résultats du test ABTS

En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, le cation ABTS⁺ subit une réduction et passe de la couleur bleu-vert à un état neutre incolore. Les résultats obtenus pour les trois extraits CHCl₃, AcOEt, et *n*-BuOH sont exprimés en IC₅₀ et sont présentés comparativement au BHA et BHT dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Inhibition du cation ABTS^{•+} par les extraits CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH

| Concentration Extraits ($\mu\text{g/ml}$) | % d'inhibition | | | | | | | IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) |
|---|----------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|---------------------------------------|
| | 12,5 μg | 25 μg | 50 μg | 100 μg | 200 μg | 400 μg | 800 μg | |
| CHCl ₃ | 3,17 \pm 1,12 | 4,09 \pm 1,76 | 8,67 \pm 0,80 | 10,93 \pm 7,56 | 18,68 \pm 0,8 | 22,85 \pm 0,64 | 28,55 \pm 0,9 | >700 |
| AcOEt | 8,49 \pm 4,12 | 20,51 \pm 3,12 | 35,93 \pm 0,04 | 57,47 \pm 5,67 | 68,19 \pm 4,6 | 73,33 \pm 0,73 | 78,91 \pm 2,1 | 65,70 \pm 3,41 |
| <i>n</i> -BuOH | 7,03 \pm 0,61 | 15,41 \pm 0,21 | 30,32 \pm 7,30 | 47,42 \pm 0,55 | 58,81 \pm 0,9 | 69,91 \pm 2,31 | 67,54 \pm 1,2 | 153,40 \pm 1,07 |
| BHA | 69,21 \pm 0,4 0 | 78,23 \pm 1,34 | 88,12 \pm 1,28 | 88,76 \pm 3,07 | 90,85 \pm 1,7 4 | 90,95 \pm 0,51 | 96,68 \pm 0,3 9 | 1,29 \pm 0,30 |
| BHT | 92,83 \pm 1,4 2 | 94,68 \pm 0,42 | 94,95 \pm 0,90 | 95,32 \pm 0,25 | 95,59 \pm 0,4 7 | 95,83 \pm 0,15 | 95,86 \pm 0,1 0 | 1,81 \pm 0,10 |

Les courbes de l'absorbance en fonction des différentes concentrations sont reportées sur la figure suivante :

**Figure13 :** Courbe représentative du pouvoir d'inhibition des trois extraits par le test ABTS.

Le test ABTS a été utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits ; CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH. Les résultats ont montré que les extraits AcOEt et *n*-BuOH possédaient un pouvoir inhibiteur notable contre le radical ABTS^{•+}, avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de 65,70 $\mu\text{g/ml}$ et 153,40 $\mu\text{g/ml}$, comparativement aux antioxydants standards BHA (1,29 $\mu\text{g/ml}$) et BHT (1,81 $\mu\text{g/ml}$). En revanche, l'extrait CHCl₃ a montré une activité très faible, avec une IC₅₀ dépassant 700 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats indiquent que les extraits polaires, en particulier celui

à l'acétate d'éthyle, sont riches en composés antioxydants capables de neutraliser les radicaux libres, contrairement à l'extrait apolaire chloroformique.

3.3. Résultats du test FRAP

Tableau 08 : Résultats des $A_{0.50}$ des extraits obtenus avec le test FRAP.

| Concentration ($\mu\text{g/ml}$) Extraits | Absorbance | | | | | | | $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/ml}$) |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--|
| | 3,125 μg | 6,25 μg | 12,5 μg | 25 μg | 50 μg | 100 μg | 200 μg | |
| CHCl₃ | 0,08 \pm 0,02 | 0,13 \pm 0,01 | 0,17 \pm 0,05 | 0,28 \pm 0,03 | 0,87 \pm 0,01 | 1,12 \pm 0,42 | 1,54 \pm 0,36 | 34,35 \pm 0,70 |
| n-BuOH | 0,11 \pm 0,03 | 0,17 \pm 0,07 | 0,37 \pm 0,02 | 0,70 \pm 0,15 | 0,90 \pm 0,20 | 1,74 \pm 0,56 | 2,33 \pm 0,42 | 17,98 \pm 1,82 |
| Concentration standards | 0,0976μg | 0,195μg | 0,390 μg | 0,781 μg | 1,562 μg | 3,125 μg | 6,25 μg | $A_{0.5} (\mu\text{g/ml})$ |
| Trolox | 0, 07 \pm 0,00 | 0,08 \pm 0,00 | 0,09 \pm 0,01 | 0,13 \pm 0,00 | 0,19 \pm 0,02 | 0,28 \pm 0,05 | 0,60 \pm 0,04 | 5,25 \pm 0,20 |
| Acide ascorbique | 0, 07 \pm 0,00 | 0,09 \pm 0,01 | 0,12 \pm 0,01 | 0,17 \pm 0,01 | 0,25 \pm 0,02 | 0,47 \pm 0,03 | 0,79 \pm 0,09 | 3,62 \pm 0,29 |

Le test FRAP a permis de comparer l'activité antioxydante de différents extraits. L'extrait *n*-BuOH s'est révélé le plus efficace, avec une valeur $A_{0.50}$ de $17,98 \pm 1,82 \mu\text{g/ml}$, indiquant une bonne capacité de réduction des ions ferriques. En revanche, l'extrait CHCl₃ a présenté une activité plus faible, avec une valeur $A_{0.50}$ de $34,35 \pm 0,70 \mu\text{g/ml}$. Comme attendu, les standards trolox ($5,25 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$) et acide ascorbique ($3,62 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$) ont affiché une activité antioxydante supérieure. Ces données confirment que l'extrait *n*-butanol contient des composés à fort pouvoir réducteur, susceptibles de jouer un rôle important dans la lutte contre le stress oxydatif.

3.4. Résultats du test d'inhibition de l' α -amylase

Les résultats de l'activité alpha amylase sont illustrés ci-dessous :

Tableau09: Résultats des IC₅₀ des extraits et standards obtenus avec le test alpha amylase.

| Concentration Extraits (μ g/ml) | % d'inhibition | | | | | | | A _{0,5} IC ₅₀ (μ g/ml) |
|--|----------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--|
| | 6,25 μ g | 12,5 μ g | 25 μ g | 50 μ g | 100 μ g | 200 μ g | 400 μ g | |
| CHCl ₃ | NA | NA | NA | NA | NA | 29,49±2,73 | 26,31±2,19 | >400 |
| AcOEt | NA | NA | NA | NA | NA | 3,41±1,41 | 8,33±5,12 | >400 |
| <i>n</i> -BuOH | NA | NA | NA | NA | 6,62±2,53 | 8,29±4,10 | 14,27±4,11 | >400 |
| Concentration standard | 62,5 μ g | 125 μ g | 250 μ g | 500 μ g | 1000 μ g | 2000 μ g | 4000 μ g | IC ₅₀ (μ g/ml) |
| Acarbose | 7,76±0,17 | 8,08±0,30 | 9,46±0,11 | 10,70±0,96 | 31,81±2,89 | 37,21±3,54 | 53,05±1,59 | 3650,93±10,70 |

L'acarbose, utilisé comme médicament de référence, présente une inhibition enzymatique croissante en fonction de la concentration, atteignant une IC₅₀ de 3650,93 μ g/ml. Cette valeur relativement élevée indique une activité modérée nécessitant des concentrations importantes pour obtenir 50 % d'inhibition. En comparaison, les extraits testés (CHCl₃, AcOEt et *n*-BuOH) n'ont montré aucune activité significative à des concentrations inférieures à 100 μ g/ml, comme l'indiquent les valeurs non disponibles (NA) à ces niveaux.

À des concentrations plus élevées (jusqu'à 400 μ g/ml), l'activité inhibitrice des extraits demeure faible, avec des pourcentages d'inhibition ne dépassant pas 30 %. De plus, aucune des extraits n'a atteint une IC₅₀ mesurable dans l'intervalle testé, toutes présentant des valeurs supérieures à 400 μ g/ml. Ces résultats suggèrent que, dans les conditions expérimentales appliquées, les extraits possèdent une activité inhibitrice nettement inférieure à celle de l'acarbose.

4.Résultats des activités antibactériennes

À l'issue des 24 heures d'incubation, les boîtes de Pétri ont été collectées. Les diamètres des zones d'inhibition formées par les trois extraits sur les souches bactériennes testées ont été mesurés. Pour chaque concentration, une moyenne a été calculée à partir des trois boîtes correspondantes. Les données obtenues sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition indiquant l'activité antibactérienne des trois extraits sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

| | Zone d'inhibition (mm) | | | | | | | |
|-----------------------------|--|------|-----|------|---|------|-----|----|
| Souches bactériennes | <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | | | | <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | | | |
| [C]mg/ml | 0,625 | 1,25 | 2,5 | 5 | 0,625 | 1,25 | 2,5 | 5 |
| CHCl ₃ | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| AcOEt | NA | NA | 10 | 13,5 | 6 | 8 | 9 | NA |
| <i>n</i> -BuOH | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Témoi négative DMSO(20 µl) | NA | | | | NA | | | |
| Témoi positive Amoxicilline | 30 mm | | | | 25 mm | | | |

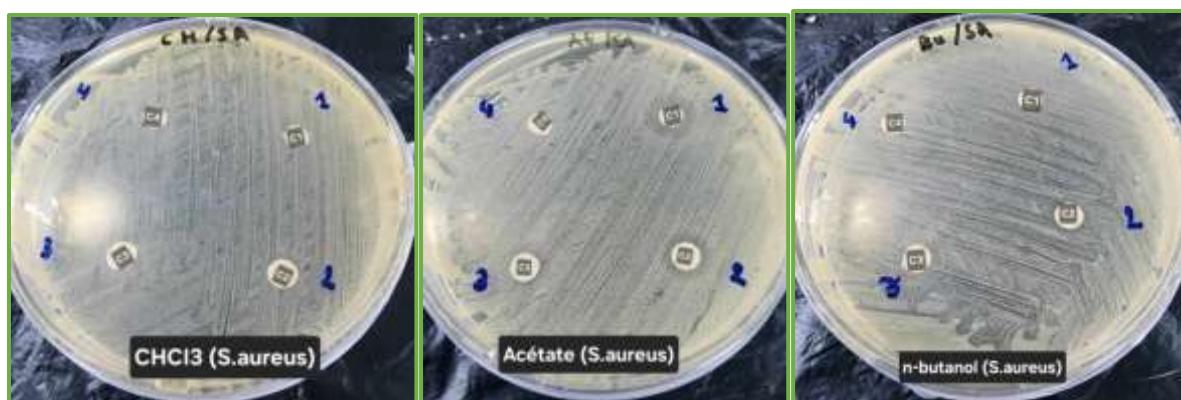


Figure 14: L'effet des trois extraits (CHCl₃,AcOEt,*n*-BuOH) sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*.



Figure 15: L'effet des trois extraits (CHCl₃,AcOEt,*n*-BuOH) sur la souche bactérienne *Escherichia coli*.

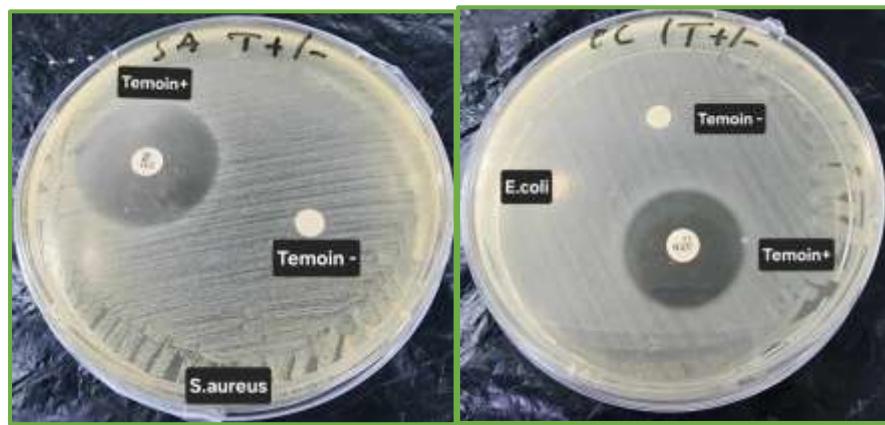


Figure16: L'effet de l'amoxicilline sur les deux souches testées (*S.aureus*, *E. coli*) .

Les tests d'activité antibactérienne réalisés sur les trois extraits d'une plante du genre *Silybum* ont montré que seul l'extrait acéate d'éthyle présente une activité inhibitrice notable, principalement à des concentrations élevées (2,5 et 5 mg/ml). Cette activité s'est manifestée par la formation de zones d'inhibition mesurables contre *Staphylococcus aureus* (10 mm à 2,5 mg/ml et 13,5 mm à 5 mg/ml) et *Escherichia coli* (6 à 9 mm entre 1,25 et 2,5 mg/ml). En revanche, les extraits CHCl₃ et *n*-BuOH n'ont montré aucune activité inhibitrice sur les deux souches testées. Comparativement, l'amoxicilline utilisée comme témoin positif a montré une forte activité avec des zones d'inhibition de 30 mm contre *S. aureus* et 25 mm contre *E. coli*. Ces résultats indiquent que l'extrait AcOEt pourrait renfermer des composés bioactifs présentant une activité antimicrobienne modérée, notamment dirigée contre les bactéries à Gram positif. Cette observation suggère la présence de métabolites secondaires potentiellement actifs, justifiant la mise en œuvre d'analyses complémentaires, telles que des tests de fractionnement, d'isolement et de caractérisation structurale, afin d'identifier les substances responsables de cette activité biologique.

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué l'activité biologique des trois extraits organiques (CHCl_3 , AcOEt et $n\text{-BuOH}$) obtenus après une extraction d'une plante médicinale saharienne appartenant au genre *Silybum*. Nos recherches ont débuté par un criblage phytochimique, qui a mis en évidence une diversité notable de métabolites secondaires selon la nature de l'extrait. L'extrait chloroformique s'est révélé particulièrement riche en anthraquinones, stérols et alcaloïdes, tandis que les deux extraits ; acétate d'éthyle n -butanolique se sont distingués par une forte teneur en flavonoïdes et en tanins.

La quantification des flavonoïdes a confirmé ces observations, révélant des teneurs respectives de 312,63 $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ et 247,76 $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ pour l'extrait AcOEt et $n\text{-BuOH}$. En comparaison, l'extrait CHCl_3 présentait une teneur nettement plus faible, avec seulement 12,96 $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$.

L'activité antioxydante des trois extraits de notre espèce a été également évalué à différentes échelles par les tests DPPH, ABTS et FRAP, Les résultats ont montré que l'extrait AcOEt avait la meilleure capacité de piégeage des radicaux libres ($\text{IC}_{50\text{DPPH}} = 20,25 \mu\text{g/ml}$; $\text{IC}_{50\text{ABTS}} = 65,70 \mu\text{g/ml}$), suivi par l'extrait $n\text{-BuOH}$ par rapport aux standards utilisés (BHA et BHT). L'extrait CHCl_3 a montré une activité faible ou négligeable. Ces résultats sont attribués à la richesse des deux premiers extraits en composés flavonoïdes.

L'activité antidiabétique des extraits CHCl_3 , AcOEt et $n\text{-BuOH}$ a été évaluée par inhibition de l' α -amylase. Les résultats ont montré une absence d'activité significative à des concentrations inférieures à 100 $\mu\text{g/ml}$, même à des concentrations plus élevées (jusqu'à 400 $\mu\text{g/ml}$), l'inhibition enzymatique est restée faible, ne dépassant pas 30 %. Ces données indiquent une activité inhibitrice très modeste, nettement inférieure à celle de l'acarbose utilisée comme référence.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré que seul l'extrait AcOEt était actif contre les deux souches bactériennes testées (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*), avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 13,5 mm, tandis que l'extrait CHCl_3 et $n\text{-BuOH}$ n'ont démontré aucune activité significative.

En résumé, l'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) se distingue par ses propriétés biologiques prometteuses, notamment une teneur élevée en composés phénoliques, une forte activité antioxydante, un pouvoir antimicrobien marqué, ainsi qu'une capacité modérée d'inhibition enzymatique. Ces résultats mettent en évidence le potentiel pharmacologique de cette plante,

en particulier de l'extrait acétate d'éthyle, et soulignent son intérêt en tant que source naturelle de composés antioxydants, antimicrobiens et possiblement antidiabétiques.

Référence bibliographique

Références

- Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., & Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1423–1432.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Barreda, V. D., et al. (2015). Early evolution of the angiosperm clade Asteraceae in the Cretaceous of southern South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10985–10990.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
- Boukes, G. J., & Van de Venter, M. (2016). In vitro modulation of the innate immune response and phagocytosis by three Hypoxis spp. and their phytosterols. *South African Journal of Botany*, 102, 120-126.
- Boulos, L. (2002). Flora of Egypt. Al Hadara Publishing.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Bremer, K. (1994). Asteraceae: Cladistics and Classification. Timber Press.
- Bruneton J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, Lavoisier 2éme édition. Londres, New York, p. 625-642.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition, Tec & Doc, Lavoisier.

Calixto, J. B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 131-134.

Chatterjee, A., Yasmin, T., Bagchi, D., & Stohs, S. J. (2004). Inhibition of *Helicobacter pylori* in vitro by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. *Molecular and cellular biochemistry*, 265(1), 19-26

Crete P. (1965). *Précis de botanique*, 4ème édition. Masson, Paris, p.429.

Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.

Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 1), 69–75.

Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Bayer, R. J. (2005). Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. IAPT.

Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., & Bayer, R. J. (2009). Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy.

Gazák, R., Walterová, D., & Křen, V. (2007). Silybin and silymarin—new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 14(3), 315–338.

Gould, I. M. (2016). Antimicrobial resistance: the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(12), 1297-1299.

Harborne, J. B., & Baxter, H. (1999). The handbook of natural flavonoids. Volume 1 and Volume 2. John Wiley and Sons.

Heywood, V. H., Brummitt, R. K., Culham, A., & Seberg, O. (2007). Flowering Plant Families of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.

Heywood, V.H., & Humphries, C.J. (1997). The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Cambridge University Press.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., & Donoghue, M.J. (2016). Plant Systematics: A Phylogenetic Approach (4th ed.). Sinauer Associates.

Kooti, W., Daraei, N., & Memariani, Z. (2017). Silymarin: A promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(5), 460–475.

Křen, V., & Walterová, D. (2005). Silybin and silymarin – new effects and applications. *Biomedical Papers*, 149(1), 29–41.

Le Floc'h, E., Boulos, L., & Vela, E. (2010). Plantes de la Méditerranée : Usages et traditions. IRD Éditions.

Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78(Suppl 1), A18–A25.

Lászity, R., Hidvégi, M., & Bata, Á. (1998). Saponins in food. *Food Reviews International*, 14(4), 371-390.

Mabberley, D. J. (2017). Mabberley's Plant-book: A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses (4th ed.). Cambridge University Press.

Mabberley, D.J. (2017). Mabberley's Plant-book: A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses (4th ed.). Cambridge University Press.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémesy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.

Mandel, J. R., Dikow, R. B., Siniscalchi, C. M., Thapa, R., Watson, L. E., & Funk, V. A. (2019). A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(28), 14083–14088.

Marfak, A. (2003). Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique d'extraits de plantes médicinales marocaines. Thèse de doctorat, Université Mohammed V - Agdal, Rabat.

Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022–1037.

Perlin, D. S. (2015). Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 1–11.

Pharmacognosie, B. J. (1999). Phytochimie. Plantes médicinales, 3ème édition, Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 235-669.

Pignatti, S. (1982). Flora d'Italia. Edagricole.

Polyak, S. J., Morishima, C., Shuhart, M. C., Wang, C. C., Liu, Y., & Lee, D. Y. W. (2010). Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-κB signaling, and HCV infection by standardized silymarin. *Gastroenterology*, 138(5), 1943–1953.

Pottier-Alapetite, G. (1981). Flore de la Tunisie : Angiospermes - Dicotylédones Gamopétales. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Quézel, P. & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. CNRS, Paris.

- Randhir, R., & Shetty, K. (2007). Improved α -amylase and Helicobacter pylori inhibition by fenugreek extracts derived via solid-state bioconversion using Rhizopus oligosporus. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(3), 382–392.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Rizk, A. M. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. I. a chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia*.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887.
- Saller, R., Meier, R., & Brignoli, R. (2001). The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*, 61(14), 2035–2063.
- Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M. and Ulubelen A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of Pistaciaterbinthus. *Food Chemistry*, (103), p : 816–822
- WHO (2002). Traditional Medicine Strategy 2002–2005. World Health Organization, Geneva.
- Wichtl, M. (2004). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. Medpharm Scientific Publishers.
- Zengin G. et al. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *IndustrialCrops and Products*, 53, 244–251.

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques d'une espèce saharienne du genre *Silybum*, appartenant à la famille des Asteraceae. Trois extraits ont été obtenus à partir des parties aériennes de la plante par extraction séquentielle à l'aide de solvants de polarité croissante : chloroforme (CHCl_3), acétate d'éthyle (AcOEt) et *n*-butanol (*n*-BuOH). Le screening phytochimique a révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires, avec une forte teneur en flavonoïdes, tanins et stérols dans les extraits polaires. L'analyse quantitative a montré que l'extrait AcOEt est le plus riche en flavonoïdes (312,63 $\mu\text{g EQ/mg}$), suivi par l'extrait *n*-BuOH (247,76 $\mu\text{g EQ/mg}$), tandis que l'extrait CHCl_3 présentait une faible concentration. L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par les tests DPPH, ABTS et FRAP. L'extrait AcOEt a affiché la meilleure capacité antiradicalaire avec une IC_{50} de 20,25 $\mu\text{g/ml}$ au test DPPH, confirmant sa richesse en composés antioxydants. Le test ABTS a également montré une forte activité pour cet extrait ($\text{IC}_{50} = 65,70 \mu\text{g/ml}$), tandis que le *n*-BuOH a présenté un pouvoir réducteur intéressant au test FRAP ($A_{0.5} = 17,98 \mu\text{g/ml}$). L'inhibition de l' α -amylase par les différents extraits s'est révélée modérée, avec des valeurs d' IC_{50} supérieures à 400 $\mu\text{g/ml}$ pour l'ensemble des échantillons. Toutefois, l'extrait AcOEt a présenté des pourcentages d'inhibition légèrement supérieurs à forte concentration. En ce qui concerne l'activité antibactérienne, seul l'extrait AcOEt a démontré un effet inhibiteur significatif, avec une zone d'inhibition atteignant 13,5 mm contre *Staphylococcus aureus* à une concentration de 5 mg/ml

Les mots clés : Asteraceae, *silybum*, screening phytochimique , dosage des flavonoïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

This study focused on the phytochemical analysis and evaluation of the biological activities of a Saharan species from the *Silybum* genus, belonging to the Asteraceae family. Three extracts were obtained from the aerial parts of the plant through sequential extraction using solvents of increasing polarity: chloroform (CHCl₃), ethyl acetate, and *n*-butanol (n-BuOH). The phytochemical screening revealed the presence of several secondary metabolites, with a high content of flavonoids, tannins, and sterols in the polar extracts. Quantitative analysis showed that the ethyl acetate extract was the richest in flavonoids (312.63 µg QE/mg), followed by the *n*-butanol extract (247.76 µg QE/mg), while the chloroform extract had a low concentration. Antioxidant activity was evaluated using DPPH assay, ABTS assay, and FRAP assay. The AcOEt extract demonstrated the highest free radical scavenging capacity, with an IC₅₀ = 20.25 µg/ml in the DPPH assay, confirming its richness in antioxidant compounds. The ABTS assay also showed strong activity for this extract (IC₅₀ = 65.70 µg/ml), while the *n*-BuOH extract exhibited notable reducing power in the FRAP assay (A_{0.5} = 17.98 µg/ml). The α-amylase inhibitory activity was moderate for all extracts, with IC₅₀ values above 400 µg/ml, although the AcOEt extract showed higher inhibition percentages at higher concentrations. Regarding antibacterial activity, only the AcOEt extract exhibited a notable inhibitory effect, with inhibition zones reaching 13.5 mm against *Staphylococcus aureus* at 5 mg/ml.

Keywords: Asteraceae *Silybum*, phytochemical screening, flavonoid content, antioxidant activity, antibacterial activity.

الملخص

تناولت هذه الدراسة التحليل الكيميائي النباتي وتقييم الأنشطة البيولوجية لنبات صحراوي من جنس *Silybum*، والذي ينتمي إلى الفصيلة المركبة حيث تم الحصول على ثلاثة مستخلصات من الأجزاء الهوائية للنبات عن طريق الاستخلاص المتسلسل باستخدام مذيبات ذات قطبية متزايدة: الكلوروفورم ، خلات الإيثيل وبيوتانول. كشف الفحص الكيميائي النباتي عن وجود عدة مركبات ثانوية، مع تركيز عال من الفلافونويات، والتаниنات، والستيرولات في المستخلصات القطبية. أظهرت التحاليل الكمية أن مستخلص خلات الإيثيل هو الأغنى بالفلافونويات (312.63 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/ملغ)، يليه مستخلص البيوتانول (247.76 ميكروغرام/ملغ)، في حين سجل مستخلص الكلوروفورم تركيزاً منخفضاً. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبارات DPPH ، ABTS، وFRAP. وقد أظهر مستخلص خلات الإيثيل أعلى قدرة على مقاومة الجذور الحرة، حيث بلغ IC_{50} حوالي 20.25 ميكروغرام/مل في اختبار DPPH ، مما يؤكد غناه بالمركبات المضادة للأكسدة. كما أظهر اختبار ABTS نشاطاً مرتفعاً لهذا المستخلص ($IC_{50} = 65.70$ ميكروغرام/مل)، في حين أبدى مستخلص البيوتانول قدرة احتزاز جيدة في اختبار FRAP ($A_{0.5} = 17.98$ ميكروغرام/مل). أما بالنسبة لنشاط تثبيط إنزيم α -أميلاز ، فقد كان معتدلاً في جميع المستخلصات، حيث تجاوزت قيم IC_{50} حاجز 400 ميكروغرام/مل، رغم أن مستخلص خلات الإيثيل أظهر نسب تثبيط أعلى عند التركيزات المرتفعة. وفيما يتعلق بالنشاط المضاد للبكتيريا، فقد كان مستخلص خلات الإيثيل وحده تأثير مثبط ملحوظ، حيث وصلت مناطق التثبيط إلى 13.5 مم ضد *Staphylococcus aureus* عند تركيز 5 ملغم/مل .

الكلمات المفتاحية: الفصيلة المركبة ، الجنس *Silybum* ، الفحص الكيميائي النباتي ، قياس الفلافونويات، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

**Screening phytochimique et évaluation des activités biologiques
d'une plante médicinale du genre *Silybum***

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master 2en Microbiologie. Spécialité : MYCOLOGIE
ET BIOTECHNOLOGIE FONGIQUE**

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques d'une espèce saharienne du genre *Silybum*, appartenant à la famille des Asteraceae. Trois extraits ont été obtenus à partir des parties aériennes de la plante par extraction séquentielle à l'aide de solvants de polarité croissante : chloroforme (CHCl_3), acétate d'éthyle (AcOEt) et n-butanol (n-BuOH). Le screening phytochimique a révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires, avec une forte teneur en flavonoïdes, tanins et stérols dans les extraits polaires. L'analyse quantitative a montré que l'extrait AcOEt est le plus riche en flavonoïdes (312,63 $\mu\text{g EQ/mg}$), suivi par l'extrait n-BuOH (247,76 $\mu\text{g EQ/mg}$), tandis que l'extrait CHCl_3 présentait une faible concentration. L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par les tests DPPH, ABTS et FRAP. L'extrait AcOEt a affiché la meilleure capacité antiradicalaire avec une IC_{50} de 20,25 $\mu\text{g/ml}$ au test DPPH, confirmant sa richesse en composés antioxydants. Le test ABTS a également montré une forte activité pour cet extrait ($\text{IC}_{50} = 65,70 \mu\text{g/ml}$), tandis que le n-BuOH a présenté un pouvoir réducteur intéressant au test FRAP ($\text{A}_{0.5} = 17,98 \mu\text{g/ml}$). L'inhibition de l' α -amylase par les différents extraits s'est révélée modérée, avec des valeurs d' IC_{50} supérieures à 400 $\mu\text{g/ml}$ pour l'ensemble des échantillons. Toutefois, l'extrait AcOEt a présenté des pourcentages d'inhibition légèrement supérieurs à forte concentration. En ce qui concerne l'activité antibactérienne, seul l'extrait AcOEt a démontré un effet inhibiteur significatif, avec une zone d'inhibition atteignant 13,5 mm contre *Staphylococcus aureus* à une concentration de 5 mg/ml

Mots-clés : Asteraceae, *silybum*, screening phytochimique , dosage des flavonoïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Laboratoires de recherche : Unité de recherche VARENBIOMOL (U Constantine 1 Frères Mentouri).
Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT)

Présidente du jury : M^{me} Meziani Meriem (M.C.A - UFM Constantine 1).

Encadrant : Dr. Aliouche Lamia (MC(A) - UFM Constantine 1)

Examinateuse : M^{me} Zater Hanène (M.C.A - Univ. Larbi Ben M'Hidi , Oum El Bouaghi).