



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département de Biologie



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie appliquée

Par

BELKALAI Zohra

Thème :

*Évaluation de potentiel antimicrobien et antioxydant des graines de
Silybum marianum L*

Soutenue le 29/6/2026 devant le jury composé de :

Président	CHIBANI Abdelouaheb	Pr	Université de Mostaganem
Encadreur	MEKHALDI Abdelkader	Pr	Université de Mostaganem
Examineur	BOUZNAD Ahcen	MCB	Université de Mostaganem
Co-encadreur	TAHLAITI Amina	Doct	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2025/2026

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

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

J'exprime ma profonde gratitude à mon encadreur, **Dr MEKHALDI Abdelkader**. Vous m'avez l'honneur d'accepter la direction de cette mémoire .

Mes sincères remerciements au **Dr Hakim HAMOUM** pour son accompagnement, ses conseils.

Je tiens également à remercier les membres du jury, **Pr Abdelwahab CHIBANI**, président du jury, pour l'honneur qu'il nous fait d'évaluer ce mémoire, ainsi que **Dr Ahcene BOUZNAD**, examinateur, pour l'attention portée à notre travail et ses remarques enrichissantes.

Un merci spécial à l'ingénieur de laboratoire Mme **Tahliati Amina** , pour son soutien ,sa disponibilité et ses précieux conseils tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des enseignants et du personnel du département de Biologie pour la qualité de leur enseignement et leur accompagnement durant mon parcours universitaire.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille, à mes amis et à toutes les personnes qui m'ont soutenue, encouragée et aidée de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

À tous, j'exprime ma profonde reconnaissance et ma gratitude.

Dédicaces

Louange à Dieu seul

Je dédie ce modeste travail :

A l'âme de mon **cher oncle** ; que dieu le garde dans son paradis.

A mes très chère parents ,source de mon courage , pour leur amour , le soutien qu'ils m'ont toujours apporté ,la confiance dont ils m'ont toujours témoignée. Merci d'avoir toujours été à mes cotés , de m'avoir donné les moyens de réaliser mes objectifs et d'avoir éclairé mon chemin vers la réussite . Je vous aime.

A mes chère sœurs **Yasmine** et **Noujoud** ,

A mon cher frère **Abdelkarim** ,

pour l'amour ,le courage et le respect qu'ils m'ont toujours accordé .

A tous les membres de ma famille , pour ses motivations et ses conseils tout au long du parcours .

A tous mes amies de promotion de 2^{ème} année master microbiologie appliqué 2025/2026.

A mes chère amies : **Rania , Chaima, Imane , Marwa, Ismahane ,Hind** .

A toute personne

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

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussit.

Résumé

Silybum marianum ou chardon Marie est une plante médicinale, appartenant à la famille des astéracées, la plus largement utilisée à travers le monde et qui est largement répondue en Algérie, pour sa richesse en substances bioactives.

L'objectif principal de cette étude est évaluer le potentiel antioxydant et antimicrobien des extraits et d'huile végétale obtenus à partir de ses graines par deux méthodes d'extraction (macération et par solvant organique).

L'analyse phytochimique est réalisée sur les différents extraits des graines de *Silybum marianum* afin de mise en évidence les principaux métabolites secondaires présents. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs groupes de composés bioactifs, notamment les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les saponines, dont la répartition a varié en fonction du solvant d'extraction utilisé.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des différents extraits et d'huile végétale des graines de *Silybum marianum* est déterminé par la méthode de diffusion des puits contre plusieurs souches microbiennes, et les résultats obtenus ont montré une efficacité variable selon le type d'extrait et le micro-organisme testé. Des diamètres des zones d'inhibition varient entre 6 et 15 mm et l'extrait acétonique présente l'activité antimicrobienne la plus élevée avec diamètre de 15 mm contre *Condida albicans* ATCC, ainsi que des valeurs de CMI et de CMB différentes ont été observées entre (18,75 et 75 mg/μL), traduisant des niveaux d'activité antimicrobienne distincts. L'analyse du rapport CMB/CMI a permis de mettre en évidence des effets bactéricides pour certains extraits et bactériostatiques pour d'autres. Ces résultats suggèrent que les graines de *Silybum marianum* renferment des composés bioactifs capables d'inhiber la croissance des micro-organismes ou de les éliminer, confirmant ainsi leur potentiel comme source naturelle d'agents antimicrobiens.

Afin de déterminant les activités antioxydantes in vitro de nos extraits analysées la meilleure activité de piégeage du radical DPPH[•] par rapport à l'antioxydant de synthèse (acide ascorbique) a été réalisé, en déterminant leur efficace (IC₅₀).

L'activité antioxydante des extraits de *Silybum marianum* évaluée par le test DPPH a montré que l'extrait acétonique possède la meilleure capacité antiradicalaire (IC₅₀ = 1,90 mg/ml), tandis que l'extrait à l'éther de pétrole présente l'activité la plus faible (IC₅₀ = 48,80 mg/ml). L'acide ascorbique a montré une activité nettement supérieure à celle de tous les

extraits testés. Ces résultats indiquent que les graines de *Silybum marianum* constituent une source potentielle d'antioxydants naturels, particulièrement dans l'extrait acétonique.

Mots clés : *Silybum marianum*, composés phénoliques, activité antimicrobienne et antioxydante .

ملخص

يعتبر نبات الخرفيش أو شوك الجمل *Silybum marianum* نباتاً طبيياً ينتمي إلى الفصيلة النجمية (الأستراسية)، وهو من أكثر النباتات استخداماً على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم، كما أنه ينتشر بكثرة في الجزائر نظراً لغناه بالمواد النشطة بيولوجياً. تتمثل الأهداف الرئيسية لهذه الدراسة في تقييم القدرة المضادة للأكسدة والمضادة للميكروب للمستخلصات والزيت النباتي المستخلص من بذوره باستخدام طريقتين للاستخلاص (النقع والاستخلاص بالمذيبات العضوية). أجري التحليل الفيتوكيميائي على مختلف مستخلصات بذور نبات *Silybum marianum* بهدف تحديد الأيضات الثانوية الرئيسية الموجودة فيها. وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها وجود عدة مجموعات من المركبات النشطة بيولوجياً، لا سيما المركبات الفينولية، الفلافونويدات، العفص (التانينات) والصابونينات، والتي تباين توزيعها باختلاف مذيب الاستخلاص المستخدم. تم تحديد تقييم القدرة المضادة للميكروبات لمختلف المستخلصات والزيت النباتي لبذور *Silybum marianum* عن طريق طريقة الانتشار في الأبار ضد عدة سلالات ميكروبية، وأظهرت النتائج المحققة فعالية متغيرة حسب نوع المستخلص والميكروب المختبر. وتراوحت مناطق التثبيط بين 6 و 15 ملم، حيث سجل المستخلص الأسيتوني أعلى نشاط مضاد للميكروبات بقطر تثبيط بلغ 15 ملم ضد سلالة *Candida albicans* ATCC. كما لوحظت قيم مختلفة للتركيز المثبط الأدنى والتركيز القاتل الأدنى (CMB) (CMI) تراوحت بين (18.75 و 75 ملغ/ميكرولتر)، مما يعكس مستويات نشاط متباينة ضد الميكروبات. وسمح تحليل النسبة (CMB/CMI) بإبراز تأثيرات قاتلة للبكتيريا لبعض المستخلصات ومثبطة لنموها لمستخلصات أخرى. تشير هذه النتائج إلى أن بذور نبات *Silybum marianum* تحتوي على مركبات نشطة بيولوجياً قادرة على تثبيط نمو الكائنات الدقيقة أو القضاء عليها، مما يؤكد إمكانية اعتمادها كمصدر طبيعي للعوامل المضادة للميكروبات. ومن أجل تحديد الأنشطة المضادة للأكسدة في المختبر (in vitro) للمستخلصات المحللة، أجري اختبار أفضل نشاط لتثبيط الجذور الحرة DPPH مقارنة بمضاد الأكسدة الاصطناعي (حمض الأسكوربيك)، وذلك من خلال تحديد كفاءتها عبر قياس التركيز المثبط النصفى (IC₅₀). أظهر النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات *Silybum marianum* المُقيّم بواسطة اختبار DPPH أن المستخلص الأسيتوني يمتلك أفضل قدرة على تثبيط الجذور الحرة (IC₅₀ = 1,90 mg/ml)، في حين سجل مستخلص إيثر البترول أدنى نشاط (48,80 mg/ml). وأظهر حمض الأسكوربيك نشاطاً أعلى بكثير مقارنة بجميع المستخلصات المختبرة. تشير هذه النتائج إلى أن بذور نبات *Silybum marianum* تشكل مصدراً واعداً لمضادات الأكسدة الطبيعية، وخاصة في المستخلص الأسيتوني.

الكلمات المفتاحية: *Silybum marianum*، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للميكروبات، مضادات الأكسدة .

Abstract

Silybum marianum, commonly known as milk thistle, is a medicinal plant belonging to the Asteraceae family. It is one of the most widely used medicinal plants worldwide and is extensively distributed in Algeria due to its richness in bioactive substances.

The main objective of this study is to evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of the vegetable oil and extracts obtained from its seeds using two extraction methods (maceration and organic solvent extraction).

Phytochemical analysis was performed on the various seed extracts of *Silybum marianum* to identify the main secondary metabolites present. The obtained results highlighted the presence of several groups of bioactive compounds, notably phenolic compounds, flavonoids, tannins, and saponins, whose distribution varied depending on the extraction solvent used.

The evaluation of the antimicrobial power of the different extracts and vegetable oil from *Silybum marianum* seeds was determined using the agar well diffusion method against several microbial strains. The results demonstrated variable efficacy depending on the type of extract and the tested microorganism. Inhibition zones ranged between 6 and 15 mm, with the acetonic extract exhibiting the highest antimicrobial activity, showing a 15 mm diameter against *Candida albicans* ATCC. Furthermore, distinct MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) values were observed, ranging between 18.75 and 75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, reflecting distinct levels of antimicrobial activity. Analysis of the MBC/MIC ratio revealed bactericidal effects for some extracts and bacteriostatic effects for others. These results suggest that *Silybum marianum* seeds contain bioactive compounds capable of inhibiting the growth of microorganisms or eliminating them, thereby confirming their potential as a natural source of antimicrobial agents.

To determine the in vitro antioxidant activities of our analyzed extracts, the radical scavenging activity on the DPPH $\cdot$ radical was evaluated and compared to a reference synthetic antioxidant (ascorbic acid) by determining their efficiency (IC_{50}).

The antioxidant activity of the *Silybum marianum* extracts evaluated by the DPPH assay showed that the acetonic extract possesses the best free radical scavenging capacity ($\text{IC}_{50} = 1.90 \text{ mg/mL}$), whereas the petroleum ether extract displayed the lowest activity ($\text{IC}_{50} = 48.80 \text{ mg/mL}$). Ascorbic acid showed a significantly

higher activity than all the tested extracts. These results indicate that *Silybum marianum* seeds constitute a potential source of natural antioxidants, particularly within the acetonic extract.

Keywords : *Silybum marianum*, phenolic compounds, antimicrobial activity, antioxidant activity.

Table des matières

Remerciements

Résumé

ملخص

Abstract

Introduction.....	1
I.1 Historique de la plante.....	5
I.2 Présentation de <i>Silybum marianum</i>	5
I.3 Classification systématique.....	6
I.4 Localisation et répartition géographique de plante	6
I.5 Description morphologique.....	8
I.5.1 Les feuilles	8
I.5.2 Tiges.....	8
I.5.3 Fleures.....	9
I.5.4 Fruits	10
I.5.5 Racines	10
I.6 Cycle de vie.....	11
I.7 Conditions de croissance et de développement	12
I.8 Composition chimique de la graine.....	13
I.9 Usage traditionnel de la plante <i>Silybum marianum</i>	14
I.10 <i>Silybum marianum</i> en thérapeutique	15
I.11 Toxicité.....	16
II.1 Métabolites secondaires des plantes	18
II.2 Classification des métabolites secondaires	18
II.2.1 Les composés phénoliques.....	19
a- La voie shikimate	19

b- La voie des phénylpropanoïdes	19
c_ La voie de l'acétate/malonate	19
II.2.1.1 Classification des polyphénols	19
II. 2.1.1.1 Phénols simples	19
II.2.1.1.2 Acides phénolique simples	20
II.2.1.1.2.1 Les acides hydroxybenzoïques.....	20
II.2.1.1.2.2 Acides hydroxycinnamiques	20
II.2.2 Les flavonoïdes	20
II.2.2.1 Les flavonols.....	20
II.2.2.2 Les flavones	21
II.2.2.3 Les flavanones et hydroflavonoles.....	21
II.2.2.4 _Les flavanols.....	21
II.2.3 Tannins	22
II. 2.3.1 Les tannins hydrolysables	22
II.2.3.2 Les tannins condensés ou les proanthocyanidols	22
II.2.4 Les coumarines	22
II.2.5 Les alcaloïdes.....	23
II.2.6 Les saponosides	23
II.2.1.2 Propriétés chimiques des polyphénols.....	23
II.2.1.2.1 Acidité	23
II.2.1.2.2 Liaison par hydrogène	24
II.2.1.2.3 Nucléophile.....	24
II.2.1.2.4 La polarisabilité	24
II.2.1.2.5 Complexation des protéines.....	24

II.2.1.2.6 Chélation des métaux.....	24
II.2.1.2.7 Piégeage des radicaux libres.....	25
II.3 Propriétés biologiques et pharmaceutiques des composés bioactifs de <i>Silybum marianum</i>	25
II.3.1 Propriétés antioxydantes.....	26
II.3.2 Action anti-inflammatoire.....	27
II.3.3 Activité anticancéreuse.....	27
II.3.4 Activité antidiabétique.....	27
II.3.5 Cirrhose et maladie hépatique due à l'alcool	27
II.3.6 Activité hépatoprotectrice.....	28
II.3.7 Intoxication aux champignons.....	28
II.3.8 Activité hypocholestérolémiante.....	28
II.4_ Méthodes d'extraction des métabolites secondaires de plante.....	28
II.4.1 Extraction par macération.....	29
II.4.2 Extraction par décoction.....	29
II.4.3 Extraction par solvant.....	29
III.1 Activité anti-oxydante	32
III.2 Le stress oxydant.....	32
III.3 Les radicaux libres.....	33
III.3.1 Radicaux libres primaires.....	33
III.3.2 Radicaux libres secondaires	34
III.4 Les antioxydants	34
III.4.1 Classification des antioxydants selon leurs natures.....	34
III.4.1.1 Les antioxydants naturels	34
a) Les systèmes de défense antioxydants enzymatiques	34

. Superoxyde dismutases (SOD)	34
. Les glutathions peroxydases ou (GPx).....	35
. La catalase	35
b) Les systèmes de défense antioxydants non enzymatiques	35
4.1.2 Les antioxydants synthétiques	36
III.5 Avantages et inconvénients des antioxydants de synthèse	36
III.6 Les différents types d'antioxydants.....	36
6.1 Polyphénols comme antioxydants	36
III.7 Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire.....	37
III.7.1 Test de la capacité antioxydante totale.....	37
III.7.2 Test de piégeage du radical DPPH °	37
III.7.3 Test de réduction de fer (FRAP)	37
III.7.4 Test de piégeage du radical ABTS•+	38
III.8 Activité antimicrobienne.....	38
III.8.1 Les agents antimicrobiens	39
III.8.2 Mode d'action des agents antimicrobiens	39
III.8.2.1 Action germicide	39
III.8.2.2 _Action germistatique (bactériostatique et fongistatique).....	39
III.8.3 Méthodes de la détermination de l'activité antimicrobiens	39
III.8.3.1 Méthode de diffusion sur gélose (Antibiogramme).....	39
III.8.3.2 _Méthode de co-culture.....	40
III.8.3.3 _Méthode de micro dilution en bouillon.....	40
IV.1 Objectif du travail.....	43
IV.2 Choix du matériel végétal	44
. Pertinence écologique.....	44

. Valorisation patrimoniale	45
IV.3 Préparation du matériel végétal	45
IV.4 Extraction par Solvant Organique (Procédé Soxhlet)	45
IV.4.1 Conditionnement de produit végétale	45
IV.4.2 Mise en charge du système	46
IV.4.3 Dynamique d'extraction par Soxhlet	46
IV.4.4 Concentration et Conservation des d'huile végétale.....	46
IV.4.5 Évaporation du solvant.....	46
IV.4.6 Conditionnement d'extrait	47
IV.4.7 Stockage	47
IV.5 Dynamique d'extraction par macération/évaporation	47
IV.6 Rendement d'extraction.....	49
IV.7 Analyse phytochimique	49
IV.7.1 Analyse qualitative (Screening phytochimique)	49
IV.7.1.1 Flavonoïdes (Test de Shinoda).....	50
IV.7.1.2 Tannins.....	51
IV.7.1.4 Saponines (saponosides).....	52
IV.7.1.5 Les phénols.....	54
IV.8 Évaluation de l'Activité antimicrobienne.....	54
IV.8.1 Principe de la Méthode (Diffusion en Puits sur Gélose).....	54
IV. 8.1.1 Préparation de l'inoculum.....	54
IV.8.1.2 Préparation des Solutions	55
IV.8.1.4 Expression des résultats.....	56
IV.8.2 Principe de la CMI	57
IV.8.3 Détermination de la CMB	58

V .1 Rendement d'extraction.....	62
V.2 Analyse phytochimique	64
V.2.1 _Analyse qualitative	64
V.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne d'huile végétale et des différents extraits.....	65
V.3.1 Détermination de l'activité antimicrobienne.....	65
V.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB). 68	
IV.4 Evaluation de l'activité antioxydante.....	79
<i>Conclusion</i>	89
Références bibliographies.....	92

Liste des tableaux

Table 1: Synthèse des caractéristiques de <i>Silybum marianum</i> (Ben Rahal ;2012)	34
Table 2: Présentation de signification clinique et analytique des extraits	71
Table 3: Description des souches testées.....	77
Table 4: Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition(D) (Chaouche ; 2014).	78
Table 5: Rendements (%) des extractions par solvant et macération des graines de <i>Silybum marianum</i>	83
Table 6: Résultats de la phytochimie qualitative des extraits des graines de <i>S.marianum</i>	85
Table 7: Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits et d'huile végétale de graines de <i>S.marianum</i>	87
Table 8: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'huile végétale ,CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ;CMB : Concentration Minimale Bactéricide.....	91
Table 9: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait éthanoïque.....	92
Table 10: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait méthanolique	94
Table 11: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait acétonique.....	95
Table 12: : Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait éther de pétrole	96
Table 13: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait aqueux.....	98
Table 14: Valeurs des IC50 des différentes extraits, d'huile végétale et du standard(acide ascorbique)par le test du DPPH	106

Liste des figures

Figure 1: Distribution géographique mondiale de <i>Silybum marianum</i> (Zhang et al., 2024)	7
Figure 2: Morphologie des feuilles de <i>Silybum marianum</i>	8
Figure 3: Tige de chardon marie (Ben Rahal. N, 2012)	9
Figure 4: Fleurs de chardon marie	9
Figure 5: Graines de chardon Marie libres et attachés à la fleur	10
Figure 6: Morphologie de la racine.	11
Figure 7: Les principaux composés actifs de <i>S.marianum</i> et leurs structures chimiques (I. Marmouzi <i>et al.</i> , 2021).....	14
Figure 8: Structure de base des flavonoïdes (Ben Rahal ;2012).....	20
Figure 9: Structure de quelques classes des flavonoïdes (Smeu A <i>et al.</i> , 2025)	21
Figure 10: Structure chimique des deux types de tannins	22
Figure 11: Différentes actions pharmacologiques de la silymarine dans les maladies hépatiques.	26
Figure 12: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).....	33
Figure 13: Méthodologie expérimentale appliquée à l'étude des extraits végétaux.....	44
Figure 14: Montage d'extraction par l'appareil de Soxhlet.....	46
Figure 15: Incubateur à agitation continu.....	47
Figure 16: Etape de filtration des extraits.....	48
Figure 17: Evaporateur rotatif (Rotavapor)	48
Figure 18 : Mise en évidence des flavonoïdes.....	51
Figure 19: Mise en évidence les tannins.....	52

Figure 20: Mise en évidence des saponines.....	53
Figure 21: Mise en évidence les phénols.....	54
Figure 22: Schématisation de la méthode de diffusion en puits sur gélose.....	56
Figure 23 : Protocole expérimentale de la CMI et la CMB par technique de microdilution en microplaque 96 puits	58
Figure 24: zones d'inhibition produites par les extraits de silybum marianum contre les souches bactériennes testées.....	66
Figure 25 :Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents extraits de Silybum marianum par microdilution en milieu liquide.....	69
Figure 26: Résultats du repiquage sur gélose pour la détermination de la CMB des extraits de Silybum marianum vis-à-vis des souches bactériennes testées.	70
Figure 27: Décoloration du DPPH indiquant le pouvoir antioxydant de l'extrait de Silybum marianum.....	80
Figure 28: Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50% de DPPH des différents extraits en mg/ml.....	82

Liste des abréviations

S.marianum : Silybum marianum

HV : Huile végétale

AFNOR : Association Française de normalisation

ATCC : American type Culture Collection

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EOA : Espèces oxygénées actives

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

% : Pourcentage

g : gramme

h : heures

min : minutes

ml : Millilitre

mg : Milligramme

mm : Millimètre

T : Température

t : temps

R² : Coefficient de corrélation

UFC/ml : Unité formant colonie par millilitre

Introduction Générale

Introduction

Les plantes servent à de nombreux usages. L'emploi des produits naturels remonte à très longtemps, dès que l'être humain a commencé à observer son milieu. On considère que l'homme « cultivé » et civilisé existe depuis environ deux à trois millions d'années et qu'il a dû lutter pour sa survie pendant la plus grande partie de cette période. Des millénaires d'efforts et d'observations lui ont permis d'identifier les plantes utiles et d'éviter les plantes dangereuses. Depuis lors, les herbes ont occupé, dans toutes les cultures, une place importante comme source de médicaments. L'histoire de la civilisation en Égypte, en Assyrie, en Chine et dans la vallée de l'Indus montre que les savants et guérisseurs antiques utilisaient des plantes médicinales pour traiter de nombreuses maladies. Des renseignements sur ces plantes figurent dans la littérature ancienne, les récits mythologiques, le folklore, les traités de médecine, les poèmes épiques et sur des supports millénaires manuscrits, plaques de cuivre, feuilles de palmier qui se conservent encore aujourd'hui (**Khan et al ;2014**).

L'Algérie possède une flore très riche et diversifiée, avec 4 125 plantes vasculaires recensées réparties en 123 familles, et se distingue par des originalités systématiques — notamment de nombreuses espèces endémiques ainsi que par des particularités phytochimiques et pharmacologiques liées à la spécificité des substances qu'elle biosynthétise (**Bessam F. Z et Mehdadi Z ,2014**).

La richesse et la diversité végétale du pourtour méditerranéen, ainsi que la spécificité de son climat et de ses sols, en font une région privilégiée pour l'exploitation des plantes. Plusieurs espèces y poussent spontanément, ce qui représente un intérêt majeur pour l'agronomie et la médecine. C'est le cas du *Silybum marianum*, autrefois utilisé en cuisine. Aujourd'hui, cette plante est reconnue pour ses effets hépatoprotecteurs, sédatifs, digestifs, hémostatiques, anti-inflammatoires et diurétiques. Des études récentes lui attribuent également des propriétés antitumorales et anticancéreuses. Elle sert de base à plusieurs médicaments et préparations pharmaceutiques, certains étant en essais cliniques pour traiter les lésions hépatiques liées au VIH, une maladie qui demeure une menace mondiale (**Ben Rahal ; 2012**). Le chardon marie détient une valeur biologique et médicinale importante ,mais reste peu étudié en Algérie .

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

De nombreux travaux se sont intéressés à l'impact des paramètres expérimentaux notamment le procédé d'extraction et la nature du solvant sur le rendement quantitatif et l'activité antioxydante des composés phénoliques d'origine végétale. L'efficacité de cette extraction dépend d'une part des caractéristiques physico-chimiques du solvant (nature, polarité et concentration) qui conditionnent sa diffusion au sein de la matrice cellulaire, et d'autre part de la solubilité propre des analytes cibles. En raison de cette forte interdépendance entre la polarité des polyphénols et la complexité des structures végétales, le choix d'un solvant d'extraction universel demeure un défi majeur en phytochimie (**Benchachoua .A ; 2019**).

Les sources naturelles est devenu aujourd'hui plus important. Notre présente étude cherche à approfondir les connaissances sur les graines de *Silybum marianum* et à la valoriser en évaluant les activités antimicrobienne et antioxydantes de leurs composants.

Cette étude comporte deux parties :

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

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

. Dans le premier, nous avons réalisé une étude qualitative par l'extraction par macération et par solvant organique des principaux métabolites secondaires des graines de la plante (polyphénols, flavonoïdes et tanins) dans laquelle nous nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits.

Dans le deuxième, nous discutons les résultats obtenus. Enfin, nous clôturons notre étude par une conclusion générale suivie d'éventuelles perspectives et une liste de références utilisées.

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Description botanique de
Silybum marianum

I.1 Historique de la plante

Cette plante médicinale a une longue histoire puisqu'elle est déjà citée par Théophraste le nommait « Pternix », Pline l'Ancien « *sillybum* » – précisant que son jus mélangé à du miel servait à « évacuer la bile », puis par Dioscoride qui lui donna le nom de *Silybum* (du mot grec « *sillybon* » qui veut dire touffe). La plante est citée dans la Bible et dès le Moyen-Âge, elle est cultivée dans les monastères et utilisée en médecine. *Marianum* est un mot latin qui vient d'une légende du moyen âge au sujet de la vierge Marie (**Ben Rahal ;2012**) ;

Selon les écrits anciens, le chardon-Marie était déjà employé dans le bassin méditerranéen il y a environ 2000 ans. Les premiers à l'utiliser et à le décrire furent des médecins et herboristes de la Grèce et de la Rome antiques . Au Moyen Âge, les herbiers regorgent de références historiques à cette plante on trouve notamment l'éloge de John Gerard (1545-1612), qui vantait ses vertus contre la mélancolie (dépression, bile noire), ainsi que l'utilisation des racines, herbes et feuilles pour traiter gonflements et érysipèle . Au XIXe siècle, les médecins éclectiques américains l'employaient contre les varices et les affections du foie, de la rate et des reins . Vers le milieu de ce même siècle, le médecin allemand Rademacher relança l'usage du fruit du chardon-Marie pour soigner les maladies du foie (**N Qavami, 2013**).

I.2 Présentation de *Silybum marianum*

Le chardon-Marie, désigné par le taxon *Silybum marianum* (L.) Gaertn. et rattaché à la famille des Asteraceae, se caractérise à l'état spontané par un cycle de développement bisannuel (bienne). Au cours de la première phase phénologique, correspondant à l'année de transition végétative, la plante développe exclusivement un appareil foliaire agencé en rosette basale dense, soutenu par un système racinaire pivotant hyper-développé. Cette phase initiale est physiologiquement dédiée à l'accumulation de réserves carbonées et au métabolisme primaire, indispensables pour franchir la période hivernale et induire la vernalisation (besoin de froid pour déclencher la floraison). (**Marceddu et al., 2022**).

Dans différentes parties du monde, la plante est connue sous divers noms régionaux tels que (**N Qavami et al., 2013**) :

Noms communs : *Chardon-Marie, Chardon argenté ou marbré, Chardon de Notre_Dame,*

artichaut sauvage, silybe de Marie ;

Nom botanique: *Silybum marianum* Gaerthn ; *Carduu maculatus* L; *Cirsium maculatum*

Nom anglais: *Milk thistle; Blessed Milkthistle;*

Nom arabe et tunisien: *Bôq ,Chouk el Djemel, Bou-Zerwal ou SùK Ez-zerwal ,Bùzerwal, Hcoub et Lichilik ,Shawk en nassara et Hharshaf barri ;*

Nom chinois : *Shui Fei Ji ;*

Nom italien: *Cardo mariano ou Santa Maria ,Cardo di Maria ;*

Nom Grec : *Silybon.*

I.3 Classification systématique

Selon (N Qavami *et al.*, 2013), la systématique du chardon-Marie se résume comme suit :

Règne : Plantae-Plantes ;

Sous-règne : *Tracheobionta-Plantes vasculaires ;*

Super division : *Spermatophyta-Plantes à graines ;*

Embranchement : *Phanérogames ;*

Sous - embranchement : *Angiospermes ;*

Classe : *Magnoliopsida ;*

Ordre : *Astrales ;*

Famille : *Asteraceae ;*

Sous-famille : *Tubuliflores ;*

Genre : *Silybum ;*

Espèce : *Silybum marianum (L).Gaerthn.*

Le chardon-Marie est l'une des espèces médicinales les plus importantes de la famille des Astéracées. Le genre comprend deux espèces : *Silybum marianum (L.)* Gaertn., qui se distingue par ses feuilles panachées, et *S. eburneum* Coss. & Durieux, aux feuilles entièrement vertes. Toutefois, des études génétiques menées sur ces deux taxons ont montré qu'il s'agit en réalité de simples variantes d'une même espèce (N Qavami, 2013) .

I.4 Localisation et répartition géographique de plante

L'aire de répartition originelle de *Silybum marianum* s'articule principalement autour

du bassin méditerranéen et des régions adjacentes, englobant une vaste zone transcontinentale qui s'étend de l'Afrique du Nord et de certaines contrées méridionales d'Europe jusqu'au Moyen-Orient, à la péninsule Arabique et au sous-continent indien (Figure 01). Cette distribution native témoigne de l'adaptation initiale de l'espèce aux macroclimats de type méditerranéen et semi-aride, caractérisés par des étés chauds et secs et des hivers doux. Au-delà de son berceau d'origine, *S. marianum* a manifesté une remarquable plasticité écologique, favorisant son anthropisation et son acclimatation réussie dans de multiples écosystèmes mondiaux. L'espèce s'est naturalisée dans des régions géographiquement distantes et climatiquement variées, incluant :

- L'Asie tempérée : notamment le Japon.
- Les Amériques : de vastes ceintures agricoles en Amérique du Nord et en Amérique du Sud.
- L'Océanie : l'Australie et la Nouvelle-Zélande, où elle s'est largement établie.

L'Afrique subsaharienne ainsi que les zones septentrionales et centrales de l'Europe, colonisant les biotopes perturbés et les marges cultivées. (Maaloul et al., 2024).

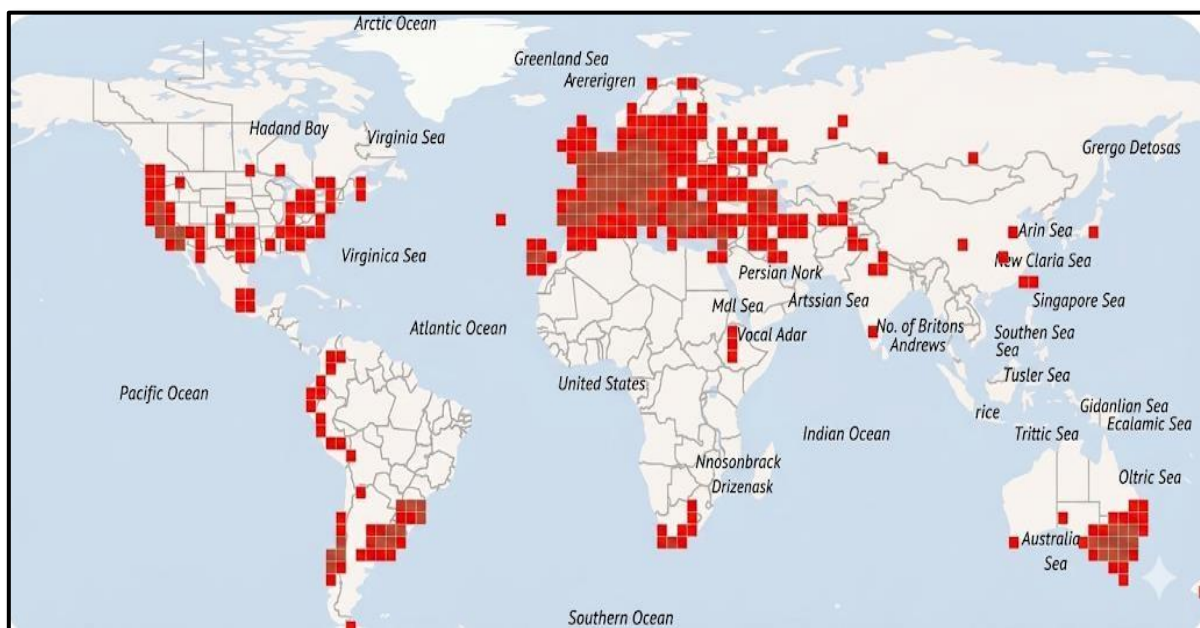


Figure 1: Distribution géographique mondiale de *Silybum marianum* (Zhang et al., 2024).

Dans le pays algérien, on retrouve cette espèce principalement sur le haut plateau steppique, au sud de l'Atlas saharien, dans les pâturages de sable et les zones humides de faible altitude (Bessam et Mehdadi., 2014) .

I.5 Description morphologique

L'espèce *Silybum marianum* (L.) Gaertn. présente une hétérogénéité phénotypique marquée, se traduisant par une importante variabilité de ses caractères morphologiques au sein des populations sauvages et cultivées. Afin d'harmoniser l'évaluation de ce polymorphisme, une liste exhaustive de descripteurs morphologiques standardisés a été rigoureusement compilée en 2016, constituant une référence essentielle pour l'étude de l'espèce (**Marceddu *et al.*, 2022**). *Silybum marianum* varie de 25 cm à 2 m de hauteur et de 5 cm à 1,5 m de diamètre de base.

I.5.1 Les feuilles

Les structures foliaires de *Silybum marianum* se distinguent par une coloration vert clair, ponctuée de maculations blanchâtres caractéristiques (Figure 02). Le limbe est découpé en lobes latéraux de morphologie ovoïde-triangulaire, dont les marges sont délimitées par des dents acérées et pointues. Sur le plan de la pilosité, bien que certaines analyses histologiques fassent état d'une surface glabrescente exempte de trichomes, les faces adaxiale et abaxiale peuvent présenter une fine pubescence localisée (**Nigmatullaev *et al.*, 2019**).



Figure 2: Morphologie des feuilles de *Silybum marianum* (présent étude)

I.5.2 Tiges

L'appareil caulinair se distingue par une stature robuste et imposante, caractérisée par une tige dressée (érigée) dont la hauteur oscille classiquement entre 40 et 200 cm (Figure 03), selon les conditions édaphiques et hydriques du milieu (**Montemurro *et al.*, 2007**). Cette structure centrale, fortement lignifiée à maturité, présente une ramification plus ou moins dense dans sa portion supérieure, optimisant ainsi le déploiement spatial des capitules floraux pour maximiser l'exposition à la lumière et l'efficacité de la pollinisation.

Sur le plan trichomique et de l'état de surface, l'épiderme caulinaire manifeste une variabilité texturale : il peut se présenter sous un aspect parfaitement glabre et lisse, ou être revêtu d'une fine pubescence blanche et aranéeuse, qualifiée de duveteuse (**Montemurro et al., 2007**).



Figure 3: Tige de chardon marie (**Ben Rahal. N, 2012**)

I.5.3 Fleures

L'appareil reproducteur se caractérise par des inflorescences typiques de la famille des Asteraceae, structurées en grands capitules globuleux (ronds), solitaires et en position terminale au sommet de l'axe caulinaire ou de ses ramifications (Figure 04). Ces structures macroscopiques imposantes peuvent atteindre des dimensions remarquables, s'élevant jusqu'à 13 cm de longueur et de diamètre. Le réceptacle floral est entouré et protégé par un involucre de bractées coriaces fortement développées. Ces bractées se terminent par de longues épines aciculaires (en forme d'aiguilles), dressées ou recourbées, constituant un système de défense efficace contre l'herbivorie. (**Rasha et al., 2021**).



Figure 4: Fleurs de chardon marie (present étude)

L'analyse des fleurons (les vraies fleurs individuelles regroupées sur le capitule) révèle un polymorphisme chromatique lié aux variations saisonnières et aux stades phénologiques :

- Période estivale : Les pièces florales affichent majoritairement des teintes pâles, oscillant du blanc au jaune crème.
- Fin d'hiver et printemps : L'inflorescence subit une transition pigmentaire, se teintant de nuances distinctes de violet ou de rose violacé (Rasha *et al.*, 2021).

I.5.4 Fruits

La productivité séminale par unité d'inflorescence s'avère hautement variable. Le nombre d'akènes générés au sein de chaque capitule est une résultante directe de l'interaction entre le potentiel génétique (génotype) et les facteurs environnementaux ou itinéraires techniques appliqués (conditions de culture) ; les valeurs moyennes s'échelonnent d'une plage initiale de 65 à 100 akènes jusqu'à des rendements optimaux d'environ 190 individus par capitule. À l'échelle macro-environnementale, la prolificité d'un seul spécimen peut excéder le seuil des 6 000 semences (Marceddu *et al.*, 2022). Ce potentiel de colonisation et de multiplication est d'autant plus performant que ces structures séminales affichent une vigueur physiologique remarquable, caractérisée par un taux de viabilité moyen s'élevant à 94 % (Marceddu *et al.*, 2022).



Figure 5: Graines de chardon Marie libres et attachés à la fleur (présent étude)

I.5.5 Racines

L'appareil souterrain de *Silybum marianum* se caractérise par un système racinaire de type pivotant, particulièrement vigoureux, long et hautement développé (figure6).

La racine principale se distingue par une morphologie épaisse, charnue à sa base puis progressivement fibreuse, s'enfonçant profondément dans les horizons inférieurs du sol (Karkanis *et al.*, 2011).

Cette architecture racinaire robuste remplit une double fonction écophysologique essentielle pour le développement de la plante :

- *Ancrage mécanique* : Elle assure une stabilité et une fixation optimales au substrat, indispensables pour soutenir une biomasse aérienne imposante pouvant atteindre jusqu'à deux mètres de hauteur lors de la phase de floraison.
- *Tolérance au stress hydrique* : En colonisant les couches profondes du sol, ce pivot fibreux confère à l'espèce une remarquable capacité d'absorption de l'eau et des nutriments, expliquant sa grande adaptabilité aux zones arides et semi-arides ainsi que son caractère compétitif dans les écosystèmes anthropisés (**Habibi et al., 2021**).



Figure 6: Morphologie de la racine. (Alaoui ismaili.S ,2016)

I.6 Cycle de vie

Le *Silybum marianum* est, du point de vue écologique, un végétal xérophile (adapté aux climats secs), nitrophile (préférence pour les milieux riche en azote) et thérophyte (poussant pendant la saison froide à l'état de graine) (**Messegue. M, 1975**), une espèce diploïde avec $2n = 34$ chromosomes. Cinq de ces chromosomes sont de type "métacentrique", "submétacentrique" et "acrocentrique" (**Qavami. N et al., 2013**).

Le chardon Marie est une plante annuelle. La germination se produit en général en automne et survient au début de la saison de croissance. Lorsqu'il se produit un retard de la saison de printemps ou encore d'hiver, elle change et devient une plante bisannuelle (**Messegue. M, 1975**). Les basses températures de l'hiver favorisent l'apparition des fleurs qui forment les bourgeons de la plante. Ces derniers donnent 55 capitules en moyenne et 190graines soit environ 6350 graines pour une seule plante (**Burnie .G, 1997**).

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

La floraison débute dès le mois de juin jusqu'au mois d'août. C'est une floraison basée sur une inflorescence de type racème de capitule. A la fin de l'été, les graines sont complètement séchées. La pollinisation est autogame (par autofécondation) ou encore entomogame (la fécondation se fait par divers moyens : les insectes, le vent, etc). Le *Silybum marianum* est une espèce hermaphrodite (ayant des organes reproducteurs des deux sexes mâle et femelle) (**Guittoneau.G et Huon.A, 1983**).

La croissance et l'allélopathie végétatives fortes pendant la germination pourraient expliquer la forte densité du chardon marie (**Gabay.R et al, 1994**).

I.7 Conditions de croissance et de développement

Pour que les principes actifs des molécules des fruits soient plus concentrés, il faut semer les plantes en automne et au printemps; car la température idéale de germination se situe autour de deux à quinze degrés Celsius. Ainsi, il faut respecter la profondeur (3 cm ou plus dans le sol) et l'espacement des graines (25 cm à 50 cm); moins de graine émergente, le rendement à l'hectare est donc moins important (**Montemurro .P et al., 2007**).

Les conditions environnementales (les densités des plantes, l'irrigation, les apports d'intrants), et les facteurs génétiques (interactions entre le génotype et l'environnement modifiant le phénotype) peuvent agir sur la croissance du chardon Marie en général et sur la concentration en silymarine des akènes en particulier (**Karkanis. A et al., 2011**).

Par ailleurs, en période de culture, l'irrigation n'est pas en général nécessaire sauf en cas de sécheresse intense. Une étude réalisée par Andrzejewska et al. rapporte que dans une région où les précipitations ont été de 180 mm au total sur toute la période de pousse des plants de *Silybum marianum*, le rendement a été compris entre 550 et 1680 kg de plante à l'hectare et de 13,3 à 35,4 kg de silymarine produite à l'hectare malgré les faibles précipitations (**Andrzejewska J et al., 2011**).

En raison de son cycle de vie et de sa croissance, le chardon Marie a la capacité d'envahir une vaste étendue (**Ben Rahal ;2012**). Le tableau 1 résume les caractéristiques botaniques essentielles du chardon Marie.

Table 15: Synthèse des caractéristiques de *Silybum marianum* (Ben Rahal ;2012)

Type d'inflorescence	Racème de capitule
Répartition de sexes	Hermaphrodite
Type de pollinisation	Entomogame,autogame
Saison de floraison	Juin à aout
Genre de fruit	Akène
Mode de dissémination	Anémochore
Type d'habitat	Friches vivaces
Zone de répartition	Méditerranée

I.8 Composition chimique de la graine

La recherche sur la chimio diversité de *S. marianum* a débuté avec les recherches de **Schindler en 1952** et les rapports de **Wagner en 1968**, qui ont isolé un complexe de silymarine à partir des fruits dégraissés .

La silymarine est un mélange de flavonoïdes polyphénoliques extrait directement des fruits séchés (graines) ou des plantes entières de chardon-Marie , ou encore de ses cultures cellulaires . La variation de la composition du mélange de silymarine et de sa teneur en flavonolignanes est fortement influencée par plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques de *S. marianum* , notamment le génotype , le cultivar, l'origine géographique (type de sol et climat) et les conditions agronomiques (période de semis, irrigation, fertilisation, post-récolte, maturité) .

Cependant, à ce jour, il n'existe aucune évaluation claire des profils complets de flavonolignanes dans diverses préparations de silymarine , ainsi que les flavonolignanes de la silymarine possèdent diverses actions pharmacologiques (**I.Marmouzi et al ., 2021**).

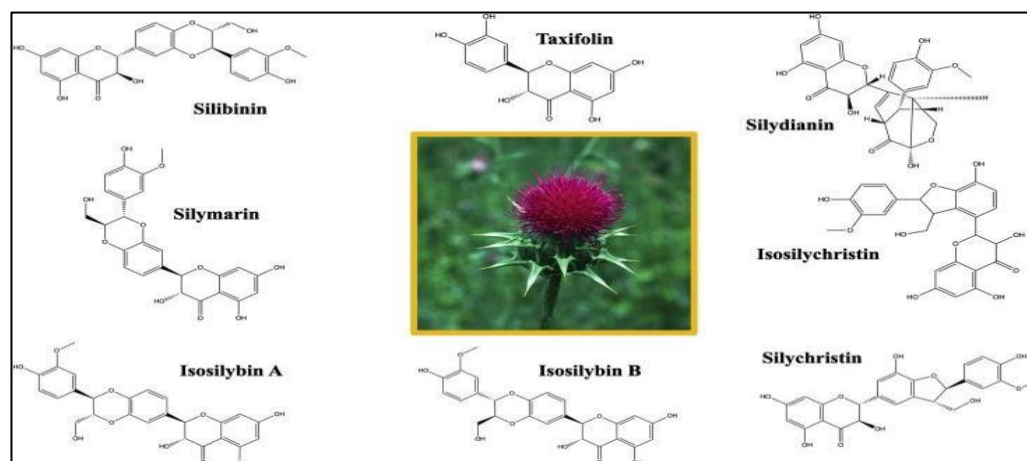


Figure 7: Les principaux composés actifs de *S. marianum* et leurs structures chimiques (I. Marmouzi *et al.*, 2021).

Le Silybum marianum est une plante riche en composés actifs d'un point de vue thérapeutique, ses vertus étant attribuées à la présence de la silymarine. La graine de *S. marianum* renferme une concentration importante en silymarine (qui peut être isolée ou séparée des autres constituants de l'huile), ce qui explique l'attention accordée à cette partie de la plante. En réalité, la graine renferme entre 4 et 6% de silymarine, dont une majorité de 70-80% sont des flavonolignanes et une minorité de 20-30% des composés polyphénoliques oxydés non identifiés. Cette graine renferme également des lipides à hauteur de 30-20 %, des protéines de 25 à 30 % et des minéraux dont les concentrations fluctuent selon l'organe examiné. Le chardon Marie offre une concentration élevée en calcium dans l'ensemble de la plante (feuilles, graines, tige, racines), conférant ainsi à cette plante une grande valeur nutritive. Le phosphore demeure le minéral caractéristique des graines de chardon Marie, avec une concentration de 0,6 g.kg-1MS (sur base de matière sèche) supérieure à celle des feuilles et de la tige (0,2 et 0,15 g.kg-1MS respectivement). Les feuilles contiennent une quantité significative de sodium, de magnésium et de calcium, tandis que la tige présente une forte concentration en potassium. L'huile produite à partir des graines de *Silybum marianum* se compose principalement de lipides, de vitamine E (50 à 60 mg/100g et de flavonoïdes (0,25%). Sa forte concentration en acides gras insaturés (56% de polyinsaturés et 21% de monoinsaturés) la rend appropriée pour les diètes anti-cholestérol et pour la prévention des troubles cardiovasculaires (Ben Rahal ;2012).

I.9 Usage traditionnel de la plante *Silybum marianum*

Le Silybum marianum est employé dans la médecine traditionnelle pour ses propriétés digestives, anti-inflammatoires, de tonique antinéoplastique et diurétique. Durant le dix-

neuvième siècle, il a été utilisé pour traiter des affections du foie, du rein, de la rate et des calculs biliaires, ainsi que des problèmes liés à la grossesse et aux menstruations. Au cours des années 50, les éléments présents dans le fruit du chardon Marie ont été extraits et l'ensemble des études se sont focalisées sur ces composantes qui constituent précisément 4 à 6% du fruit sec de la plante. Ces substances ont été réparties dans des gélules standardisées contenant entre 70 et 80 % de leur composition (**Ben Rahal ;2012**).

En Europe, le chardon-Marie est employé pour traiter la jaunisse et diverses autres affections liées à la bile, aussi pour traiter les fièvres récurrentes, l'œdème et les problèmes utérins. Une infusion de celle-ci pourrait avoir des effets positifs en application externe dans le traitement du cancer. Que ce soit en infusion ou en nourriture, on le qualifie de galactagogue sûr. On utilise souvent la silymarine comme traitement complémentaire lors d'une intoxication alimentaire causée par des champignons.

Racine : On peut consommer la racine bouillie en tant que légume. Feuilles : Elles ont des propriétés sudorifiques et purgatives. Les jeunes feuilles sont comestibles en salade tandis que les boutons floraux sont conseillés aux personnes atteintes de diabète.

Graines : Ces dernières possèdent des propriétés émollientes, antispasmodiques et piquantes. Elles servent au traitement de la jaunisse ainsi que des calculs hépatiques et biliaires, et sont également efficaces dans la maîtrise des hémorragies. Les préparations galéniques, qu'elles soient basées sur la graine ou l'huile, ainsi que les extraits alcooliques de la graine et, dans une moindre mesure, de la plante en général, stimulent le péristaltisme de l'intestin grêle. De plus, elles agissent comme des purgatifs doux. On utilise les graines comme alternative au café.

Ses fleurs et ses racines ont été employées dans la cuisine européenne en tant que légume, on peut consommer la racine bouillie en tant que légume, tandis que son akène sert d'alternative au café. On le considère comme une alternative aux épinards. On utilise la tête florale en médecine. Elle sert de traitement contre les toxines présentes dans les amanites (**Porwal et al ;2019**).

I.10 *Silybum marianum* en thérapeutique

La silymarine, un extrait complexe de bioflavonoïdes dérivé des graines séchées du chardon-Marie [*(Silybum marianum* (L.) Gaernt. (Fam. Asteraceae/Compositaceae)], a démontré cliniquement son action protectrice pour le foie. Sa faible toxicité, sa

pharmacocinétique avantageuse, ses effets antioxydants, détoxifiants, préventifs, protecteurs et régénérateurs significatifs, ainsi que ses effets secondaires comparables à ceux d'un placebo, confèrent à la silymarine un intérêt majeur et une sécurité optimale pour une utilisation thérapeutique.

On a examiné les vertus thérapeutiques de la silymarine et de son ingrédient principal, la silibinine, dans le traitement de diverses affections telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la septicémie, les brûlures, l'ostéoporose, le diabète, la cholestase et l'hypercholestérolémie. Grâce à son action apoptotique, dépourvue d'effets cytotoxiques et offre des perspectives potentielles pour le traitement de différentes formes de cancer.

La Silymarine fait actuellement l'objet d'études pour ses vertus neuroprotectrices, néphroprotectrices et cardioprotectrices dans le traitement de diverses affections, en raison de son puissant potentiel antioxydant. En outre, elle a des effets de protection fœtale (contre les effets de l'alcool) et stimule la production de prolactine, et son emploi est sûr pendant la grossesse et l'allaitement. Pour finir, le secteur cosmétique se penche sur les effets antioxydants et de protection solaire de la silymarine. Il est essentiel de mener d'autres recherches cliniques et de fournir des preuves scientifiques supplémentaires pour prouver que la silymarine et la silibinine sont bénéfiques dans le traitement de différentes maladies, afin de valider les divers effets pharmacologiques associés aux flavonolignanes(Milié et al ;2013).

I. 11 Toxicité

Aucune toxicité aiguë, subaiguë ou chronique connue (même après administration de 20 g/kg de silymarine per os chez la souris). Le Chardon-Marie est considéré comme non toxique aux doses généralement préconisées. Pour rappel, la silymarine est prioritairement excrétée par la bile sous forme de sulfo- et glucuroconjugués (20 à 40 % en 24 heures) et par le rein (3 à 7 %) sans aucune accumulation.

Par manque de données, le Chardon-Marie est déconseillé par les instances officielles (OMS):

- Chez la femme enceinte ou allaitante, et ceci malgré son indication traditionnelle pour favoriser l'allaitement !

- Chez l'enfant sans surveillance médicale. Il faudra également tenir compte des propriétés cholagogues de la plante et donc du risque de migration de lithias vésiculaire (Charrié. JC *et al.*, 2017).

***Chapitre II : Métabolites secondaires
et activités pharmacologiques des
graines de *Silybum marianum* L.***

II.1 Métabolites secondaires des plantes

On appelle « secondaires » les métabolites des plantes, en contraste avec les métabolites primaires tels que les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés varient selon les espèces et, même si leurs fonctions sont encore floues, il est néanmoins évident qu'ils jouent un rôle dans les interactions de la plante avec les êtres vivants qui l'entourent. Ils sont sans doute des composants cruciaux de la coévolution entre les plantes et les êtres vivants, tels que les parasites, les agents pathogènes et les prédateurs, mais également les pollinisateurs et les disperseurs. Ces diverses relations ont conduit à une diversification extrême des composés secondaires (KRIEF, 2004)

Les plantes sont une source abondante de métabolites secondaires possédant des activités biologiques intéressantes. Généralement, ces métabolites secondaires représentent une ressource significative offrant une multitude de configurations structurales et de caractéristiques. On peut mentionner comme exemples significatifs de ces composés les flavonoïdes, les phénols et les glycosides phénoliques, ainsi que les saponines et les glycosides cyanogéniques.

Ces composés ont été produits par le métabolisme primaire ou secondaire de organismes vivants. Les métabolites secondaires sont des composés d'une grande diversité taxonomique et chimique, dont le rôle demeure mystérieux. Ils sont couramment employés en médecine humaine, vétérinaire, agriculture, recherche scientifique et dans une multitude d'autres secteurs.

Le Silybum marianum (L) est une plante médicinale importante qui renferme des huiles essentielles et divers métabolites secondaires (Padma *et al.*, 2019).

II.2 Classification des métabolites secondaires

La catégorisation des métabolites secondaires végétaux se base sur leurs caractéristiques chimiques et les regroupe en trois types de molécules : les composés phénoliques, les terpènes (terpénoides ou isoprénoides) et les alcaloïdes (composés azotés) (BOUAZIZ, 2014).

Les composés phytochimiques sont généralement classés en deux catégories, soit les constituants primaires et secondaires, selon leur fonction dans le métabolisme des plantes. Les éléments de base renferment des sucres usuels, des acides aminés, des protéines et de la

chlorophylle, tandis que les composants secondaires englobent les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines, les tanins, ainsi que divers autres composés. La plante *Silybum marianum* possède une valeur thérapeutique grâce à ses éléments phytochimiques qui entraînent un effet pharmacologique clairement établi sur l'organisme humain (Syed .M et al ;2011).

II.2.1 Les composés phénoliques

L'appellation de composés phénoliques englobe une grande variété de substances qui ont un cycle aromatique contenant un ou plusieurs groupes hydroxyles, aussi ils sont appelés polyphénols, constituent un ensemble de métabolites secondaires présentant une large variété de structures. Ils se caractérisent par leur hétérogénéité tant sur le plan de la composition que de la structure, allant des molécules simples telles que les acides phénoliques à des éléments fortement polymérisés comme les tanin .

Les voies principales de synthèse des cycles aromatiques dans les composés phénoliques des plantes se résument en deux grandes catégories :

a- La voie shikimate

représente une voie métabolique cruciale pour un organisme végétal, car on estime que 20 à 35 % des composés carbonés biosynthétisés y trouvent leur origine

b- La voie des phénylpropanoïdes

L'assemblage du phénylpropanoïde est un processus métabolique secondaire, propre au règne végétal. Il mène, à partir de la phénylalanine (Phe), à la production d'une grande variété de composés dont la composition peut différer selon les espèces végétales.

c_ La voie de l'acétate/malonate

Cette biosynthèse a favorisé l'apparition d'une vaste gamme de molécules propres à une espèce végétale, à un organe ou à un tissu particulière (BENCHAACHOUA.A ;2019).

II.2.1.1 Classification des polyphénols

Un grand nombre de structures varie au sein de toutes les catégories de composés phénoliques, en fonction du nombre et de la localisation des groupements hydroxyles et méthoxyles sur le squelette fondamental.

II. 2.1.1.1 Phénols simples

Les phénols (C6) sont des composés aromatiques, dérivés du benzène, où le groupe hydroxyle OH est lié à un carbone d'un cycle benzénique. Dans la nature, le catéchol, le

phloroglucinol, l'orcinol et le pyrogallol sont difficilement trouvables (Harbone ;1998).

II.2.1.1.2 Acides phénolique simples

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

II.2.1.1.2.1 Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques se retrouvent principalement sous leur forme libre. Ils sont des dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1) et apparaissent fréquemment sous la forme d'esters ou de glycosides, tels que l'acide benzoïque, l'acide gallique, l'acide vanillique, etc (Collin & Crouzet, 2011).

II.2.1.1.2.2 Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques peuvent se présenter sous forme estérifiée par l'acide quinique, généralement en association avec des molécules organiques ; par exemple : Acide caféique, acide coumarique et acide cinnamique (Collin & Crouzet, 2011).

II.2.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes font partie de la catégorie des polyphénols, un groupe de métabolites secondaires des plantes considéré comme l'un des plus significatifs. Ils se retrouvent en grande quantité dans divers organes des plantes, comme les racines, les tiges et les feuilles. Habituellement hydrosolubles et aisément extrayables, ils remplissent une fonction essentielle en tant que pigments végétaux et ont été employés depuis l'époque antique comme teintures naturelles (BENCHAACHOUA.A ;2019).

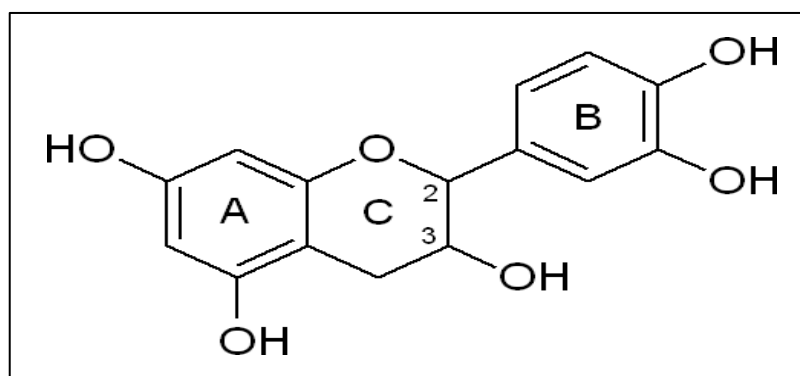


Figure 8: Structure de base des flavonoïdes (Ben Rahal ;2012).

Les principaux groupes peuvent être définis et différenciés comme suit :

II.2.2.1 Les flavonols

Représentent la classe de flavonoïdes la plus répandue dans les aliments et les plus représentatifs sont la quercétine et le kaempférol. Ils se retrouvent habituellement en quantité

plutôt modeste, soit entre 15 et 30 mg par kg de matière fraîche, à l'exception des oignons, du raisin, des brocolis et des poires (Manach et al ;2004).

II.2.2.2 Les flavones

On trouve en abondance chez les plantes supérieures sous forme des aglycones ou des glycosylés. Par exemple, la lutéoline et on peut mentionner aussi la tangerétine 16, une flavone naturellement polyméthoxylée, parmi les flavonoïdes (Macheix et al., 2005).

II.2.2.3 Les flavanones et hydroflavonoles

Ils sont habituellement glycosylés par un disaccharide en position 7. On les retrouve dans les tomates et certaines herbes aromatiques comme la menthe, mais leur présence est particulièrement notable dans les agrumes (Manach et al., 2004 ; Macheix et al., 2005).

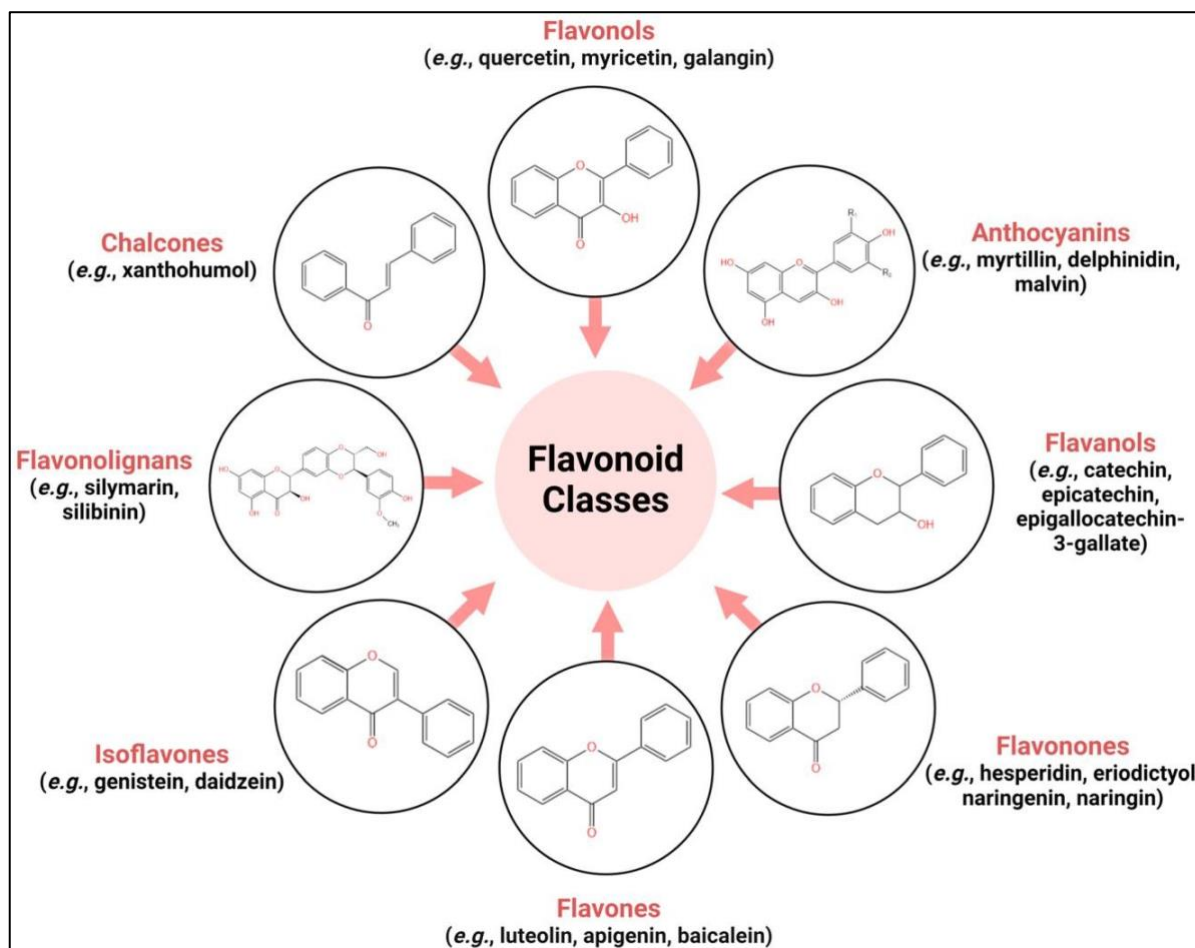


Figure 9: Structure de quelques classes des flavonoïdes (Smeu A et al., 2025)

II.2.2.4 Les flavanols

Il existe sous deux formes: une forme monomère (les catéchines) et une forme polymère (les proanthocyanidines). À la différence d'autres groupes dans le domaine de l'alimentation, les flavonols ne sont pas présents sous forme glycolytique (Lakenbrink et al., 2000).

II.2.3 Tannins

On trouve fréquemment des tanins dans le monde végétal ; ce sont des composés polyphénoliques hydrosolubles, qui ont la capacité de tanner la peau, c'est-à-dire de lui conférer une résistance à la putréfaction. Cette caractéristique est due à leur faculté à s'associer avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides, en plus des réactions classiques des phénols, montrent la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (SEREME A *et al.*, 2008). Ils sont classés en deux groupes (figure 9) :

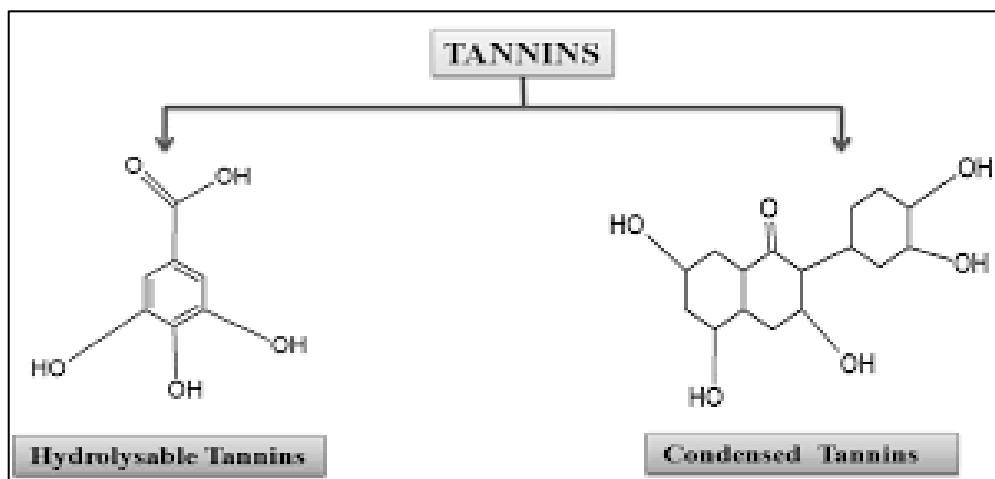


Figure 10: Structure chimique des deux types de tannins

II. 2.3.1 Les tannins hydrolysables

Sont des molécules constituées d'un sucre associé à l'acide gallique ou à ses dérivés, tels que l'acide ellagique. On les désigne sous le nom de tanins pyrogalliques ou ellagitanins, et leur hydrolyse peut se faire aisément par des réactions chimiques ou enzymatiques (SEREME A *et al.*, 2008).

II.2.3.2 Les tannins condensés ou les proanthocyanidols

Sont des tannins non hydrolysables proviennent de la polymérisation de molécules de flavanes élémentaires (flavane ol-3, flavane ol-4, flavane diol –3,4). On les appelle également tanins « catéchiques ». On a isolé ou identifié les proanthocyanidols dans toutes les catégories de plantes (SEREME A *et al* ;2008).

II.2.4 Les coumarines

Les coumarines tirent leur appellation de « Coumarou », le nom commun de la fève tonka (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae), dont la coumarine a été extraite en 1820 (BENCHAACHOUA.A ;2019).

On se retrouvent en grande quantité dans le règne végétal. Il s'agit de substances organiques, naturelles et aromatiques, composées de neuf atomes de carbone et définies par le noyau 2H-1-benzopyrane-2-one. Avec les flavonoïdes, les chromones et les isocoumarines, elles constituent un groupe considérable de composés. Les coumarines simples diffusent un parfum plaisant, semblable à celui de la vanilline, et ont été employées dans la création de parfums et d'arômes artificiels (MPONDO *et al.*, 2015).

II.2.5 Les alcaloïdes

Sont des composés organiques hétérocycliques contenant de l'azote, provenant des plantes, qui possèdent des caractéristiques basiques et ont une saveur amère. Ils sont issus de l'ornithine, de la tyrosine, du tryptophane et d'autres acides aminés. Ils possèdent des vertus curatives ou sont au contraire extrêmement toxiques pour les prédateurs. Certains possèdent des propriétés antidouleur telles que la morphine ou la codéine. Ils jouent aussi le rôle d'agents antipaludiques, à l'instar de la quinine. Un alcaloïde comme la vinblastine, issue de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), s'est révélé bénéfique pour le traitement de certaines sortes de cancer (BENCHAACHOUA.A ;2019).

II.2.6 Les saponosides

Aussi connus sous le nom de saponines, tirent leur nom du mot latin « sapo », qui veut dire « savon », en raison de leur capacité à produire de la mousse lorsqu'ils sont agités dans l'eau. Cette propriété est due à leur caractère amphiphile, qui associe un noyau aglycone lipophile à un ou plusieurs résidus glucidiques hydrophiles, leur conférant une activité tensioactive dans un milieu aqueux (Manach *et al.*, 2004).

Selon la pharmacologie, les saponines sont reconnues pour leurs diverses interactions biologiques, notamment antipyrétiques, antalgiques, immunomodulatrices, anti-inflammatoires, anticoagulantes et anti-athérosclérotiques (Namsou et In-Seon, 2001).

II.2.1.2 Propriétés chimiques des polyphénols

Le cycle benzénique et la présence d'une ou plusieurs hydroxyles (groupe phénol) confèrent aux polyphénols des caractéristiques fondamentales.

II.2.1.2.1 Acidité

La caractéristique principale des polyphénols est leur nature acide. Habituellement, il s'agit d'acides faibles ($pK_a \leq 10$), mais leur pK_a est influencé par la structure complète de la molécule ainsi que par la localisation des groupements phénoliques et le type de substituants présent sur le noyau aromatique (Bouras ;2015).

II.2.1.2.2 Liaison par hydrogène

En raison de l'acidité du proton du groupe OH, les phénols agissent comme des donneurs de liaison hydrogène (liaison H). Ils sont également des accepteurs de liaison H. En réalité, c'est uniquement la paire libre de l'atome O qui n'est pas associée au cycle qui a la capacité d'établir un lien H venant d'un donneur. Par conséquent, un phénol a la capacité de donner une liaison H tout en n'étant en mesure d'en recevoir qu'une seule. Il est à noter que ces liaisons H se renforcent de manière mutuelle (coopérativité). Par exemple, en fournissant une liaison H, le phénol prolonge sa liaison OH. Cet état de pré-dissociation augmente la densité électronique au niveau du centre O, renforçant ainsi son rôle en tant qu'accepteur de liaison H (BENCHAACHOUA.A ;2019).

II.2.1.2.3 Nucléophilique

L'atome d'oxygène et les atomes de carbone situés en ortho et para du groupe OH sont responsables de la nucléophilie des composés phénoliques. Cette caractéristique est la source des réactions de substituants électrophiles aromatiques (comme l'alkylation, l'acylation, etc.) qui favorisent spécifiquement les positions ortho et para (Nkhili ;2009).

II.2.1.2.4 La polarisabilité

La capacité des phénols à être polarisés favorise l'établissement de puissantes interactions moléculaires de dispersion (composant attractif des interactions de Van der Waals) avec d'autres substances polarisables. Par conséquent, dans un milieu aqueux, l'interaction entre le noyau benzénique non polaire du phénol et une autre entité polarisable comme un autre cycle aromatique est facilitée par l'effet hydrophobe (Nkhili ;2009).

II.2.1.2.5 Complexation des protéines

De nombreuses recherches ont été menées sur les relations entre les protéines et les polyphénols, compte tenu de leur pertinence dans divers domaines. Ces associations découlent essentiellement d'interactions hydrophobes entre les noyaux aromatiques des polyphénols et divers acides aminés hydrophobes des protéines, ainsi que de liaisons hydrogène créées entre les groupements hydroxyles des polyphénols et les groupements polaires des protéines (comme le carboxyle, l'amine et l'amide) (BENCHAACHOUA.A ;2019).

II.2.1.2.6 Chélation des métaux

Un grand nombre de composés phénoliques possèdent des groupes structuraux qui peuvent établir des complexes avec des ions métalliques tels que le Fe^{2+} . Les flavonoïdes, grâce à leur composition chimique distincte, ont la capacité de chélater des dommages métalliques en formant des composés complexes non actifs) (Malešev et Kuntić, 2007).

II.2.1.2.7 Piégeage des radicaux libres

Les polyphénols ont une activité antioxydante significative due à leur faible potentiel de réduction-oxydation. Ils ont la capacité de neutraliser rapidement divers radicaux libres oxydants, tels que le superoxyde, les peroxydes, les alkoxydes et les radicaux hydroxydes, en procédant à un transfert d'hydrogène. Les radicaux créés sont par la suite stabilisés par résonance autour du noyau aromatique, ce qui restreint l'expansion des réactions radicalaires (Bouras ;2015).

II.3 Propriétés biologiques et pharmaceutiques des composés bioactifs de *Silybum marianum*

Les propriétés biologiques et pharmacologiques du chardon-Marie sont attribuées à un complexe de flavanolignanes, la silymarine, qui a été isolée pour la première fois à partir des fruits (akènes), (parfois appelés à tort « graines »), en 1968 (Qavami N ;2013).

La silymarine est un extrait sec normalisé provenant des graines de chardon marie, reconnu et établi, qui comprend principalement des flavanolignanes (environ 70 % à 80 % p/p), ainsi que des composés polyphénoliques polymères et oxydés formant un mélange de flavonoïdes. Les flavanolignanes, initialement identifiés dans les graines de *Silybum marianum*, représentent un groupe plutôt limité de composés où la section flavonoïde de la molécule est combinée à un lignan.

La silymarine comprend principalement la silybine, l'isosilybine (A et B), la silydianine et la silychristine. Plusieurs études détaillent la séparation et la quantification de la silymarine contenue dans l'extrait issu de diverses parties de la plante, en différentes saisons, dans diverses régions géographiques, etc (ABNAVOLI *et al.*, 2018).

Le chardon-Marie (notamment ses composants silymarine et silybine) exerce une action hépatoprotectrice via plusieurs mécanismes : activité anti-inflammatoire, antioxydante, blocage des toxines, stimulation de la synthèse protéique et effet antifibrotique (Qavami N ;2013).

Ses applications pharmacologiques efficaces couvrent :

- La protection du foie (hépatoprotection)
- Les maladies hépatiques alcooliques
- L'hépatite virale
- La cirrhose hépatique

- Les atteintes hépatiques toxiques et médicamenteuses
- L'intoxication par les champignons
- Le diabète chez les patients atteints de maladie hépatique chronique
- Un effet hypocholestérolémiant (réduction du cholestérol)

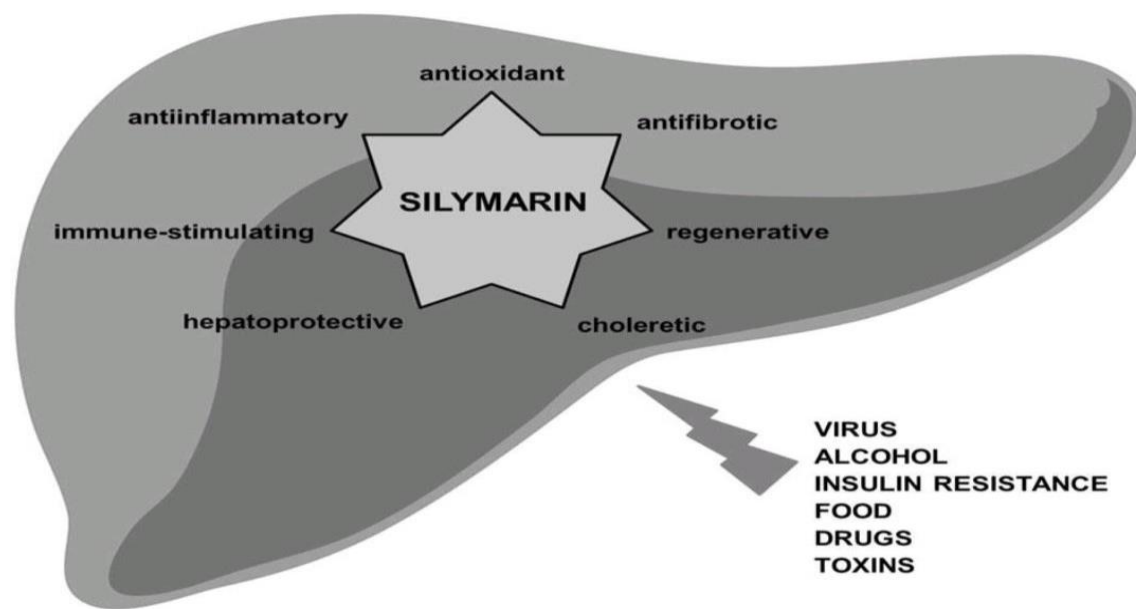


Figure 11: Différentes actions pharmacologiques de la silymarine dans les maladies hépatiques.

Figure illustrant les diverses actions pharmacologiques de la silymarine dans les maladies hépatiques : agent de prévention du cancer (action directe de piégeage des radicaux libres), antifibrotique (inhibe la transformation des cellules stellaires en myofibroblastes), régénératrice (stimule la régénération hépatique), cholérétique (provoque une régulation à la hausse de la sécrétion des sels biliaires), hépatoprotectrice (inhibe la libération de cytokines), immunostimulante (empêche l'activation de certaines réponses inflammatoires) et anti-inflammatoire (inhibition de la voie NF- κ B) (Huda Khalil et al ;2020).

II.3.1 Propriétés antioxydantes

On a examiné les vertus antioxydantes du chardon-Marie en analysant son interaction avec des espèces réactives de l'oxygène (ERO), ainsi que des agents oxydants biologiques significatifs tels que le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^-) et l'acide hypochlorite ($HClO$). Kiruthiga et al ont démontré que l'administration de silymarine stimule l'activité des enzymes antioxydantes, notamment la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR) et la glutathion-transférase (GST). Parallèlement, cette action entraîne une

réduction des niveaux de malondialdéhyde (MDA), un indicateur de la peroxydation lipidique, dans les globules rouges exposés à l'H₂O₂ (Huda Khalil et al ;2020).

II.3.2 Action anti-inflammatoire

Les effets anti-inflammatoires de la silymarine sont liés à l'inhibition du facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B), qui régule et coordonne l'expression de divers gènes impliqués dans l'inflammation, la survie cellulaire, la différenciation et la croissance (Qavami N ;2013) .

II.3.3 Activité anticancéreuse

C'est une procédure en plusieurs phases, initiée par une modification de l'expression des facteurs de transcription et des protéines qui participent à la multiplication cellulaire, au contrôle du cycle cellulaire, à la différenciation, à l'apoptose, à l'angiogenèse, à l'invasion et aux métastases. La silymarine et la silybine régulent l'équilibre entre la survie des cellules et l'apoptose en affectant l'expression des contrôleurs du cycle cellulaire et des protéines liées à l'apoptose. On a prouvé l'efficacité de la silymarine contre divers cancers, notamment le cancer du sein humain, le cancer de la peau, le cancer de la prostate dépendant et indépendant des androgènes, ainsi que le cancer du col de l'utérus, le cancer du côlon, le cancer de l'ovaire, le carcinome hépatocellulaire, le cancer de la vessie et les cellules cancéreuses pulmonaires (Huda Khalil et al ;2020).

II.3.4 Activité antidiabétique

L'utilisation de la silymarine comme agent antihyperglycémique est justifiée par ses caractéristiques qui contribuent à diminuer le taux de sucre sanguin à jeun et le niveau d'insuline. L'extrait aqueux de chardon-Marie a également démontré ses fortes propriétés hypoglycémiantes et antihyperglycémiques dans des modèles expérimentaux de diabète chez les animaux (Qavami N ;2013).

II.3.5 Cirrhose et maladie hépatique due à l'alcool

Des recherches réalisées en Autriche et en Hongrie ont démontré que la silymarine normalisait les enzymes hépatiques sériques et les niveaux de bilirubine totale chez des patients souffrant d'une affection hépatique liée à l'alcool, tout en optimisant l'histologie du tissu hépatique. Dans le cas des patients souffrant de cirrhose, un traitement prolongé (environ 41 mois) à base de silymarine à hauteur de 420 mg par jour a provoqué une amélioration notable de la survie comparativement au groupe recevant un placebo (Huda Khalil et al ;2020).

II.3.6 Activité hépatoprotectrice

Ces effets ont été attribués au pouvoir antioxydant direct et/ou indirect de la silymarine, notamment en tant que piègeur d'espèces réactives de l'oxygène, piègeur de radicaux phénylglyoxyliques et cétyliques, et antioxydant brisant la chaîne (Qavami N ;2013).

II.3.7 Intoxication aux champignons

Le traitement de l'intoxication par les amanites est la plus notable application de la silymarine. Les amanites renferment deux hépatotoxines d'une grande puissance, à savoir l'amanitine et la phalloïdine. Lorsque la silymarine a été administrée dans les 24 heures, il a été possible d'éviter des lésions hépatiques sévères (jusqu'à la mort) (Huda Khalil et al ;2020).

II.3.8 Activité hypocholestérolémiant

La silymarine, et plus particulièrement sa fraction polyphénolique (PF), possède une activité hypocholestérolémiant démontrée chez le rat et le lapin soumis à un régime riche en cholestérol (HCD). Elle réduit le cholestérol hépatique et plasmatique, notamment le LDL-cholestérol. Les mécanismes impliqués incluent l'inhibition in vitro de l'HMG-CoA réductase par la silybine, l'amélioration de la liaison des LDL aux hépatocytes, et surtout une réduction significative de l'absorption intestinale du cholestérol. Cette dernière entraîne une baisse des triglycérides et du cholestérol dans le foie, ainsi qu'une amélioration du profil lipidique plasmatique (Qavami N ;2013).

II.4_ Méthodes d'extraction des métabolites secondaires de plante

L'extraction est une phase cruciale dans l'isolement et la récupération des principes actifs de ces métabolites présents dans le matériel végétal, tout comme leur identification (Quy Diem Do *et al.*, 2014)..

On dispose de plusieurs méthodes pour obtenir des métabolites à partir de plantes, comme l'extraction Soxhlet, la macération, l'extraction par fluide supercritique, l'extraction par eau sous-critique et l'extraction à ultrasons. Toutefois, l'efficacité de l'extraction ne liée pas uniquement à la technique d'extraction, mais aussi au solvant employé lors de cette opération (Quy Diem Do *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont démontré que le choix de la technique d'extraction sera déterminée par les caractéristiques des composés (comme les classes spécifiques de molécules phénoliques telles que les flavonoïdes, les acides phénoliques, etc.), le type d'échantillon

(graines, feuilles, brindilles) et sa condition physique. Peu importe la méthode sélectionnée, les conditions d'extraction peuvent être modifiées en fonction de la préparation de l'échantillon (Antolovich et al, 2000).

II.4.1 Extraction par macération

Est l'une des méthodes d'extraction traditionnelles les plus fréquemment utilisées pour déterminer la concentration en métabolites secondaires dans les plantes médicinales. La macération est la technique d'extraction solide-liquide la plus élémentaire, qui implique le contact du matériel végétal avec le solvant, avec ou sans agitation, à température ambiante ou à une température plus haute pour une période précise. Elle débute par la sélection d'un solvant d'extraction approprié. Suite à la diffusion du solvant dans les cellules végétales, le processus se poursuit avec la solubilisation de composés bioactifs qui ils vont se déplacer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de concentration soit atteint (BENCHAACHOUA.A ;2019).

II.4.2 Extraction par décoction

L'extraction solide-liquide utilisée en médecine traditionnelle est effectuée par la technique de la décoction. Cette procédure implique l'obtention de principes actifs d'une plante grâce à l'action d'un liquide porté à ébullition. La décoction est toujours utile pour l'extraction des composés phénoliques, étant donné qu'il s'agit d'un processus destiné à l'extraction de principes actifs non thermolabiles (BENCHAACHOUA.A ;2019).

II.4.3 Extraction par solvant

La méthode normalisée du Soxhlet (NF V 03_903) . Cet instrument, nommé d'après son créateur Franz Von Soxhlet, facilite l'extraction à chaud d'un solide par un solvant. Les échantillons prélevés seront soumis à un évaporateur rotatif pour supprimer toute présence de solvants d'extraction.

On retrouve fréquemment la méthode d'extraction par Soxhlet dans les publications académiques (Luque de Castro et Garcia-Ayuso, 1998). C'est une approche traditionnelle d'extraction solide-liquide.

L'un des premiers bénéfices à mentionner est que ce processus d'extraction se réalise en mettant le solvant d'extraction en interaction avec la matrice solide, ce qui favorise le déplacement de l'équilibre de transfert vers le solvant. L'extraction peut se poursuivre aussi longtemps qu'il y a encore des substances extractibles dans la matrice végétale.

L'inconvénient majeur réside dans l'obligation de porter les solvants à leur point

d'ébullition lors de l'extraction, ce qui peut conduire à la décomposition des molécules sensibles à la chaleur. En comparaison avec les autres méthodes traditionnelles (entraînement à la vapeur et hydrodistillation) (**Ben Rahal ;2012**).

Chapitre III : Activités biologiques et biochimiques

III.1 Activité anti-oxydante

L'emploi de molécules antioxydantes synthétiques fait actuellement l'objet de controverses en raison des dangers toxicologiques éventuels. Actuellement, on recherche de nouvelles sources végétales pour des antioxydants naturels tels les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols, dont l'efficacité est reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine. Effectivement, les polyphénols sont des composés naturels que l'on trouve couramment dans le règne végétal et qui gagnent en importance, notamment en raison de leurs effets positifs sur la santé. Leur fonction d'antioxydants naturels attire de plus en plus l'attention pour la prévention et la lutte contre le cancer, les maladies inflammatoires et cardiovasculaires. De plus, ils sont également employés comme ingrédients complémentaires dans les secteurs de l'agroalimentaire, de la pharmacie et des cosmétiques (BOUGANDOURA N et BENDIMERAD N ;2013).

Dans des conditions normales et courantes, des radicaux libres sont constamment générés en petite quantité ; cette production physiologique est sous le contrôle de systèmes de défense qui s'adaptent au niveau de radicaux présents. Dans des conditions normales, on considère que l'équilibre entre antioxydants et pro-oxydants est maintenu. Dans le cas où cela ne se produirait pas, que ce soit à cause d'un manque d'antioxydants ou d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est désigné comme un stress oxydant (Favier, 2003)..

III.2 Le stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production d'espèces oxygénées activées (EOA) et les mécanismes de défense antioxydants de l'organisme, au bénéfice des premières. Nos habitudes de vie (comme le tabagisme, l'alcoolisme, l'obésité et les exercices physiques intenses), ainsi que nos pratiques alimentaires malsaines, exacerbent de manière anormale la production d'EOA dans notre corps. À long terme, cela peut favoriser le développement de diverses affections liées à l'âge telles que les cancers ou les maladies cardiovasculaires (Haleng J et al ;2007).

L'ensemble des réactions impliquant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont définies par la présence d'un électron célibataire très réactif (radical libre), est ce que l'on appelle le stress oxydant. Les principaux ROS générés sont : l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($OH^\bullet$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le monoxyde d'azote ($NO^\bullet$) et le peroxynitrite ($ONOO^\bullet$) (Carole et al, 2011).

III.3 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des entités chimiques instables dotées d'électrons qui se libèrent des assemblages moléculaires oxygénés. Suite à la perte d'un atome, ils se transforment en « électrons libres » prêts à se recombinaison, réagissant de manière spontanée avec d'autres atomes ou molécules peuvent déclencher des réactions en chaîne bénéfiques, mais parfois également préjudiciables pour l'organisme

Les radicaux libres peuvent avoir une double origine, une origine exogène (liées à une mauvaise hygiène de vie), et une origine endogène (liées à des systèmes enzymatiques identifiés dans les cellules).

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant (BENCHAACHOUA A ; 2019)

III.3.1 Radicaux libres primaires

Les radicaux primaires sont directement issus de l'oxygène par des réductions à un électron, comme c'est le cas pour l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), ou du monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) (Favier, 2003).

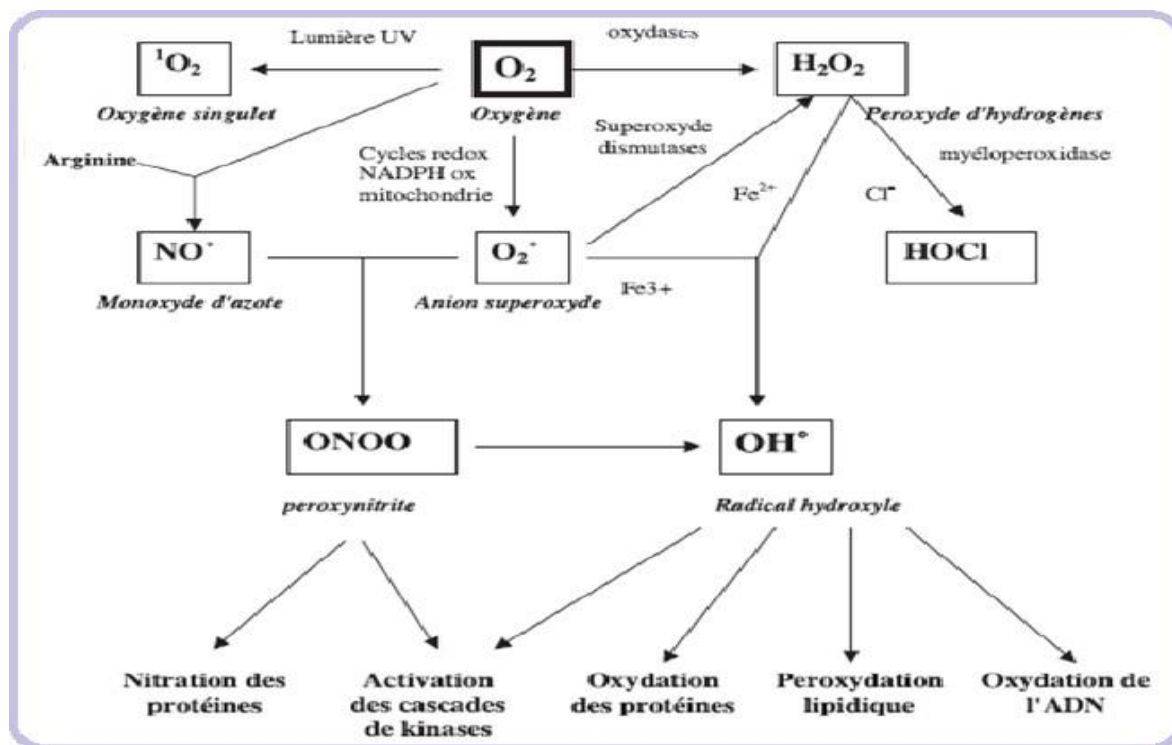


Figure 12: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

III.3.2 Radicaux libres secondaires

On peut retrouver d'autres formes radicalaires dites « secondaires » dans les environnements biologiques. Il s'agit spécifiquement des radicaux : alkyle ($R\bullet$), alkoxy ($RO\bullet$) et alkyl peroxy ($ROO\bullet$), qui sont produits par l'action oxydante des radicaux libres oxygénés « primaires » (superoxyde, hydroxyle) sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés, les glucides, les protéines ou les acides nucléiques (Vergely & Rochette, 2003).

III.4 Les antioxydants

Le stress oxydatif se produit lorsque l'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants penche en faveur des premiers. Les radicaux libres en surplus s'attaquent aux lipides, à l'ADN et aux protéines, ce qui provoque des dommages cellulaires (hyperprolifération, apoptose, mutations...) et contribue à l'apparition de maladies graves telles que les cancers, les affections cardiovasculaires ou la maladie d'Alzheimer. Pour lutter contre cet excès, le corps a recours à des systèmes antioxydants : des enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion-peroxydase) et des apports nutritionnels (vitamines E, C, fruits, légumes). À faible concentration, les antioxydants ont la capacité de freiner ou d'arrêter le processus d'oxydation d'un substrat (BENCHAACHOUA A ; 2019).

III.4.1 Classification des antioxydants selon leurs natures

Ils sont soit d'origine endogène (produits et régulés par l'expression des gènes), soit exogène (nutrition et supplémentation), enzymatiques ou antioxydants non enzymatiques (DE Moffarts *et al.*, 2004) :

III.4.1.1 Les antioxydants naturels

Les antioxydants primaires, qui sont des enzymes antioxydantes essentielles produites naturellement par notre corps, agissent directement sur les ERO. Ces enzymes antioxydantes internes représentent notre défense la plus forte contre les radicaux libres (Céline, 2004).

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

a) Les systèmes de défense antioxydants enzymatiques

Les trois enzymes antioxydantes majeures sont (BENCHAACHOUA A ; 2019) :

. Superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD constituent l'une des premières lignes de défense contre les radicaux libres. Il s'agit de métalloprotéines qui catalysent la dismutation du O_2 par un processus à un seul

électron en dioxygène et H_2O_2 .

. Les glutathions peroxydases ou (GPx)

Sont des sélénoprotéines, représentent l'un des systèmes enzymatiques de défense les plus importants. Les peroxydases facilitent la transformation du H_2O_2 et des hydroperoxydes lipidiques en H_2O et en alcools lipidiques, respectivement, par le biais d'une réaction qui utilise le glutathion (glutamyl-cystéinyglycine) réduit (GSH) comme co-substrat.

. La catalase

Elle convertit le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle puis en H_2O au sein des peroxysomes. Son rôle se manifeste principalement lorsque l' H_2O_2 est produite à l'excès (hyperoxie) ou en cas d'insuffisance du système glutathion .

Pour être activées, ces trois enzymes antioxydantes nécessitent la présence de minéraux dérivés des aliments : le fer est requis pour la catalase, le zinc et le cuivre sont nécessaires pour la superoxyde dismutase, tandis que le sélénium est indispensable pour les glutathions-peroxydases (Céline, 2004).

b) Les systèmes de défense antioxydants non enzymatiques

. La vitamine E : fonctionne en transférant un atome d'hydrogène à un radical libre O_2 , créant ainsi un hydroperoxyde et un radical alpha-tocophérol qui est assez stable. Il peut être réduit par l'acide ascorbique ou interagir avec un autre peroxyde pour produire un composé stable non radicalaire .

. Le bêta-carotène (un précurseur de la vitamine A) : joue un rôle protecteur pour les lipides membranaires en interrompant la chaîne de lipoperoxydation via un processus de transfert d'électrons.

. La vitamine C : joue un rôle indirect en réduisant la vitamine E oxydée, ce qui permet de la rendre à nouveau disponible.

. Les composés thiols, le couple redox ubiquinone-ubiquinol, la caeruloplasmine et certains métaux tels que le zinc, le sélénium, le cuivre et le fer possèdent des propriétés antioxydantes.

. Flavonoïdes : Sont des composés polyphénoliques qui se trouvent en grande quantité dans les plantes. On attribue leurs propriétés antioxydantes à la capacité de chélation des métaux redox-actifs, empêchant ainsi leur formation. des ERO (HAMMA S ; 2021).

4.1.2 Les antioxydants synthétiques

Il s'agit généralement de composés phénoliques d'origine pétrochimique. Concernant les antioxydants de synthèse : le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA), qui sont permis pour la préservation des produits alimentaires et pharmaceutiques. Ces deux additifs ne se dissolvent pas dans l'eau, sont thermorésistants, mais présentent une solubilité appréciable dans les environnements lipidiques. Ils ont le désavantage de dégager une mauvaise odeur et de s'évaporer rapidement. Des études récentes ont démontré qu'ils peuvent également entraîner des effets indésirables.

Notamment, lorsqu'il est appliqué à la peau, le BHT causerait des dommages aux tissus pulmonaires. L'usage du BHT et du BHA est actuellement sujet à controverse en raison de préoccupations toxicologiques (BENCHAACHOUA A ; 2019).

III.5 Avantages et inconvénients des antioxydants de synthèse

À l'heure actuelle, l'utilisation de molécules antioxydantes synthétiques est contestée à cause des risques toxicologiques potentiels et du potentiel cancérigène. L'emploi de certaines d'entre elles est défendu, néanmoins elles sont couramment utilisées en raison de leur faible coût. Cependant, les antioxydants naturels sont également coûteux et restreints, considérés comme des composés inoffensifs qui ont une large gamme de solubilité dans l'eau. Leur intérêt est croissant et ils sont entièrement métabolisés, possédant une activité antioxydante marquée (BENCHAACHOUA A ; 2019).

III.6 Les différents types d'antioxydants

Les antioxydants cellulaires mettent en place un mécanisme de défense avancé face à l'agression par les radicaux libres. Ils se distinguent par un mode d'action qui peut être direct, comme c'est le cas pour les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, ou indirect, en tant qu'éléments constitutifs de la structure des enzymes et/ou cofacteurs des enzymes antioxydantes.

Ce travail se concentre sur les antioxydants exogènes non enzymatiques, avec une attention particulière portée aux polyphénols.

6.1 Polyphénols comme antioxydants

Les polyphénols sont susceptibles de réagir avec les espèces réactives de l'oxygène, telles que l'anion superoxyde : O_2^- , radical hydroxyle : OH) pour générer des radicaux

phénoxy stables. Ils peuvent également jouer le rôle d'antioxydants en raison de leur aptitude à se complexer avec les ions métalliques .

Les flavonoïdes, notamment, sont des antioxydants d'une grande puissance. Ils ont la faculté de capturer directement les radicaux libres. Leur efficacité est principalement liée à leur capacité de réponse et à la stabilité des radicaux générés (**BENCHAACHOUA A ; 2019**).

III.7 Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire

On fait appel à diverses techniques pour apprécier, in vitro et in vivo, l'activité antioxydante (**Prioret et al, 2005**). Ces approches varient en fonction des types de radicaux libres et des méthodes d'analyse utilisées dans les mécanismes d'oxydation (**Magalhaes et al, 2008**).

On distingue deux types de tests : ceux qui évaluent le transfert d'électrons ou d'hydrogène vers un radical coloré stable et facilement détectable (DPPH, TEAC) et ceux qui impliquent une concurrence (ORAC, décoloration du β -carotène et de la crocine) entre l'antioxydant et une cible à défendre (pigments, lipides) (**Achat , 2013**).

III.7.1 Test de la capacité antioxydante totale

Ce test repose sur la transformation du molybdène (VI) en molybdène (V) par le biais de l'extrait de plante. Cette diminution provoque, en milieu acide, la création du complexe phosphate / Mo (V) de teinte verte (**Prieto et al, 1999**).

III.7.2 Test de piégeage du radical DPPH °

On peut également évaluer la capacité antioxydante en faisant appel à des radicaux libres plus stables. On ajoute le corps à quantifier à une solution de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH °), un radical stable et coloré. Son absorption maximale dans le domaine visible se trouve autour de 515-517nm, notamment dans le méthanol et l'éthanol. La diminution de ce radical par un agent réducteur d'atome H (AH) entraîne la création de DPPH jaune et du radical (A°). La technique DPPH utilisée pour examiner les extraits issus des plantes et de l'alimentation. Cette technique est à la fois rapide et économique (**Gouveia & Castilho, 2012**).

III.7.3 Test de réduction de fer (FRAP)

C'est une technique qui repose sur la réduction chimique du fer (III) contenu dans le

complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe (II). L'absorbance de la solution réactionnelle est mesurée à 700 nm (Oyaizu, 1986).

L'augmentation de l'absorbance est liée à l'accroissement du pouvoir réducteur d'un composé, qui est associé à son activité antioxydante. Il est à noter que la production simultanée de Fe (II), un pro-oxydant notoire, peut entraîner la création de radicaux supplémentaires dans l'environnement de réaction. De plus, les composés qui présentent une absorption à la même longueur d'onde peuvent se confondre, conduisant à une surestimation des résultats (Ou et al, 2002).

III.7.4 Test de piégeage du radical ABTS•+

Cette technique repose sur la faculté des antioxydants à neutraliser le radical ABTS•+, dérivé de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azonobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)), en comparaison avec un antioxydant standard : le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), qui présente une structure moléculaire cyclique analogue à celle de la vitamine E. L'ABTS oxydé présente une couleur allant du bleu au vert, et l'introduction d'antioxydant atténue ce radical, entraînant une perte de couleur à 734 nm (RE et al, 1999).

III.8 Activité antimicrobienne

Les bactéries ont mis en place divers mécanismes leur conférant une résistance face aux antibiotiques. Dans ce cadre, l'exploration de substances antibactériennes, comme les produits naturels dérivés des plantes médicinales, s'avère nécessaire tout comme l'étude des extraits de *Silybum marianum* (Marmouzi et al ;2021).

La quête de nouveaux agents antimicrobiens issus de la phytothérapie a suscité l'intérêt des chercheurs au niveau mondial, devenant ainsi une source d'inspiration pour le développement de nouveaux médicaments. Parmi ces composés, les phénoliques sont employés dans les secteurs alimentaires et cosmétiques, ainsi qu'en médecine traditionnelle, en tant qu'agents antimicrobiens (Cowan, 1999).

L'action antimicrobienne des composés phénoliques est majoritairement associée aux modifications de membranes, à l'empêchement de la production d'ARN et d'ADN, ou encore à l'interférence avec l'activité ou la fabrication d'hydrolases, ou à d'autres interactions visant à rendre inactives les protéines membranaires et de transport (Cowan, 1999).

III.8.1 Les agents antimicrobiens

Nous appelons agent antimicrobien tout élément chimique, physique ou biologique qui inhibe la multiplication et/ou la pérennité des micro-organismes (**Asada et al, 1998**).

Ces substances, qui ont une attraction pour les cellules des parasites et un pouvoir létal plus fort que les dégâts qu'elles infligent à l'organisme, permettront d'éliminer les parasites sans causer de troubles significatifs à l'organisme (**Perry et al, 2002**).

III.8.2 Mode d'action des agents antimicrobiens

III.8.2.1 Action germicide

Cette action définit les agents qui exercent une action mortelle sur les microorganismes. Selon le type de microorganismes visés, les agents antimicrobiens peuvent avoir un effet bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent antichampignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti-protozoaires).

III.8.2.2 _Action germistatique (bactériostatique et fongistatique)

Dans ce contexte, les agents inhibent le développement du microorganisme sans le tuer (qu'il s'agisse de bactéries ou de champignons) . Les agents bactériostatiques freinent temporairement la croissance microbienne, mais les microorganismes reprendront leur développement dès que la concentration de l'agent sera réduite ou dès que l'utilisation du procédé physique sera arrêtée .

III.8.3 Méthodes de la détermination de l'activité antimicrobiens

L'évaluation de l'activité antimicrobienne est un processus essentiel servant à mesurer la faculté d'une substance (extrait de plante, antibiotique ,huile essentielle ou un composé chimique) à inhiber ou éliminer les micro-organismes (bactérie et champignons).

Plusieurs méthodes in vitro permettent de déterminer cette activité, notamment la diffusion en gélose, la co-culture et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

III.8.3.1 Méthode de diffusion sur gélose (Antibiogramme)

C'est l'approche la plus couramment employée pour évaluer l'activité antimicrobienne.

La matière à examiner se propage dans une gélose inoculée avec le micro-organisme. Si elle a une propriété antimicrobienne, une zone sans croissance bactérienne nommée zone d'inhibition se manifestera autour du disque ou du puits (**Belouiri et al., 2016**).

III.8.3.2 _Méthode de co-culture

La technique de co-culture implique la culture conjointe de deux ou plusieurs micro-organismes dans un environnement commun pour examiner leurs interactions microbiennes. Cette méthode offre la possibilité d'apprécier l'effet de frein exercé par certaines bactéries sur le développement des micro-organismes nuisibles ou de dégradation.

On détermine généralement l'activité antimicrobienne en mesurant la densité optique et/ou en comptant les cellules viables sur des milieux sélectifs, dans le but de comparer la prolifération du micro-organisme cible en présence ou non de la souche étudiée (**Belouiri et al ;2016**).

III.8.3.3 _Méthode de micro dilution en bouillon

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'un antibiotique par la microdilution en bouillon est une méthode standardisée. Elle permet d'établir la CMI, qui est la concentration minimale d'antibiotique nécessaire pour empêcher la croissance visible d'une bactérie. Des solutions d'un antibiotique sont préparées dans un milieu de culture liquide à l'aide de plaques à 96 puits, suivies de l'introduction d'une suspension bactérienne normalisée après incubation. L'absence de turbidité signale une inhibition (**Belouiri et al ; 2016**).

Il existe aussi d'autres approches pour mesurer l'activité antimicrobienne, comme les tests qui se concentrent sur l'activité des bactériocines, la PCR pour détecter les gènes liés à la production de substances antimicrobiennes, ainsi que des méthodes d'analyse telles que la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Ces méthodes permettent une meilleure compréhension des composés actifs et de leurs mécanismes d'action, et pourraient être incorporées dans des recherches futures (**Yadav et Tiwari, 2023**).

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1 Objectif du travail

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation biochimique et pharmacologique de *Silybummarianum* (L.) Gaertn. L'objectif central de ce travail est d'élucider et de caractériser de manière comparative le potentiel antioxydant et les propriétés antimicrobiennes des fractions lipophiles (huiles végétales) et des extraits polyphénoliques issus de cette espèce.

Face à l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes et au besoin croissant d'antioxydants naturels pour la substitution des molécules de synthèse, l'évaluation des métabolites secondaires de cette plante représente un enjeu majeur en biotechnologie et en pharmacognosie.

Afin d'évaluer l'influence de la polarité et de la nature des milieux d'extraction sur l'efficacité biologique des extraits, un système de solvants diversifié a été mis en œuvre. L'hexane a été sélectionné comme solvant de référence pour l'extraction et l'isolement sélectif de la fraction lipidique apolaire (l'huile végétale).

En parallèle, afin de mener une étude comparative approfondie de la fraction polyphénolique et d'évaluer l'impact des paramètres d'extraction sur les activités antioxydante et antimicrobienne, six solvants de polarités graduelles (qualifiés de solvants d'extraction complémentaires) ont été mobilisés :

- *Solvants apolaires à faiblement polaires* : l'éther de pétrole et le chloroforme, privilégiés pour cibler les composés moyennement hydrophobes.
- *Solvants polaires aprotiques* : l'acétone, reconnue pour son efficacité lors de l'extraction des flavonoïdes et des composés piègeurs de radicaux libres.
- *Solvants polaires protiques* : le méthanol, l'éthanol et l'eau distillée (milieu aqueux), indispensables pour l'épuisement des matrices végétales en composés phénoliques hautement polaires et glycosylés.

Cette approche par gradients de polarité permet de cartographier précisément la solubilité des principes actifs de *Silybummarianum* et de déterminer le système solvant optimal pour maximiser le rendement en molécules bioactives.

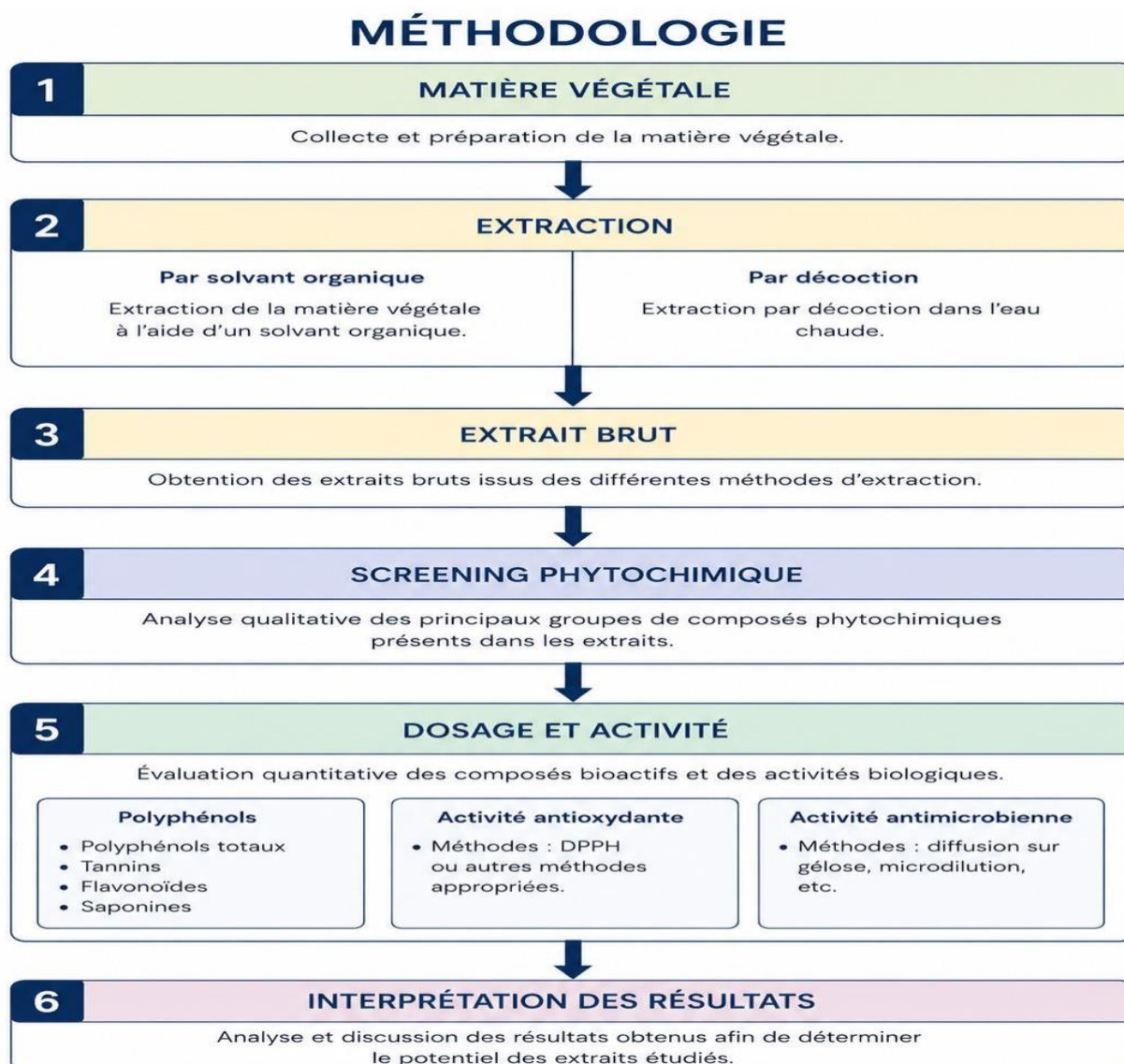


Figure 13: Méthodologie expérimentale appliquée à l'étude des extraits végétaux.

IV.2 Choix du matériel végétal

Afin de garantir la représentativité locale et de s'ancrer dans les réalités ethnobotaniques de la région, les structures séminales (akènes) de *Silybum marianum* exploitées dans cette étude ont été rigoureusement sélectionnées et acquises au niveau du marché traditionnel de la wilaya de Mostaganem. Ce choix d'approvisionnement local répond à une double exigence scientifique :

. Pertinence écologique

Il permet d'évaluer le potentiel biologique d'un écotype parfaitement adapté aux conditions bioclimatiques semi-arides et aux caractéristiques édaphiques de la frange littorale nord-ouest de l'Algérie.

. Valorisation patrimoniale

L'analyse de semences issues des circuits d'approvisionnement locaux offre une opportunité concrète de valider scientifiquement les usages empiriques de cette ressource médicinale telle qu'elle est mise à la disposition des utilisateurs et des herboristes de la région.

Avant toute étape d'extraction, le lot de graines a fait l'objet d'un tri méticuleux afin d'éliminer les impuretés macroscopiques, suivi d'une authentification botanique systématique visant à confirmer l'intégrité et la pureté taxonomique de l'échantillon d'étude.

IV.3 Préparation du matériel végétal

Le protocole de conditionnement du matériel végétal a été conduit selon les étapes successives suivantes :

- *Lavage et décontamination* : Les structures séminales (akènes) acquises ont été soumises à un rinçage rigoureux à l'aide d'eau distillée afin d'éliminer les impuretés exogènes et les particules de poussière de surface.
- *Dessiccation* : Les semences ainsi nettoyées ont été disposées en couche mince pour subir un séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière (à l'ombre) pendant une durée de 2 à 3 jours, garantissant une déshydratation optimale tout en préservant l'intégrité des molécules thermosensibles.
- *Broyage et tamisage* : À l'issue de la phase de dessiccation, le matériel a été pulvérisé au moyen d'un broyeur électrique de laboratoire afin d'obtenir une poudre végétale fine et homogène. Cette réduction granulométrique permet d'augmenter la surface de contact entre la matrice solide et les solvants lors des étapes ultérieures.

La poudre ainsi récupérée a été immédiatement stockée dans des flacons hermétiques et opaques, à l'abri de l'humidité, avant d'être soumise aux différents procédés d'extraction (extraction par solvant organique et macération).

IV.4 Extraction par Solvant Organique (Procédé Soxhlet)

L'isolement de la fraction lipidique apolaire a été réalisé par extraction solide-liquide continue à chaud au moyen d'un appareil de Soxhlet, selon un protocole adapté de (**Ben Rahal N ;2012**). Le déroulement opératoire s'est structuré comme suit :

IV.4.1 Conditionnement de produit végétale

Une prise d'essai de 50 g de poudre de graines de *Silybum marianum* a été

quantitativement transférée dans une cartouche d'extraction en cellulose poreuse, préalablement insérée dans la chambre centrale du Soxhlet.

IV.4.2 Mise en charge du système

Le ballon de sédimentation inférieur, d'une capacité de 250 mL, a été complété par un volume de 150 mL d'n-hexane (solvant d'extraction).

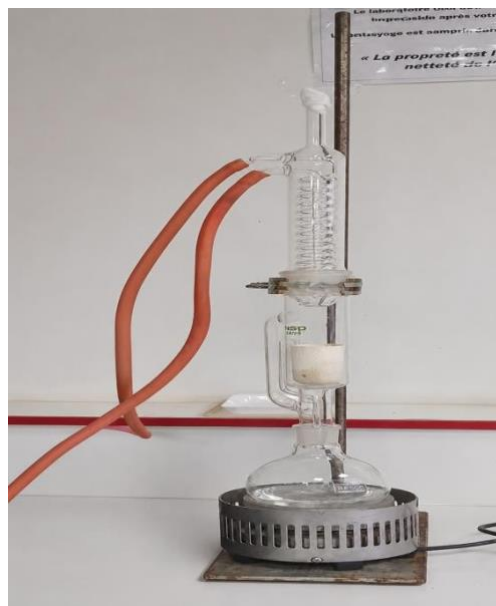
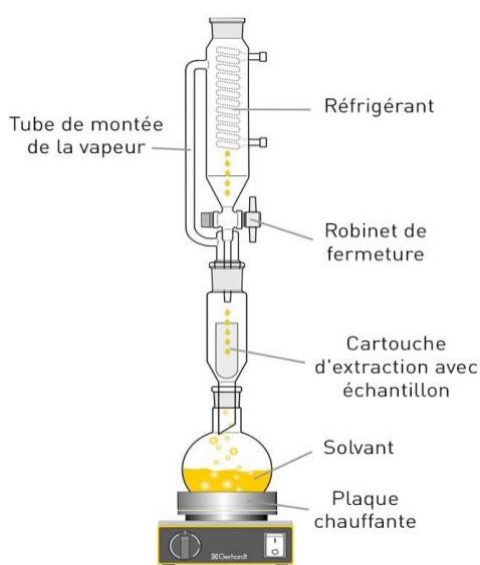


Figure 14: Montage d'extraction par l'appareil de Soxhlet .

IV.4.3 Dynamique d'extraction par Soxhlet

Porté à ébullition, le solvant (cyclo-hexane) génère des vapeurs ascendantes qui transitent par le tube latéral avant de se condenser au contact du réfrigérant à boules supérieur. Le solvant condensé percole ainsi de manière continue à travers la matrice solide, se chargeant progressivement en solutés lipophiles. Dès que le niveau de saturation de la chambre d'extraction est atteint, le flux est automatiquement réintroduit dans le ballon de distillation par un mécanisme de siphonage cyclique.

IV.4.4 Concentration et Conservation des d'huile végétale

La durée globale du processus d'extraction a été rigoureusement décomptée à partir de l'amorçage du premier cycle d'ébullition du solvant.

IV.4.5 Évaporation du solvant

Le mélange brut (solvant/solutés) collecté dans le ballon a ensuite été soumis à une distillation sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Cette opération a été

conduite à une température modérée de 40 °C afin d'éliminer intégralement les traces de solvant résiduel tout en prévenant la dégradation thermique ou l'oxydation des acides gras altérables.

IV.4.6 Conditionnement d'extrait

À l'issue de cette phase de concentration, l'extrait brut (ou la fraction concrète d'huile végétale) a été récupéré, pesé pour la détermination du rendement, puis immédiatement transféré dans des flacons étanches ambrés.

IV.4.7 Stockage

Conformément aux recommandations de (Lukic et al. 2022), l'ensemble des échantillons d'huile a été conservé à une température constante de 8 °C, à l'abri de la lumière, afin de garantir leur stabilité biochimique jusqu'à la réalisation des analyses antioxydantes et antimicrobiennes.

IV.5 Dynamique d'extraction par macération/évaporation

L'extraction des composés bioactifs à partir du matériel végétal de *Silybum marianum* a été conduite par macération, selon le protocole décrit par Mahmoudi et al. (2013), avec de légères modifications. Une prise d'essai de 50 g de poudre fine de la matrice végétale a été immergée individuellement dans un volume de 200mL de différents solvants de polarités croissantes : méthanol 70%, éthanol 70% ; acétone 70% ; éther de pétrole, chloroforme et eau distillée, à température ambiante durant 24h et demi sous agitation magnétique (figure 13) ;



Figure 15: Incubateur à agitation continu

L'ensemble du dispositif a été rigoureusement maintenu à l'abri de la lumière. À l'issue de cette période, les phases liquides (macérats) ont été collectées, réunies par type de solvant, puis clarifiées par filtration sur papier filtre Whatman (N°1).



Figure 16: Etape de filtration des extraits .

L'élimination des solvants organiques et la concentration des filtrats ont été réalisées à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor) sous pression réduite à une température contrôlée de 45°C pour éviter toute altération thermique des molécules extraites. Les extraits secs ainsi obtenus ont été quantifiés, transférés dans des flacons hermétiques opaques et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation pour les analyses phytochimiques et biologiques ultérieures.

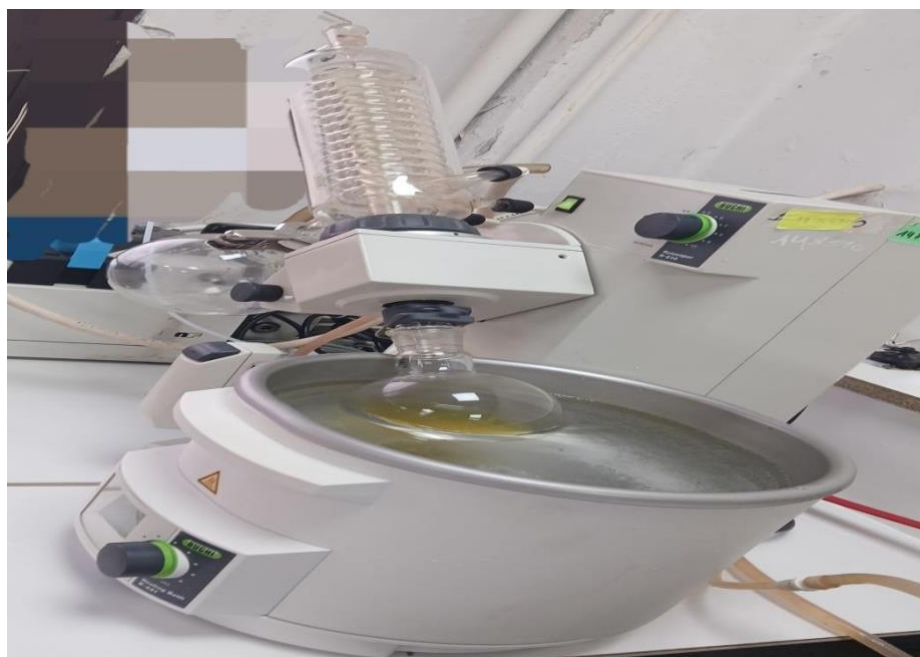


Figure 17: Evaporateur rotatif (Rotavapor)

IV.6 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction constitue un paramètre essentiel pour évaluer l'efficacité du procédé d'extraction appliqué au matériel végétal. Il permet de déterminer la quantité d'extrait récupérée par rapport à la masse initiale de la matière végétale sèche utilisée. Ce paramètre est généralement exprimé en pourcentage (%), ce qui facilite la comparaison entre différentes méthodes d'extraction ou différents solvants employés. Après l'opération d'extraction et l'élimination du solvant (ou après concentration et séchage de l'extrait obtenu), la masse de l'extrait brut est déterminée à l'aide d'une balance analytique. Le rendement d'extraction est ensuite calculé selon la formule suivante (AFNOR, 2000) :

$$R(\%) = (PE / PA) \cdot 100$$

- R (%) : rendement d'extraction exprimé en pourcentage ;
- PE (g) : poids de l'extrait obtenu après évaporation du solvant ;
- PA (g) : poids initial de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction

Le calcul du rendement permet d'apprécier la capacité du procédé d'extraction à récupérer les composés présents dans le matériel végétal. Plusieurs facteurs peuvent influencer ce rendement, notamment la nature du solvant utilisé, la méthode d'extraction appliquée (macération, décoction, Soxhlet, etc.), la durée d'extraction, la température ainsi que les caractéristiques physicochimiques de la matière végétale. Le rendement d'extraction est utilisé comme indicateur préliminaire pour comparer les performances des différentes conditions expérimentales avant de procéder aux analyses phytochimiques et biologiques des extraits obtenus.

IV.7 Analyse phytochimique

IV.7.1 Analyse qualitative (Screening phytochimique)

L'analyse qualitative, ou screening phytochimique, a été réalisée dans le but d'identifier les principales classes de métabolites secondaires présentes dans les extraits végétaux obtenus. Cette étape constitue une approche préliminaire permettant de mettre en évidence la composition chimique globale des extraits avant les analyses quantitatives et l'évaluation des activités biologiques.

Le screening phytochimique repose sur une série de tests de caractérisation qualitative basés sur des réactions chimiques spécifiques entre les composés bioactifs contenus dans l'extrait et des réactifs appropriés. Ces réactions entraînent généralement l'apparition d'une coloration, d'un précipité ou d'un changement d'aspect permettant d'indiquer la présence ou l'absence des groupes chimiques recherchés. Les essais ont été réalisés conformément aux méthodes décrites dans la littérature scientifique selon **Badiaga (2012)**. Les principales familles de métabolites secondaires recherchées comprennent notamment les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les alcaloïdes, les terpènes ainsi que d'autres composés bioactifs selon les objectifs de l'étude.

L'interprétation des résultats a été effectuée sur la base de l'intensité des réactions observées. Les réponses obtenues ont été classées selon l'échelle qualitative suivante :

Table 16: Présentation de signification clinique et analytique des extraits

Symbole	Signification Clinique / Analytique	Description Visuelle Typique
+++	Réaction fortement positive	Précipité dense, sédimentation rapide ou virage colorimétrique intense et immédiat (forte concentration).
++	Réaction positive	Précipité net ou changement de couleur franc et bien visible.
+	Réaction moyennement positive	Trouble léger ou modification colorimétrique de faible intensité (présence de traces détectables).
±	Réaction moyennement positive	Modification visuelle incertaine, à la limite du seuil de sensibilité de l'essai.
—	Réaction négative	Absence totale de changement de couleur ou de précipitation (absence du métabolite ciblé).

Cette méthode de caractérisation qualitative permet d'obtenir une première orientation sur le profil phytochimique des extraits étudiés et de sélectionner les extraits présentant le plus fort potentiel biologique pour les analyses ultérieures.

IV.7.1.1 Flavonoïdes (Test de Shinoda)

La mise en évidence qualitative des dérivés flavoniques au sein des différents extraits de *Silybum marianum* a été réalisée selon la méthode de référence décrite par **Benchachoua**

(2019). Ce test, communément appelé réaction au cyanure ou test de Shinoda, repose sur la réduction du noyau flavone en présence d'un acide fort et d'un métal réducteur, générant un complexe coloré soluble dans les solvants organiques. Le protocole opératoire a été conduit selon les étapes successives suivantes :

- *Préparation du milieu réactionnel* : Une prise d'essai de 5 mL de chaque extrait végétal a été introduite dans un tube à essai.
- *Réduction chimique* : À ce volume, ont été additionnés successivement 1 mL d'acide chlorhydrique concentré HCl et quelques tournures de magnésium métallique Mg. La réaction d'effervescence ainsi induite traduit la réduction des flavonoïdes en anthocyanidines.
- *Séparation et révélation* : Après stabilisation de la réaction, un volume de 1 mL d'alcool iso-amylque (3-méthylbutan-1-ol) a été ajouté au mélange afin de concentrer et d'extraire le complexe coloré par affinité de phase.

L'apparition d'une coloration virant au rose ou au rouge vif, se développant au niveau de la phase alcoolique supérieure après un temps de latence de 3 minutes, a été consignée comme un marqueur analytique positif (+ à +++) confirmant la présence de flavonoïdes dans l'échantillon analysé. En l'absence de toute modification chromatique, le résultat a été considéré comme négatif (-).

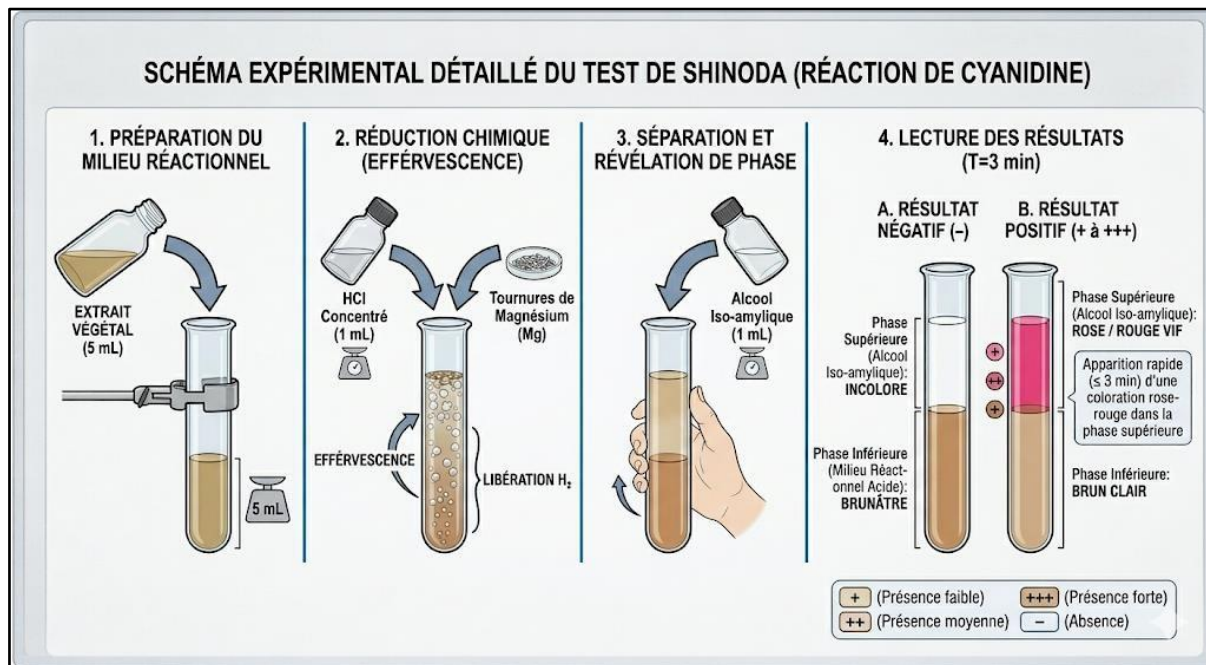


Figure 18 : Mise en évidence des flavonoïdes (Benchachoua, 2019).

IV.7.1.2 Tannins

La recherche qualitative des tanins a été réalisée selon la méthode au chlorure ferrique, couramment utilisée pour la détection de ces composés phénoliques. Cette technique repose

sur la capacité des ions ferriques (Fe^{3+}) à former des complexes colorés avec les groupements phénoliques présents dans les tannins. Pour ce faire, 1 mL de l'extrait végétal a été introduit dans un tube à essai, puis mélangé à 2 mL d'eau distillée afin d'obtenir une dilution homogène. Ensuite, 2 à 3 gouttes d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 1 % ont été ajoutées au mélange. Après agitation douce, l'apparition d'une coloration caractéristique a été observée et interprétée selon les critères suivants :

- Une coloration vert foncé à bleu-vert traduit la présence de tanins catéchiques (tanins condensés).
- Une coloration bleu foncé à bleu-noir indique la présence de tanins galliques (tanins hydrolysables).

L'intensité de la coloration observée permet également d'apprécier qualitativement l'abondance relative de ces composés dans l'extrait. Cette réaction est fondée sur la formation de complexes entre les ions ferriques et les fonctions hydroxyles phénoliques des tanins, générant des colorations spécifiques selon la nature chimique des tannins présents. Cette méthode constitue ainsi un test simple, rapide et fiable pour la mise en évidence préliminaire des tanins dans les extraits végétaux (Benchaachoua, 2019).

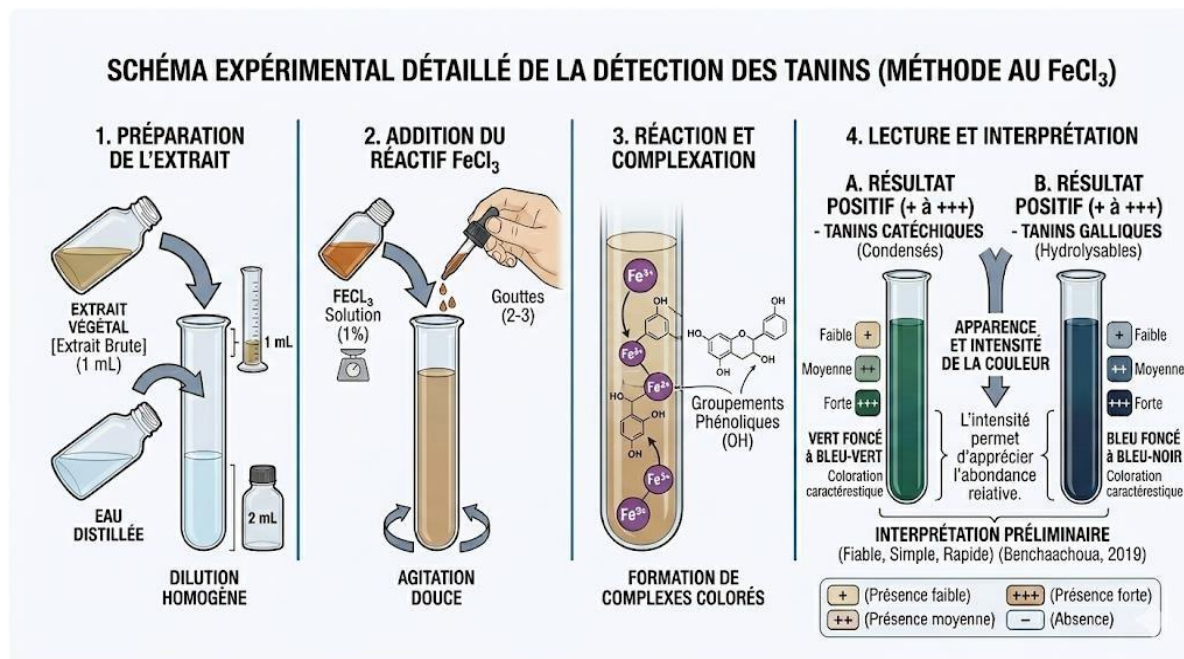


Figure 19: Mise en évidence les tannins (Benchaachoua, 2019).

IV.7.1.4 Saponines (saponosides)

La détection qualitative des saponines a été réalisée selon la méthode de l'indice de mousse, une technique classique fondée sur les propriétés tensioactives de ces métabolites secondaires. Les saponines possèdent en effet la capacité de réduire la tension superficielle de

l'eau, favorisant ainsi la formation d'une mousse stable après agitation.

Pour réaliser ce test, 1 mL de l'extrait végétal a été introduit dans un tube à essai contenant 2 mL d'eau distillée. Le mélange obtenu a ensuite été soumis à une agitation vigoureuse pendant environ 2 minutes afin de favoriser la formation éventuelle de mousse. Après agitation, la préparation a été laissée au repos pendant 15 minutes à température ambiante afin d'évaluer la stabilité de la mousse produite.

L'interprétation des résultats repose sur l'observation de la mousse formée :

- La présence d'une mousse persistante d'une hauteur supérieure à 1 cm après le temps de repos est considérée comme un indicateur positif de la présence des saponines (saponosides) dans l'extrait.
- Une mousse absente, peu abondante ou disparaissant rapidement est interprétée comme un résultat négatif ou une faible teneur en saponines.

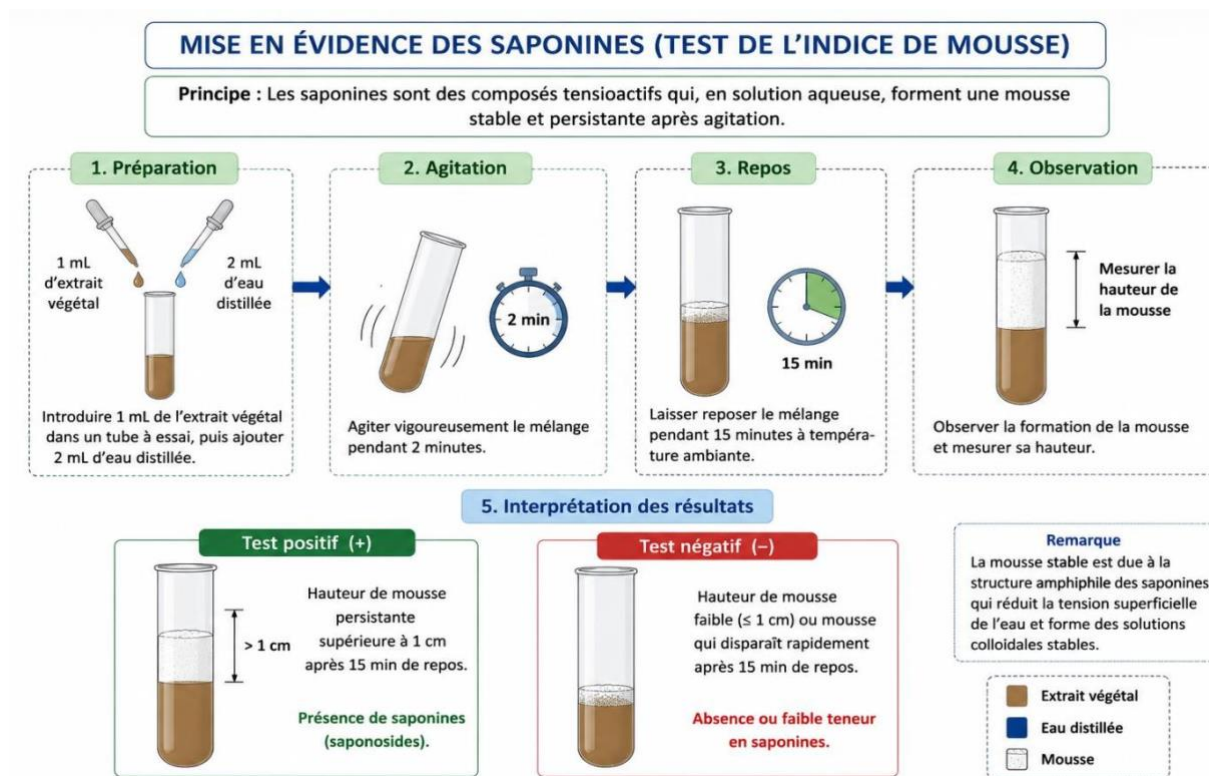


Figure 20: Mise en évidence des saponines (Benchachoua, 2019).

Cette méthode repose sur l'aptitude des saponines à former des solutions colloïdales stables et des mousses persistantes grâce à leur structure amphiphile, constituée d'une partie hydrophile et d'une partie lipophile. Bien qu'il s'agisse d'un test qualitatif, l'intensité et la stabilité de la mousse peuvent fournir une première indication sur l'abondance relative des saponines dans l'échantillon étudié. Cette approche constitue ainsi une méthode simple, rapide et largement utilisée dans le cadre du screening phytochimique préliminaire des extraits végétaux (Benchachoua, 2019).

IV.7.1.5 Les phénols

La détection qualitative des composés phénoliques a été réalisée selon la méthode au chlorure ferrique. À cet effet, 2 mL de la solution d'essai ont été introduits dans un tube à essai, puis un volume approprié d'alcool ainsi que quelques gouttes de solution de chlorure ferrique ont été ajoutés. L'apparition d'une coloration bleu-noire indique la présence de polyphénols dans l'extrait analysé (Syed *et al.*, 2011).

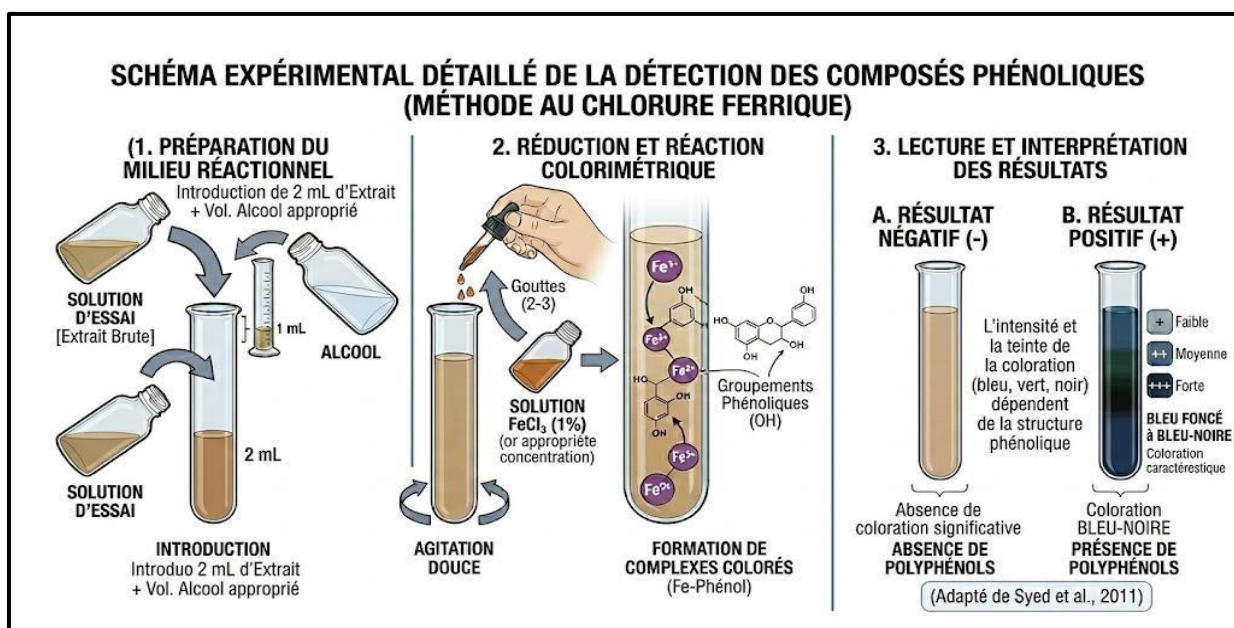


Figure 21: Mise en évidence les phénols(Syed *et al.*, 2011).

IV.8 Évaluation de l'Activité antimicrobienne

IV.8.1 Principe de la Méthode (Diffusion en Puits sur Gélose)

L'activité antimicrobienne des différents extraits ainsi que de l'huile végétale a été déterminée par la méthode de diffusion en puits sur milieu gélosé (Agar Well Diffusion Method). Cette technique phénotypique qualitative est largement standardisée et préconisée pour mettre en évidence le spectre d'inhibition ou le pouvoir antagoniste de substances bioactives naturelles vis-à-vis de souches microbiennes cibles (Balouiri *et al.*, 2016). Le principe repose sur la diffusion passive et centripète des composés actifs à partir d'un puits creusé dans la gélose préalablement inoculée par la suspension bactérienne. Après incubation, l'absence de croissance microbienne se traduit par l'apparition d'une zone circulaire translucide autour du puits, appelée zone d'inhibition. Le diamètre de cette zone est proportionnel à l'efficacité de l'extrait et à sa capacité de diffusion dans le milieu solide.

IV.8.1.1 Préparation de l'inoculum

Le milieu de culture utilisé (ex: Gélose Mueller-Hinton ou Nutrient Agar (annex1)),

l'âge de la culture (généralement une culture jeune de 18 à 24 h) et la densité optique (ajustée à 0,5 Mc Farland, soit environ 10^8 UFC/ml).

- *Coulage et l'ensemencement* : L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage de la surface de la gélose ;
- *Creusage des puits* : le diamètre des puits (souvent 6 ou 8 mm) réalisés à l'aide d'un emporte-pièce stérile (pipette Pasteur inversée ou canule).
- *Dépôt des échantillons* : le volume exact d'extrait ou d'huile déposé dans chaque puits (50µL), avec témoins utilisés (témoin négatif : solvant d'extraction DMSO /l'éthanol ; témoin positif : antibiotique).
- *L'incubation et la lecture* : la température d'incubation (ex: 24 heures à 37 °C), suivis de la méthode de mesure des diamètres d'inhibition (exprimés en millimètres à l'aide d'un pied à coulisse).

IV.8.1.2 Préparation des Solutions

Afin d'évaluer l'effet dose-réponse et de déterminer l'activité antimicrobienne quantitative des différents extraits végétaux et de l'huile, une gamme de concentrations a été préparée par des dilutions géométriques successives. Le protocole a été réalisé selon les étapes suivantes :

a) *Préparation des solutions mères* : Chaque échantillon brut a été solubilisé dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Le DMSO a été sélectionné comme solvant porteur en raison de son inertie chimique et de son absence d'activité antimicrobienne intrinsèque aux concentrations de travail. Pour chaque extrait, une solution mère standardisée a été préparée à une concentration finale de 200 mg/mL.

b) *Dilutions sérielles de raison 2* : À partir de chaque solution mère, une série de dilutions au demi (gradient géométrique de facteur 2) a été planifiée et exécutée dans le DMSO. Cette approche standardisée a permis d'obtenir une gamme décroissante de concentrations analytiques précises (100, 50, 25, 12,5 mg/mL, etc.). Ces différentes préparations ont été immédiatement utilisées lors des essais biologiques afin de caractériser le profil d'inhibition antimicrobienne de chaque échantillon.

IV.8.1.3 Matériel Biologique (Souches Microbiennes)

Les essais d'activité antimicrobienne ont été conduits sur un panel de souches microbiennes cibles, sélectionnées pour leur intérêt clinique et leur représentativité phénotypique. Ce panel comprend des souches de référence internationales ainsi que des

isolats cliniques hospitaliers.

.Souches de référence (ATCC) : Les souches standardisées issues de l'ATCC (American Type Culture Collection) ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) et le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP). Ces souches de collection permettent de garantir la reproductibilité des tests d'inhibition.

.Souches cliniques : Les isolats cliniques sauvages proviennent de la collection de laboratoires d'analyses médicales hospitaliers, permettant ainsi d'évaluer l'efficacité des extraits vis-à-vis de souches potentiellement résistantes.

Table 17: Description des souches testées.

Gram	Souche microbienne	Référence
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923 / souche clinique
Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 / souche clinique
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 / souche clinique

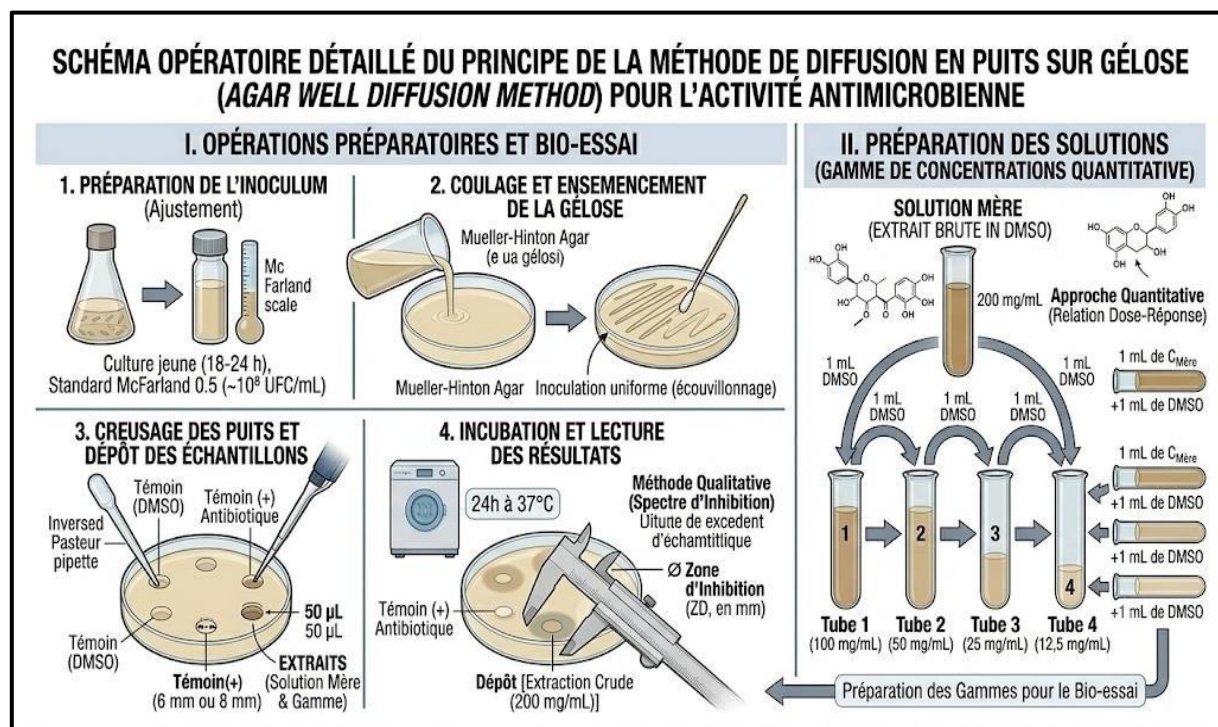


Figure 22: Schématisation de la méthode de diffusion en puits sur gélose (Balouiri et al., 2016).

IV.8.1.4 Expression des résultats

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

puits à l'aide d'un pied à coulisse, à l'extérieur de la boîte fermée, et les valeurs sont exprimées en mm.

Table 18: Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition(D) (**Chaouche ; 2014**).

Inhibition	Transcription	Sensibilité
$D < 8 \text{ mm}$	(-)	Résistante
$9 \geq D \leq 14 \text{ mm}$	(+)	Sensible
$15 \geq D \leq 19 \text{ mm}$	(++)	Très sensible
$D \geq 20 \text{ mm}$	(+++)	Extrêmement sensible

IV.8.2 Principe de la CMI

Une suspension bactérienne a été préparée et ajustée à une turbidité équivalente à 0,5 McFarland. Cette suspension a ensuite été diluée de manière à obtenir une concentration finale d'environ 5×10^5 UFC/mL dans chaque puits. L'extrait végétal ou l'huile a été dissous(e) dans un solvant approprié, généralement le diméthylsulfoxyde (DMSO). La concentration finale du DMSO dans le milieu de test a été maintenue à une valeur ne dépassant pas 1 % afin d'éviter tout effet antimicrobien attribuable au solvant. Des dilutions successives au demi (1/2) de l'extrait ont été réalisées dans un bouillon nutritif, généralement le bouillon Mueller-Hinton (MHB) (Annexe 1). Dans une microplaque de 96 puits, 100 μL de bouillon Mueller-Hinton (MHB) ont été distribués dans chacun des puits 2 à 12. Dans le puits 1, 200 μL de MHB contenant l'huile essentielle à la concentration maximale testée ont été introduits. Des dilutions successives au demi ont ensuite été réalisées par transfert de 100 μL du puits 1 vers le puits 2, puis du puits 2 vers le puits 3, et ainsi de suite jusqu'au puits 10, en homogénéisant le contenu après chaque transfert. Après le dernier transfert, 100 μL ont été éliminés du puits 10 afin de maintenir un volume identique dans tous les puits. Le puits 11 a été utilisé comme contrôle de croissance, tandis que le puits 12 a servi de contrôle de stérilité.

Par la suite, 100 μL de la suspension bactérienne ajustée à 5×10^5 UFC/mL ont été ajoutés dans chacun des puits 1 à 11. Le volume final dans chaque puits a ainsi été porté à 200 μL . La microplaque est incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures (**Hulankova ; 2024**). .

IV.8.2.1 Lecture de la CMI

Lecture visuelle : Après incubation, la turbidité (croissance) ou le culot sont observés. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'huile ou d'extrait végétale pour laquelle aucune turbidité visible n'est observée.

Utilisation de l'indicateur redox : Rouge de tétrazolium (TTC) est le plus utilisé, après incubation est ajouté 10 à 20 μL de solution TTC et re-incuber la plaque à 37°C pendant

10 à 60 min. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'huile ou d'extrait pour laquelle aucun virage au rouge n'est observé (absence de formazan). Une croissance bactérienne est indiquée par un puits rose /rouge.

IV.8.3 Détermination de la CMB

La concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée comme mesure complémentaire à l'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de dilution en bouillon. Elle a été définie comme la plus faible concentration d'huile essentielle capable de dévitaliser le microorganisme testé. Après la détermination de la CMI, un volume de 10 μL a été prélevé à partir de chaque puits ne présentant aucune croissance visible après incubation. Les prélèvements ont ensuite été ensemencés par stries sur des boîtes de gélose Mueller-Hinton, puis incubés à 37 °C pendant 18 à 24 h. Après incubation, l'absence de croissance bactérienne a été recherchée. La CMB a été définie comme la plus faible concentration ne permettant aucune repousse bactérienne sur le milieu gélosé. La valeur de la CMB a pu être égale ou supérieure à celle de la CMI.

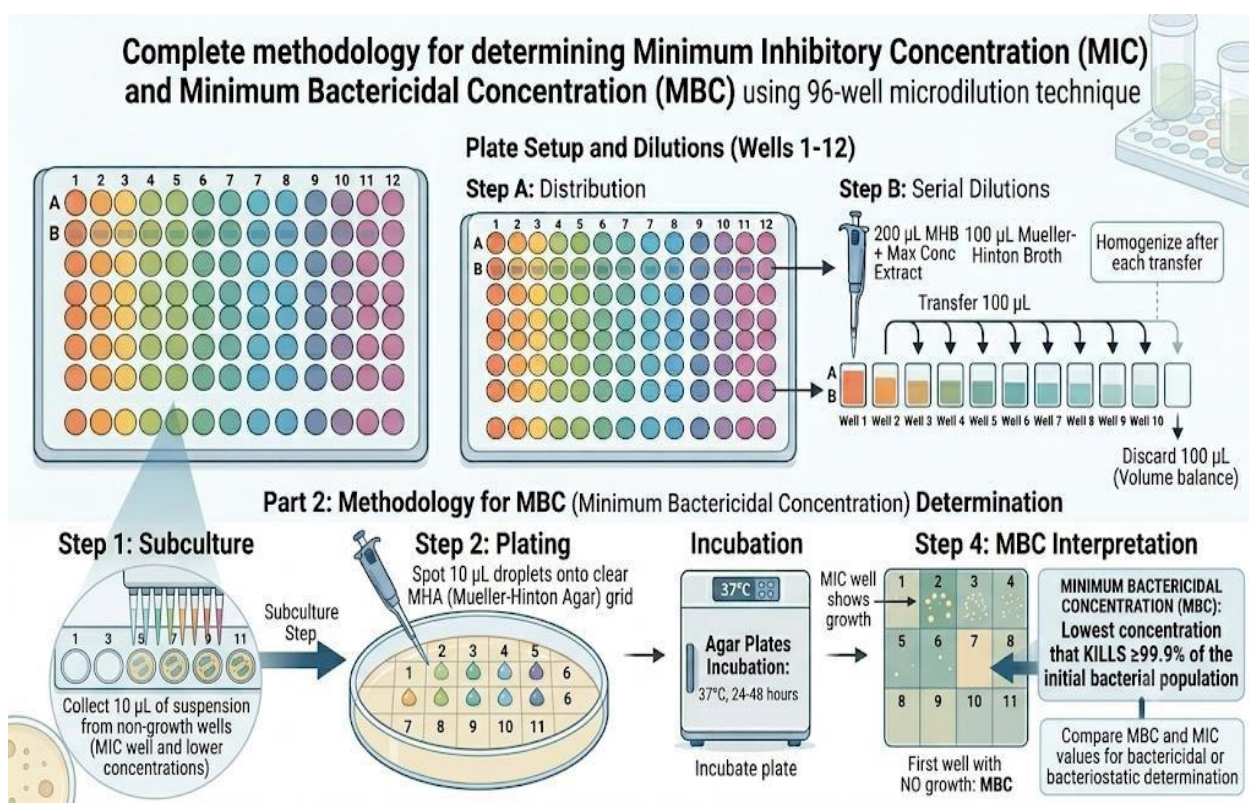


Figure 23 : Protocole expérimentale de la CMI et la CMB par technique de microdilution en microplaque 96 puits (Hulankova ; 2024).

IV.9 Evaluation du l'activité antioxydante

Nous avons choisi d'utiliser la méthode de DPPH ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, α , α -diphényl- β -

picrylhydrazyl) pour analyser l'activité anti-radicalaire des trois extraits. L'examen se fonde sur l'évaluation du pouvoir de capture des antioxydants. Dans le DPPH, l'atome d'azote à électron impair est réduit en acceptant un atome d'hydrogène des antioxydants, donnant lieu à la formation de l'hydrazine correspondante (**Kedare et Singh, 2011**). Le DPPH est un composé radicalaire stable existant sous forme de poudre noire. Il est soluble dans l'éthanol ou le méthanol. Un électron libre sur ce radical est présent dans un atome du pont d'azote. Le décalage de cet électron est la cause de la nuance bleu-violet distinctive du réactif. Quand le DPPH est mis en présence d'un antioxydant, un atome d'hydrogène se fixe au radical. Cela résulte en une diminution de la coloration (devient jaune pâle). Cette décoloration est mesurée par spectrophotométrie à 515-518 nm (**El Babili et al ; 2020**).

Le protocole expérimental suivi est celui de **Benchachoua (2019)**. Une prise d'essai de 50 µl de différentes concentrations préparées dans le méthanol à raison géométrique d'huile végétale et de chaque extrait est additionnée à 1950 µl de la solution méthanolique de DPPH (0.0025 g de DPPH dans 100 ml de méthanol) fraîchement préparée. Un contrôle négatif est préparé, en parallèle, 50 µl du méthanol est mélangé avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517 nm. L'antioxydant de synthèse utilisé est l'acide ascorbique (le contrôle positif).

Les concentrations des échantillons fournissant 50% de l'effet antioxydants (IC_{50}) ont été déterminées à l'aide des graphiques des pourcentages l'effet antioxydant par rapport aux concentrations des échantillons. Une faible valeur de IC_{50} correspondant à une grande efficacité de l'extrait (**Chaouch ; 2014**).

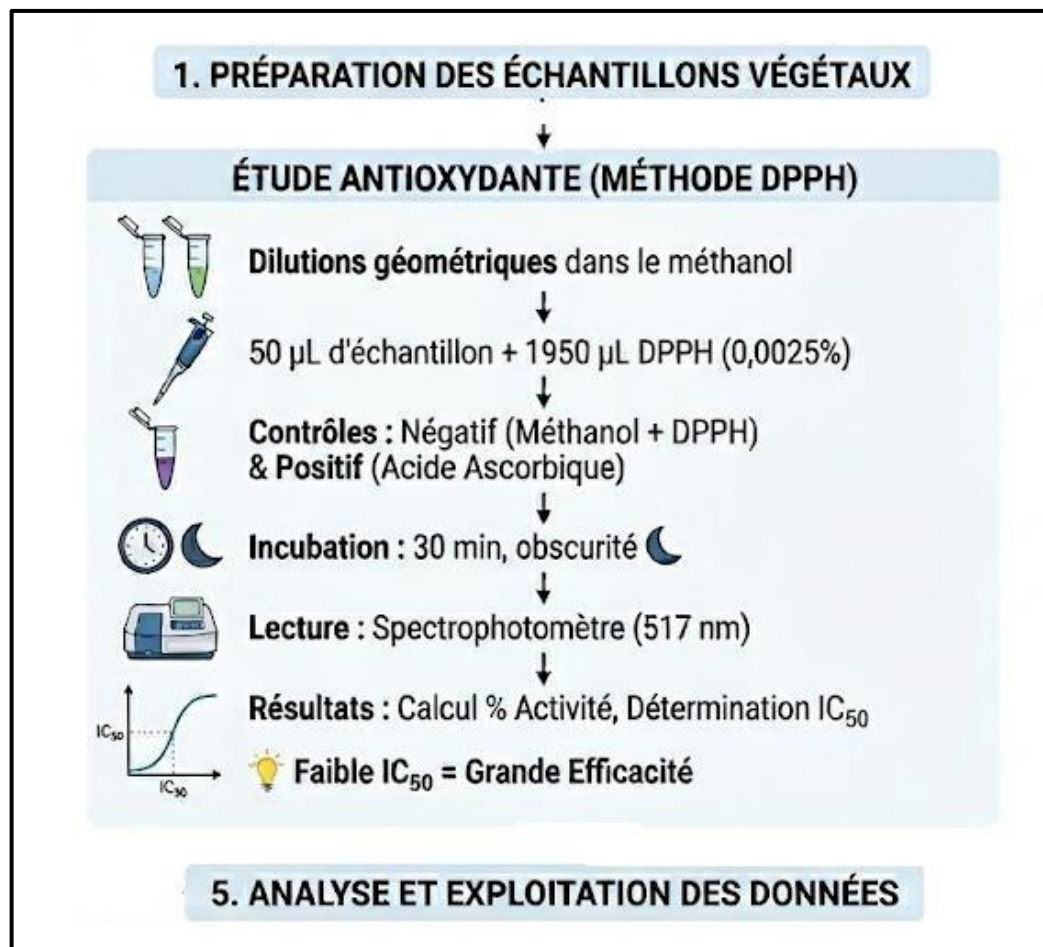


Figure 23 : Schéma du protocole d'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH(Benchaachoua ,2019).

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1 Rendement d'extraction

L'extraction des différents composés phénoliques des graines de *Silybum marianum* a permis d'obtenir d'huile végétale de couleur jaune et six extraits en fonction du type du solvant (hexane, eau distillée, méthanol : 70%, acétone : 70%, et éthanol : 70%, chloroforme, éther de pétrole), du mode d'extraction (macération, par solvant) et de la partie de la plante étudiée (les graines). Le rendement de chaque extrait est exprimé en pourcentage pour 50 g de matériel végétal sec et broyé.

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

Table 19: Rendements (%) des extractions par solvant et macération des graines de *Silybum marianum*.

Partie de la plante	Solvants d'extraction	Rendement (Rd) (%)	
		Macération	Par solvant
Graines	Hexane		18%
	Chloroforme	20,68%	
	Ether de pétrole	14,76%	
	Méthanol	10,72%	
	Ethanol	7,4%	
	Acétone	7,6%	
	Eau distillé	4,52%	

Les résultats présentés dans le tableau montrent que le rendement d'extraction varie fortement selon le solvant utilisé. Le rendement le plus élevé a été obtenu avec le chloroforme (20,68 %), suivi de l'hexane (18 %) et de l'éther de pétrole (14,76 %). Les rendements obtenus avec les solvants plus polaires sont plus faibles : méthanol (10,72 %), acétone (7,6 %), éthanol (7,4 %) et eau distillée (4,52 %).

Cette variation s'explique principalement par la polarité des solvants et la nature chimique des composés présents dans les graines de *S. marianum*. Les rendements élevés obtenus avec le chloroforme, l'hexane et l'éther de pétrole suggèrent que les graines sont riches en composés lipophiles, notamment les huiles, les acides gras et d'autres substances non polaires. Cette observation est cohérente avec la composition connue des graines de *S. marianum*, qui contiennent une proportion importante d'huile végétale.

Le rendement intermédiaire obtenu avec le méthanol indique que ce solvant est capable d'extraire à la fois certains composés phénoliques et d'autres métabolites de polarité moyenne. En revanche, les faibles rendements observés avec l'éthanol, l'acétone et surtout l'eau distillée traduisent une moindre quantité de composés fortement polaires dans les graines ou une efficacité d'extraction plus faible de ces solvants dans les conditions expérimentales utilisées.

Ainsi, l'ordre décroissant des rendements est :

Chloroforme (20,68 %) > Hexane (18 %) > Éther de pétrole (14,76 %) > Méthanol (10,72 %) > Acétone (7,6 %) > Éthanol (7,4 %) > Eau distillée (4,52 %).

De nombreux travaux effectués sur les graines de *S. marianum* montrent des rendements variables comparés aux nôtres .

L'étude de **Abderrezag et al. (2022)** sur les graines algériennes de *Silybum marianum* a obtenu un rendement maximal de 55,97 % grâce à une extraction par fluides expansés gazeux (CO₂-éthanol-eau). Ce rendement est nettement supérieur au rendement maximal observé dans notre étude (20,68 %), ce qui s'explique par l'utilisation d'une technique d'extraction avancée et optimisée. De même, **El-Mallah et al. (2003)** ont rapporté une teneur en huile d'environ 46 % dans les graines de *S. marianum*, une valeur largement supérieure à notre rendements d'extraction. Cette différence peut être liée à la variété étudiée, aux conditions de culture et à la méthode d'extraction utilisée.

Selon **Wallace et al. (2005)**, les graines de chardon-Marie contiennent environ 25 % d'huile, de même dans une étude dehors de l'Algérie de **Ben Rahal,N (2012)** ,qui a également identifié le chloroforme comme meilleur solvant d'extraction de rendement 28,85% suivi de l'hexane avec 21,88% . Cette valeur est relativement proche de notre rendement obtenu avec le chloroforme (20,68 %) et l'hexane(18%), ce qui confirme l'efficacité des solvants apolaires pour extraire la fraction lipidique des graines.

L'étude de **Zhao et al. (2015)** a obtenu un rendement d'extraction de silymarine de 7,86 % par extraction ultrasonique assistée par enzymes. Cette valeur est inférieure à notre rendement maximal de 20,68 %. Toutefois, la comparaison doit être faite avec prudence, car cette étude ciblait principalement l'extraction de la silymarine et non l'extract brut total ou l'huile des graines.

V.2 Analyse phytochimique

V.2.1 _Analyse qualitative

Le screening phytochimique effectué a pour objectif la mise en évidence de familles de composés phénoliques existant dans les extraits. Les résultats de ce criblage phytochimique sont reportés dans le tableau 6. Il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires.

Table 20: Résultats de la phytochimie qualitative des extraits des graines de *S.marianum*.

Extraits	Composés phénoliques caractérisés			
	FLV	POPH	Tn	SAP
Ethanolique	+	++	++	+++
Méthanolique	++	++	++	++
Acétonique	+	++	++	++
Aqueux	-	+	+	+
Chloroformique	+	++	+	+
Ether de pétrole	-	-	-	-

FLV : Flavonoïdes, **Tn** : Tanins, **SAP** : Saponosides , **POPH** :Polyphénol

(+++): Réaction très positive, (++) : Réaction positive ; (+) : Réaction moyennement positive ;(+/-) : Réaction douteuse ; (-) : Réaction négative.

L'analyse phytochimique qualitative des extraits des graines de *Silybum marianum* a révélé la présence de flavonoïdes, polyphénols, tanins et saponosides à des degrés variables selon le solvant d'extraction utilisé. Les extraits méthanolique, éthanolique et acétonique se sont montrés les plus riches en composés phénoliques, avec une prédominance des polyphénols et des tanins (++) . L'extrait éthanolique a présenté la plus forte teneur en saponosides (+++). En revanche, l'extrait aqueux a montré une faible richesse en métabolites secondaires, tandis que l'extrait à l'éther de pétrole s'est révélé totalement dépourvu des composés recherchés. Ces résultats soulignent l'importance de la polarité du solvant dans l'extraction des composés bioactifs des graines de *S. marianum*.

L'analyse phytochimique qualitative des graines de *Silybum marianum* a révélé une forte présence des polyphénols, flavonoïdes, tanins et saponosides dans les extraits méthanolique et éthanolique. Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Noor H. Al-Atraqchi et Al-Shaikh Hamed (2014)**, qui ont mis en évidence la présence de flavonoïdes,

de composés phénoliques et de tanins dans les extraits éthanoliques des graines de *S. marianum*. Les auteurs ont conclu que les solvants polaires favorisent l'extraction des métabolites secondaires bioactifs.

De même, une étude réalisée en Algérie sur les graines de *S. marianum* a montré que l'extrait méthanolique à 80 % présentait les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux, tandis que l'extrait éthanolique possédait une importante activité réductrice. Ces observations corroborent la richesse des extraits méthanolique et éthanolique observée dans notre étude.

Les résultats de **Mhamdi et al. (2016)** ont également confirmé que les graines de *S. marianum* sont une source importante de composés phénoliques, de flavonoïdes et de tanins condensés, ce qui concorde avec la détection positive de ces groupes chimiques dans notre extraits.

Par contre, **Javeed et al. (2022)** ont rapporté l'absence ou la très faible teneur en composés phénoliques dans certains extraits de graines, alors que notre résultats montrent une présence nette des polyphénols (++ à +++) selon le solvant utilisé. Cette différence peut être attribuée aux conditions pédoclimatiques, à l'origine géographique du matériel végétal, à la méthode d'extraction ou à la nature du solvant employé.

V.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne d'huile végétale et des différents extraits

V.3.1 Détermination de l'activité antimicrobienne

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

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits sont repris dans le tableau 7, qui comportent les valeurs en (mm) zones ou diamètres d'inhibitions de l'activité antimicrobienne d'huile végétale, des extraits et du DMSO. Les extraits qui semblent être efficaces et puissants révèlent l'apparition de zones d'inhibitions importantes. Les résultats du témoin négatif testé (DMSO) n'ont aucun effet sur les souches étudiées. Cependant toute action inhibitrice observée est donc due à la présence des molécules actives dans les extraits testés.

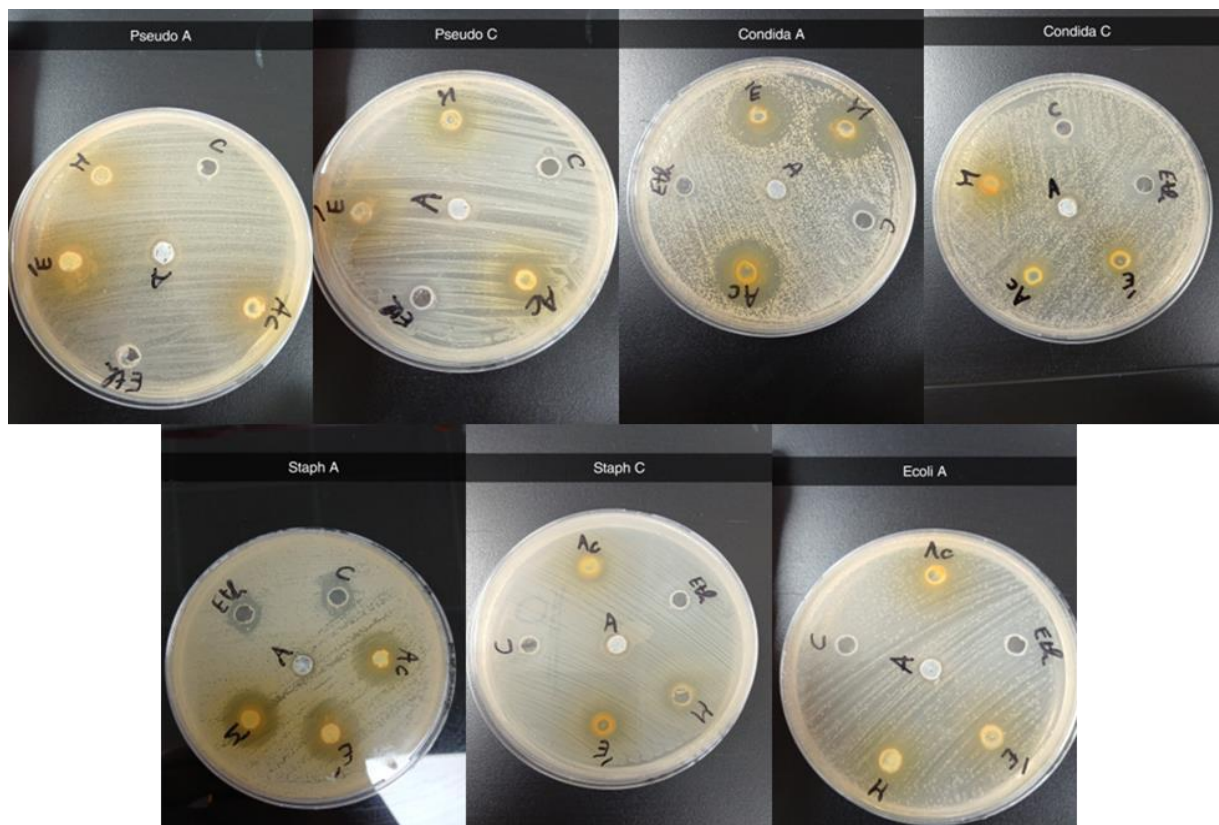


Figure 24: zones d'inhibition produites par les extraits de silybum marianum contre les souches bactériennes testées

Table 21: Diamètres des zones d'inhibition des différents extraits et d'huile végétale de graines de *S.marianum*.

Souches testés	Diamètre d'inhibition (mm)					
	HV	EX.C	EX.M	EX.E	EX.AC	EX.A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	9.8	9.2	9	8.4	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinique	6	9.6	8.8	7	7.8	6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7	6	7.2	10	8	6
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique	10	8	8.2	8	10	6
<i>Condida albicans</i> ATCC 10231	6	8.6	12	13	15	6
<i>Condida albicans</i> clinique	8	7.2	7.7	8	7.5	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6	7	9	8	8	6

HV : Huile végétale, **EX.C :** Extrait chloroformique , **EX.M :** Extrait méthanolique , **EX.E :** Extrait éthanolique , **EX.AC :** Extrait acétonique , **EX.A :** Extrait aqueux .

L'analyse des diamètres des zones d'inhibition met en évidence une sensibilité variable des microorganismes testés vis-à-vis des extraits et d'huile végétale de graines de *Silybum marianum*.

Les résultats présentés dans le tableau 7 montrent que les extraits obtenus à partir des graines de *Silybum marianum* possèdent une activité antimicrobienne différente selon la souche microbienne et le solvant d'extraction utilisé. Les diamètres d'inhibition mesurés varient entre 6 et 15 mm, ce qui traduit une activité allant de faible à modérée, voire importante dans certains cas.

L'extrait acétonique (EX.AC) a présenté l'activité antimicrobienne la plus élevée, avec un diamètre maximal de 15 mm contre *Candida albicans* ATCC 10231, suivi de l'extrait éthanolique (13 mm) et méthanolique (12 mm). Cette forte sensibilité indique que les composés antifongiques des graines sont mieux extraits par les solvants organiques de polarité intermédiaire, notamment l'acétone et aussi la richesse de ces extraits en composés phénoliques et flavonoidiques, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

Concernant les bactéries Gram positives, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a montré une sensibilité modérée à l'extrait éthanolique (10 mm) et de l'extrait acétonique (8 mm), tandis que la souche clinique a été plus sensible à l'huile végétale et à l'extrait acétonique (10 mm). Cette activité peut être attribuée à la présence de composés phénoliques et flavonoïdiques capables de perturber la membrane cytoplasmique bactérienne.

Les bactéries Gram négatives ont été les moins sensibles. Chez *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, le diamètre maximal observé est de 9,8 mm avec l'extrait chloroformique, alors que la souche clinique présente un diamètre maximal de 9,6 mm avec le même extrait. Cette faible activité est probablement liée à la présence d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides, constituant une barrière efficace contre les substances antimicrobiennes.

Pour *Escherichia coli* ATCC 8739, les extraits méthanolique, éthanolique et acétonique ont montré des diamètres compris entre 8 et 9 mm, traduisant une faible sensibilité de cette bactérie.

L'huile végétale présente la plus faible activité inhibitrice souvent proches de (6 mm), ce qui suggère une faible diffusion ou une faible concentration en substances bioactives dans ces fractions. Même pour l'extrait aqueux (EX.A) s'est révélé totalement inefficace contre

toutes les souches testées, avec un diamètre constant de 6 mm, correspondant au diamètre du puits. Cela indique l'absence d'activité antimicrobienne (résistance) détectable et suggère que les molécules responsables de l'activité biologique sont peu solubles dans l'eau.

Dans notre étude, les diamètres d'inhibition variaient entre 6 et 15 mm, avec une activité maximale observée pour l'extrait acétonique contre *Candida albicans* ATCC 10231 (15 mm). Ces résultats sont proches de ceux obtenus par **Bessam et Mehdadi (2014)**, qui ont rapporté des diamètres de 12 mm contre *Candida albicans*, 16 mm contre *Bacillus cereus* et 12 mm contre *Escherichia coli* pour l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Silybum marianum*.

Des valeurs supérieures ont été rapportées par **Al-Mallah et al. (2024)**, qui ont observé des zones d'inhibition atteignant 21 à 34 mm avec l'extrait éthanolique de graines de *S. marianum* contre plusieurs bactéries pathogènes multirésistantes. Ces diamètres sont nettement plus élevés que ceux obtenus dans notre travail, probablement en raison d'une concentration plus importante en composés phénoliques et flavonoïdes ou de différences dans les conditions expérimentales.

De même, une étude récente de caractérisation phytochimique de *S. marianum* a montré que l'extrait acétonique produisait des diamètres de 27,3 mm contre *Staphylococcus aureus*, 24,7 mm contre *Pseudomonas aeruginosa* et 18 mm contre *Candida albicans*, valeurs largement supérieures aux nôtres. À l'inverse, des valeurs inférieures ont été rapportées par **Bessam et Mehdadi (2014)** pour l'extrait chloroformique, où les diamètres d'inhibition n'excédaient pas 2 à 6 mm contre *Candida albicans* et 2 à 4 mm contre les bactéries testées. De plus, les extraits butanoliques et aqueux n'ont montré aucune activité antimicrobienne. Ces résultats sont inférieurs à ceux observés dans notre étude pour les extraits organiques.

Globalement, nos résultats se situent dans une gamme intermédiaire par rapport à la littérature. Les différences observées peuvent être attribuées à l'origine géographique de la plante, au type de solvant utilisé, à la concentration des extraits, à la méthode d'extraction ainsi qu'à la sensibilité intrinsèque des souches microbiennes testées. Cette variabilité a également été soulignée par **Bessam et Mehdadi (2014)**, qui indiquent que l'activité biologique dépend fortement de la composition flavonoïdique des extraits et des conditions d'extraction.

V.3.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)

Les résultats de la détermination de la CMI et de la CMB ont montré une sensibilité

Résultats et discussion

variable des souches bactériennes aux extraits testés. Les faibles valeurs de CMI observées traduisent une bonne activité inhibitrice. Par ailleurs, l'analyse du rapport CMB/CMI a permis de caractériser le mode d'action des extraits. Lorsque ce rapport était inférieur ou égal à 4, l'effet observé était bactéricide, tandis qu'un rapport supérieur à 4 indiquait une activité bactériostatique.

En se Référant au rapport CMB/CMI, l'effet antimicrobien peut être jugé comme suit (Sbayou et al, 2014) :

Rapport CMB/CMI <4 : effet bactéricide

Rapport CMB/CMI >4 : effet bactériostatique

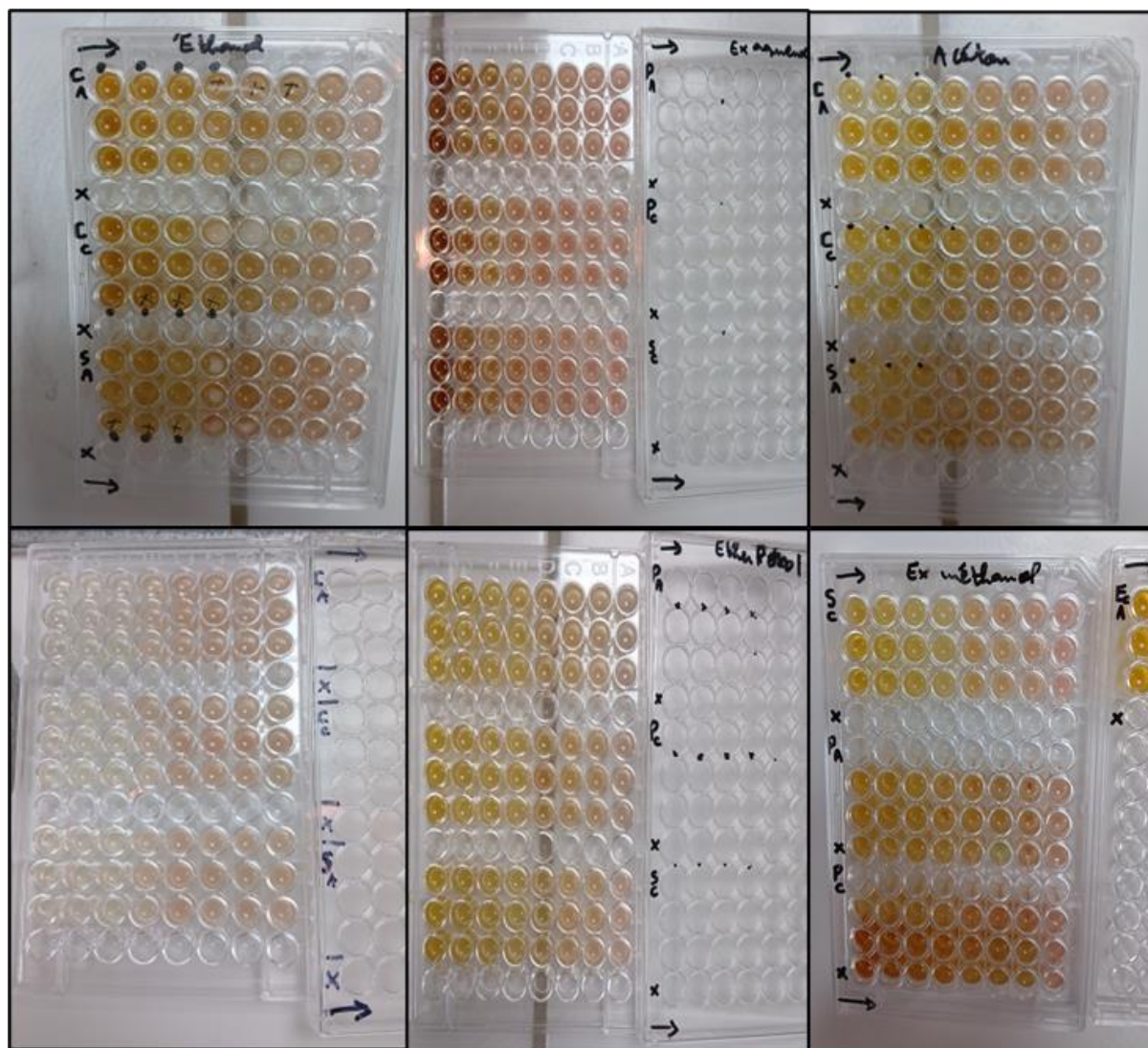


Figure 25 : Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents extraits de *Silybum marianum* par microdilution en milieu liquide.

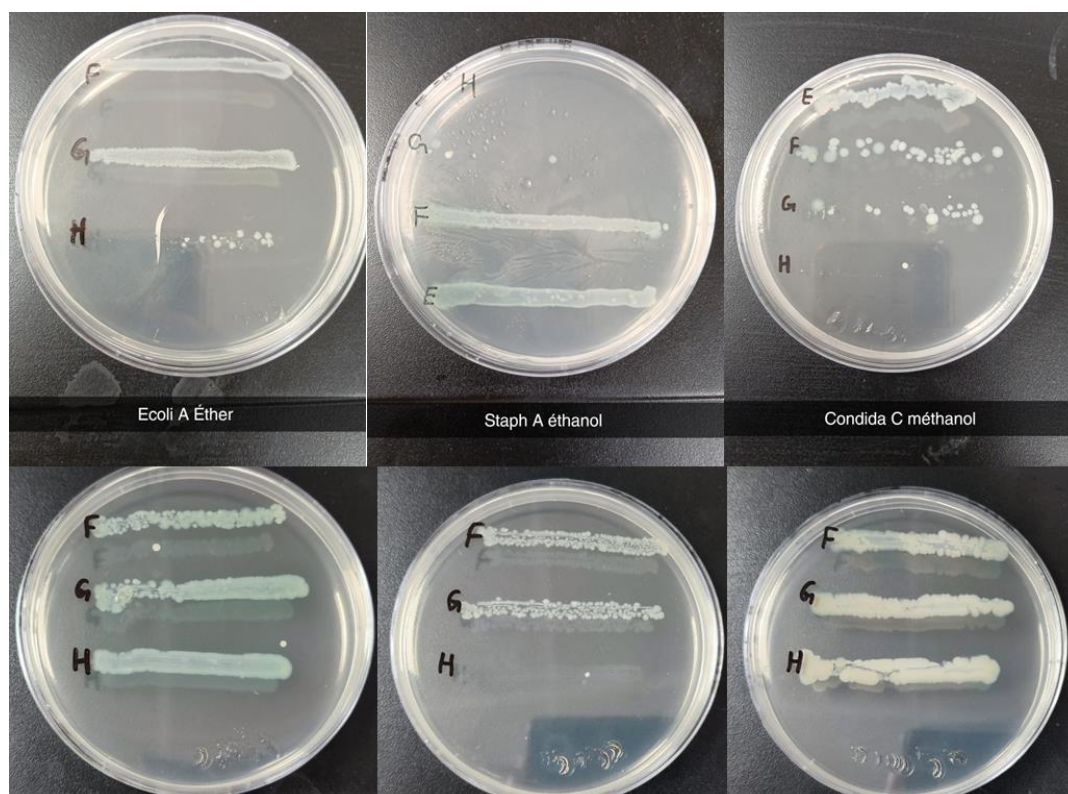


Figure 26: Résultats du repiquage sur gélose pour la détermination de la CMB des extraits de *Silybum marianum* vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Table 22: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'huile végétale ,CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ;CMB : Concentration Minimale Bactéricide .

Souche	CMI	CMB	CMB/CMI	Activité
<i>E.coli ATCC</i>	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>P.aeruginosa ATCC</i>	37.5	150	4	Bactéricide
<i>P. aeruginosa clinique</i>	37.5	75	2	Bactéricide
<i>C.albicans ATCC</i>	37.5	75	2	Bactéricide
<i>C.albicans clinique</i>	18.75	75	4	Bactéricide
<i>S.aureus ATCC</i>	18.75	37.5	2	Bactéricide
<i>S.aureus clinique</i>	37.5	150	4	Bactéricide

Les résultats montrent que l'huile végétale étudiée possède une activité antimicrobienne variable selon les microorganismes testés. Les valeurs de CMI obtenues sont comprises entre 18,75 et 37,5 mg/μL, traduisant une capacité d'inhibition de la croissance microbienne.

La plus faible CMI a été observée pour *E. coli ATCC*, *S. aureus ATCC* et *C. albicans*

clinique (18,75 mg/μL), indiquant une sensibilité relativement élevée à l'huile testée. Cependant, malgré cette faible CMI, le rapport CMB/CMI de *E. coli* ATCC est égal à 8, ce qui révèle un effet bactériostatique, c'est-à-dire que l'huile inhibe la croissance bactérienne sans provoquer une destruction complète des cellules.

En revanche, pour *P. aeruginosa* ATCC, *P. aeruginosa clinique*, *S. aureus* ATCC, *S. aureus clinique*, ainsi que pour les deux souches de *Candida albicans*, les rapports CMB/CMI sont compris entre 2 et 4. Ces valeurs témoignent d'un effet bactéricide ou fongicide, traduisant une destruction effective des microorganismes après exposition à l'huile.

L'activité la plus marquée a été observée contre *S. aureus* ATCC, pour laquelle la CMB est seulement deux fois supérieure à la CMI (37,5 contre 18,75 mg/μL; CMB/CMI = 2), indiquant une forte efficacité létale. Cette sensibilité plus importante des bactéries Gram positives est souvent attribuée à l'absence de membrane externe lipopolysaccharidique, contrairement aux bactéries Gram négatives qui possèdent une barrière supplémentaire limitant la pénétration des composés actifs.

La souche clinique de *P. aeruginosa* présente également un rapport CMB/CMI de 2, ce qui suggère une bonne efficacité bactéricide de l'huile malgré la réputation de cette bactérie pour sa résistance naturelle aux agents antimicrobiens.

Globalement, l'huile végétale issue des graines de *S. marianum* présente :

- . Une activité bactériostatique vis-à-vis de *E. coli* ATCC.
- . Une activité bactéricide contre les souches de *P. aeruginosa* et *S. aureus*.
- . Une activité fongicide contre les souches de *Candida albicans*.

Ces résultats suggèrent que cette huile pourrait constituer une source intéressante de composés bioactifs à potentiel antimicrobien, particulièrement contre les bactéries Gram positives et les levures pathogènes.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique des graines de *Silybum marianum* possède une activité antimicrobienne variable selon les microorganismes testés. Les valeurs de CMI sont comprises entre 18,75 et 75 mg/μL, ce qui témoigne d'une capacité d'inhibition modérée à importante de la croissance microbienne.

Table 23: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait éthanolique.

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Activité
<i>E.coli ATCC</i>	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>P.aeruginosa ATCC</i>	37.5	75	2	Bactéricide
<i>P.aeruginosa clinique</i>	37.5	150	4	Bactéricide
<i>C.albicans ATCC</i>	18.75	75	4	Bactéricide
<i>C.albicans clinique</i>	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>S.aureus ATCC</i>	75	150	2	Bactéricide
<i>S.aureus clinique</i>	18.75	75	4	Bactéricide

Les plus faibles valeurs de CMI (18,75 mg/μL) ont été enregistrées pour *E. coli ATCC*, *C. albicans ATCC*, *C. albicans clinique* et *S. aureus clinique*, indiquant une sensibilité élevée de ces souches à l'extrait. Cependant, malgré cette forte inhibition, *E. coli ATCC* et *C. albicans clinique* présentent un rapport CMB/CMI égal à 8, révélant une activité respectivement bactériostatique et fongistatique. L'extrait inhibe donc leur croissance sans provoquer leur destruction complète aux concentrations testées.

En revanche, les souches de *P. aeruginosa*, *S. aureus* ainsi que *C. albicans ATCC* présentent des rapports CMB/CMI compris entre 2 et 4, indiquant une activité bactéricide ou fongicide. Ces résultats montrent que l'extrait est capable d'entraîner la mort des cellules microbiennes après inhibition de leur croissance.

L'activité létale la plus marquée est observée contre *P. aeruginosa ATCC* et *S. aureus ATCC*, pour lesquelles le rapport CMB/CMI est égal à 2. Pour *P. aeruginosa ATCC*, une CMI de 37,5 mg/μL et une CMB de 75 mg/μL ont été enregistrées, tandis que pour *S. aureus ATCC*, les valeurs sont respectivement de 75 mg/μL et 150 mg/μL. Ces résultats traduisent une forte activité bactéricide de l'extrait.

Par ailleurs, la souche clinique de *S. aureus* apparaît particulièrement sensible à l'extrait, avec une CMI de 18,75 mg/μL et une CMB de 75 mg/μL, confirmant l'efficacité de l'extrait contre certaines souches pathogènes d'origine clinique.

Globalement, l'extrait éthanolique de *Silybum marianum* présente :

- .Une activité bactériostatique contre *E. coli ATCC*.
- .Une activité fongistatique contre *C. albicans clinique*.

.Une activité bactéricide contre les souches de *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

.Une activité fongicide contre *C. albicans* ATCC.

Ces résultats mettent en évidence le potentiel antimicrobien de l'extrait éthanolique des graines de *Silybum marianum*, dont l'activité pourrait être liée à la présence de composés phénoliques, flavonoïdes et autres métabolites secondaires bioactifs.

Table 24: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait méthanolique.

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Activité
<i>E.coli</i> ATCC	37.5	75	2	Bactéricide
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>P.aeruginosa</i> clinique	37.5	150	4	Bactéricide
<i>C.albicans</i> ATCC	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>C.albicans</i> clinique	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>S.aureus</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>S.aureus</i> clinique	18.75	150	8	Bactéricide

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique des graines de *Silybum marianum* possède une activité antimicrobienne variable selon les microorganismes testés. Les valeurs de CMI sont comprises entre 18,75 et 37,5 mg/μL, indiquant une capacité d'inhibition de la croissance microbienne relativement importante.

Les plus faibles valeurs de CMI (18,75 mg/μL) ont été observées pour les deux souches de *Candida albicans* ainsi que pour *S. aureus* clinique, ce qui traduit une sensibilité élevée de ces microorganismes à l'extrait méthanolique. Cependant, malgré cette forte inhibition, les deux souches de *Candida albicans* présentent un rapport CMB/CMI de 8, révélant une activité fongistatique. L'extrait inhibe donc leur croissance sans provoquer leur destruction complète.

Concernant les bactéries, *E. coli* ATCC apparaît sensible à l'extrait avec une CMI de 37,5 mg/μL et une CMB de 75 mg/μL. Le rapport CMB/CMI égal à 2 indique une activité bactéricide marquée. De même, les souches *P. aeruginosa* ATCC, *P. aeruginosa* clinique et *S. aureus* ATCC présentent des rapports CMB/CMI de 4, traduisant également une activité bactéricide.

Les résultats suggèrent donc que l'extrait méthanolique exerce une action plus efficace contre les bactéries que contre les levures du genre *Candida*. Cette différence pourrait être liée

Résultats et discussion

à la structure de la paroi cellulaire des levures, qui constitue une barrière limitant la pénétration des composés bioactifs présents dans l'extrait.

Globalement, l'extrait méthanolique de *Silybum marianum* présente :

.Une activité bactéricide contre *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC, *P. aeruginosa* clinique et *S. aureus* ATCC.

.Une activité fongistatique contre les souches de *Candida albicans*.

.Une activité probablement bactériostatique contre *S. aureus* clinique si le rapport CMB/CMI (= 8) est confirmé.

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique possède un potentiel antimicrobien intéressant, particulièrement contre les bactéries pathogènes. Cette activité pourrait être attribuée à sa richesse en composés phénoliques, flavonoïdes et autres métabolites secondaires extraits efficacement par le méthanol.

Table 25: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait acétonique.

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Activité
<i>E.coli</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>P.aeruginosa</i> clinique	37.5	150	4	Bactéricide
<i>C.albicans</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>C.albicans</i> clinique	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>S.aureus</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>S.aureus</i> clinique	18.75	150	8	Bactériostatique

Les résultats obtenus montrent que l'extrait acétonique des graines de *Silybum marianum* possède une activité antimicrobienne variable selon les microorganismes testés. Les valeurs de CMI sont comprises entre 18,75 et 37,5 mg/μL, indiquant une capacité d'inhibition de la croissance microbienne relativement importante.

Les plus faibles valeurs de CMI (18,75 mg/μL) ont été observées pour *C. albicans* clinique et *S. aureus* clinique, ce qui traduit une sensibilité élevée de ces microorganismes à l'extrait acétonique. Cependant, malgré cette forte inhibition, ces deux souches présentent un rapport CMB/CMI de 8, révélant une activité statique (fongistatique pour la levure,

bactériostatique pour le staphylocoque). L'extrait inhibe donc leur croissance sans provoquer leur destruction complète.

Concernant les autres souches (*E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC, *P. aeruginosa* clinique, *C. albicans* ATCC, *S. aureus* ATCC), le rapport CMB/CMI est égal à 4, seuil de l'activité cide. L'extrait acétonique est donc bactéricide contre l'ensemble des bactéries testées (y compris la souche clinique de *P. aeruginosa*) et fongicide contre *C. albicans* ATCC.

On observe une différence de comportement entre souches de référence et souches cliniques pour *C. albicans* et *S. aureus* : les souches cliniques sont plus sensibles à l'inhibition (CMI plus basse) mais l'effet n'est que statique, tandis que les souches ATCC sont tuées (effet cide). Cette disparité pourrait refléter des adaptations phénotypiques ou des mécanismes de tolérance propres aux isolats cliniques.

Les résultats suggèrent donc que l'extrait acétonique exerce une action létale contre la majorité des souches testées, y compris une souche clinique de *P. aeruginosa*, mais seulement une action inhibitrice contre les souches cliniques de *C. albicans* et *S. aureus*.

Globalement, l'extrait acétonique de *Silybum marianum* présente :

- Une activité bactéricide/fongicide contre *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* (ATCC et clinique), *C. albicans* ATCC et *S. aureus* ATCC (rapport CMB/CMI = 4).
- Une activité fongistatique contre *C. albicans* clinique (rapport = 8).
- Une activité bactériostatique contre *S. aureus* clinique (rapport = 8).

Ces résultats montrent que l'extrait acétonique possède un potentiel antimicrobien intéressant, particulièrement contre les bactéries pathogènes comme *P. aeruginosa* (y compris une souche clinique). Cette activité pourrait être attribuée à sa richesse en composés phénoliques, flavonoïdes et autres métabolites secondaires extraits efficacement par l'acétone.

Table 26 : Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait éther de pétrole.

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Activité
<i>E.coli</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>P.aeruginosa</i> clinique	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>C.albicans</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>C.albicans</i> clinique	18.75	150	8	Bactériostatique
<i>S.aureus</i> ATCC	75	150	2	Bactéricide
<i>S.aureus</i> clinique	18.75	150	8	Bactériostatique

Les résultats obtenus montrent que l'extrait éther de pétrole des graines de *Silybum marianum* possède une activité antimicrobienne variable selon les microorganismes testés. Les valeurs de CMI sont comprises entre 18,75 et 75 mg/μL, indiquant une capacité d'inhibition modérée à intéressante.

Les plus faibles CMI (18,75 mg/μL) sont observées pour *P. aeruginosa* (ATCC et clinique), *C. albicans clinique* et *S. aureus clinique*. Ces souches sont très sensibles à l'inhibition de croissance. Cependant, toutes présentent un rapport CMB/CMI = 8, révélant une activité statique (bactériostatique pour les bactéries, fongistatique pour la levure). L'extrait bloque leur multiplication sans les détruire.

CMI intermédiaire (37,5 mg/μL) : *E. coli* ATCC et *C. albicans* ATCC. Pour *E. coli*, rapport = 4 → bactéricide. Pour *C. albicans* ATCC, rapport = 4 → fongicide.

CMI la plus élevée (75 mg/μL) : *S. aureus* ATCC, avec un rapport CMB/CMI = 2 → bactéricide marqué. C'est la souche la moins sensible à l'inhibition (CMI haute), mais une fois la concentration critique atteinte, l'effet est fortement létal.

On observe une différence nette entre souches ATCC et cliniques pour *P. aeruginosa*, *C. albicans* et *S. aureus* : les souches cliniques ont une CMI plus basse (plus sensibles à l'inhibition) mais l'effet est seulement statique, tandis que les souches ATCC correspondantes présentent un effet cide (sauf pour *P. aeruginosa* ATCC qui est aussi statique. Pour *C. albicans* : ATCC = fongicide, clinique = fongistatique. Pour *S. aureus* : ATCC = bactéricide, clinique = bactériostatique.

L'extrait éther de pétrole semble donc particulièrement actif en concentration létale contre *E. coli* ATCC, *S. aureus* ATCC et *C. albicans* ATCC, mais seulement inhibiteur contre les souches cliniques de ces espèces (sauf *P. aeruginosa* où il est inhibiteur pour les deux).

Globalement, l'extrait éther de pétrole de *Silybum marianum* présente :

- Une activité bactéricide contre *E. coli* ATCC (rapport = 4) et *S. aureus* ATCC (rapport = 2).
- Une activité fongicide contre *C. albicans* ATCC (rapport = 4).
- Une activité bactériostatique contre *P. aeruginosa* (ATCC et clinique), *S. aureus* clinique (rapports = 8).
- Une activité fongistatique contre *C. albicans* clinique (rapport = 8).

Ces résultats montrent que l'extrait éther de pétrole possède un potentiel antimicrobien intéressant, mais variable selon l'origine de la souche (ATCC vs clinique). L'effet létal est observé principalement sur les souches de référence, tandis que les isolats cliniques ne sont que inhibés. Cette différence pourrait être liée à des mécanismes d'adaptation ou de tolérance aux composés extraits par l'éther de pétrole (lipides, terpènes, etc.).

Table 27: Valeurs des paramètres antimicrobienne de l'extrait aqueux.

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Activité
<i>E.coli</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>P.aeruginosa</i> clinique	37.5	150	4	Bactéricide
<i>C.albicans</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>C.albicans</i> clinique	37.5	150	4	Bactéricide
<i>S.aureus</i> ATCC	37.5	150	4	Bactéricide
<i>S.aureus</i> clinique	37.5	150	4	Bactéricide

Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux des graines de *Silybum marianum* possède une activité antimicrobienne uniforme sur l'ensemble des microorganismes testés. Les valeurs de CMI sont identiques pour toutes les souches (37,5 mg/μL) et le rapport CMB/CMI est systématiquement égal à 4, seuil de l'activité cide.

Toutes les souches bactériennes (*E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* ATCC et clinique, *S. aureus* ATCC et clinique) présentent un rapport CMB/CMI = 4, indiquant une activité bactéricide. L'extrait aqueux est donc capable de tuer aussi bien les souches de référence que les souches cliniques de *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Les deux souches de *Candida albicans* (ATCC et clinique) montrent également un rapport CMB/CMI = 4, traduisant une activité fongicide. Contrairement aux extraits acétonique et éther de pétrole, l'extrait aqueux agit de manière létale même sur la souche clinique de *C. albicans*.

Contrairement aux autres extraits, on n'observe pas de différence entre souches ATCC et cliniques ni entre espèces. Toutes les CMI sont égales (37,5 mg/μL) et tous les rapports CMB/CMI sont à la limite supérieure de l'effet cide (4).

Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux contient des composés hydrosolubles (polyphénols polaires, tanins, etc.) exerçant une action antimicrobienne large, constante et

létale sur l'ensemble des microorganismes testés, y compris les isolats cliniques souvent plus tolérants.

Globalement, l'extrait aqueux des graines de *Silybum marianum* présente :

- Une activité bactéricide contre *E. coli* ATCC, *P. aeruginosa* (ATCC et clinique), *S. aureus* (ATCC et clinique).
- Une activité fongicide contre *C. albicans* (ATCC et clinique).

Toutes les souches testées sont inhibées et tuées à la même concentration critique (CMI = 37,5 mg/μL ; CMB = 150 mg/μL ; rapport = 4). L'extrait aqueux se distingue par son effet létal universel et son absence de différence entre souches de référence et cliniques. Cette propriété en fait un candidat prometteur pour des applications antimicrobiennes, potentiellement liée à sa richesse en composés polaires bioactifs.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *Silybum marianum* présentent une activité antimicrobienne variable selon le solvant utilisé et la souche microbienne testée. Les extraits méthanolique, éthanolique, acétonique, éther de pétrole et aqueux ont montré des effets bactéricides, fongicides, bactériostatiques ou fongistatiques selon les microorganismes étudiés.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Saraçoğlu et al. (2017)**, qui ont rapporté une activité antimicrobienne des extraits éthanoliques et de l'huile des graines de *S. marianum* contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Les auteurs ont observé une inhibition de toutes les souches testées, confirmant le large spectre d'action antimicrobienne de cette plante.

Les résultats obtenus avec les extraits méthanolique et acétonique sont également comparables à ceux rapportés par **Selim et al. (2025)**, qui ont montré que les extraits méthanoliques et acétoniques de *S. marianum* possédaient les activités antimicrobiennes les plus élevées parmi les solvants étudiés. Dans cette étude, *P. aeruginosa* figurait parmi les microorganismes les plus sensibles, avec des zones d'inhibition supérieures à celles obtenues avec l'extrait aqueux.

Concernant l'activité antifongique, nos résultats montrent une activité fongicide ou fongistatique selon l'extrait et la souche de *Candida albicans*. Ces observations concordent avec celles de **Janeczko et Kochanowicz (2019)**, qui ont démontré que la silymarine extraite de *S. marianum* possède une activité antifongique significative contre plusieurs espèces de

Candida, avec des CMI comprises entre 30 et 300 µg/mL. Les valeurs obtenues dans leur étude sont inférieures aux nôtres, indiquant une activité antifongique plus marquée. Cette différence peut être attribuée à la nature de l'extrait utilisé, la silymarine étant un extrait enrichi en flavonolignanes bioactives.

Par ailleurs, **Oliveira *et al.*, (2015)** ont rapporté une activité antimicrobienne relativement faible de la silymarine brute contre plusieurs bactéries pathogènes, avec des CMI de l'ordre de 512 µg/mL pour la plupart des souches bactériennes et une activité antifongique limitée. Ces résultats sont inférieurs à ceux observés dans notre étude, ce qui suggère que les extraits bruts obtenus à partir des graines entières pourraient contenir d'autres composés bioactifs agissant en synergie avec la silymarine.

Nos résultats sont également proches de ceux rapportés par **Lekhal *et al.*, (2021)**, qui ont étudié différents extraits de *S. marianum* et observé une activité antibactérienne notable de l'extrait butanolique contre des bactéries Gram positif, avec une CMI de 23,35 mg/mL. Cette valeur est du même ordre de grandeur que certaines concentrations inhibitrices observées dans notre travail.

Globalement, les différences observées entre notre étude et les travaux antérieurs peuvent être expliquées par plusieurs facteurs : la nature du solvant d'extraction, la partie de la plante utilisée, l'origine géographique du matériel végétal, la concentration en composés phénoliques et flavonoïdes, ainsi que les caractéristiques propres des souches microbiennes testées.

L'ensemble de ces résultats confirme que *Silybum marianum* constitue une source prometteuse de molécules antimicrobiennes naturelles. L'activité observée pourrait être attribuée à la présence de flavonolignanes (silybine, silychristine, silydianine), de flavonoïdes, de composés phénoliques et de tanins capables d'altérer la membrane cellulaire des microorganismes et de perturber leurs fonctions métaboliques.

IV.4 Evaluation de l'activité antioxydante

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

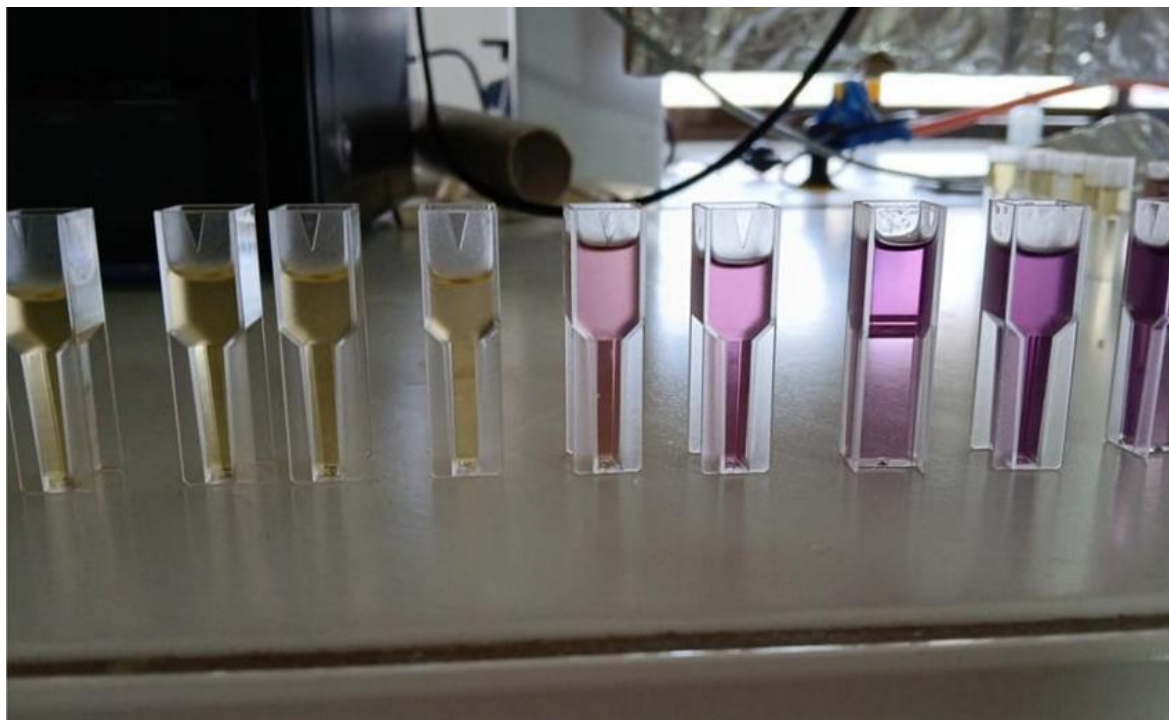


Figure 27: Décoloration du DPPH indiquant le pouvoir antioxydant de l'extrait de *Silybum marianum*.

Plusieurs concentrations d'extraits ont été testées pour leurs activités antioxydantes in vitro. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon. Le pourcentage d'inhibition (PI%) du radical stable (DPPH•) enregistré par les différents extraits et l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique) .

Table 28: Valeurs des IC₅₀ des différentes extraits, d'huile végétale et du standard(acide ascorbique)par le test du DPPH .

Extraits	IC ₅₀ (mg/ml)
Huile végétale	2.18 mg/ml
Extrait méthanolique	2.62 mg/ml
Extrait éthanolique	2.26 mg/ml
Extrait acétonique	1.90 mg/ml
Extrait chloroformique	3.40 mg/ml
Extrait éther de pétrole	48.80 mg/ml
Extrait aqueux	3.09 mg/ml
Acide ascorbique	27.10 ug/ml

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de *Silybum marianum* possèdent une activité antioxydante variable, évaluée par leur capacité à piéger le radical libre DPPH. L'activité antioxydante est inversement proportionnelle à la valeur de l'IC₅₀ : plus cette valeur est faible, plus l'extrait est efficace.

Parmi les extraits étudiés, l'extrait acétonique a présenté la meilleure activité antioxydante avec une IC₅₀ de 1,90 mg/ml, suivi de l'huile végétale (2,18 mg/ml), de l'extrait éthanolique (2,26 mg/ml), de l'extrait méthanolique (2,62 mg/ml), de l'extrait aqueux (3,09 mg/ml) et de l'extrait chloroformique (3,40 mg/ml). En revanche, l'extrait à l'éther de pétrole a montré la plus faible activité avec une IC₅₀ de 48,80 mg/ml, traduisant une faible capacité à neutraliser les radicaux libres.

L'acide ascorbique, utilisé comme standard de référence, a présenté une IC₅₀ de 27,10 µg/ml, nettement inférieure à celles des extraits testés, ce qui confirme son fort pouvoir antioxydant. Toutefois, les résultats obtenus indiquent que les graines de *Silybum marianum* renferment des composés bioactifs capables de contribuer à la neutralisation des radicaux libres.

Classement de l'activité antioxydante (de la plus forte à la plus faible)

Extrait acétonique (1,90 mg/ml) > Huile végétale (2,18 mg/ml) > Extrait éthanolique (2,26 mg/ml) > Extrait méthanolique (2,62 mg/ml) > Extrait aqueux (3,09 mg/ml) > Extrait chloroformique (3,40 mg/ml) > Extrait éther de pétrole (48,80 mg/ml).

Ces résultats suggèrent que l'acétone est le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés antioxydants présents dans les graines de *Silybum marianum*.

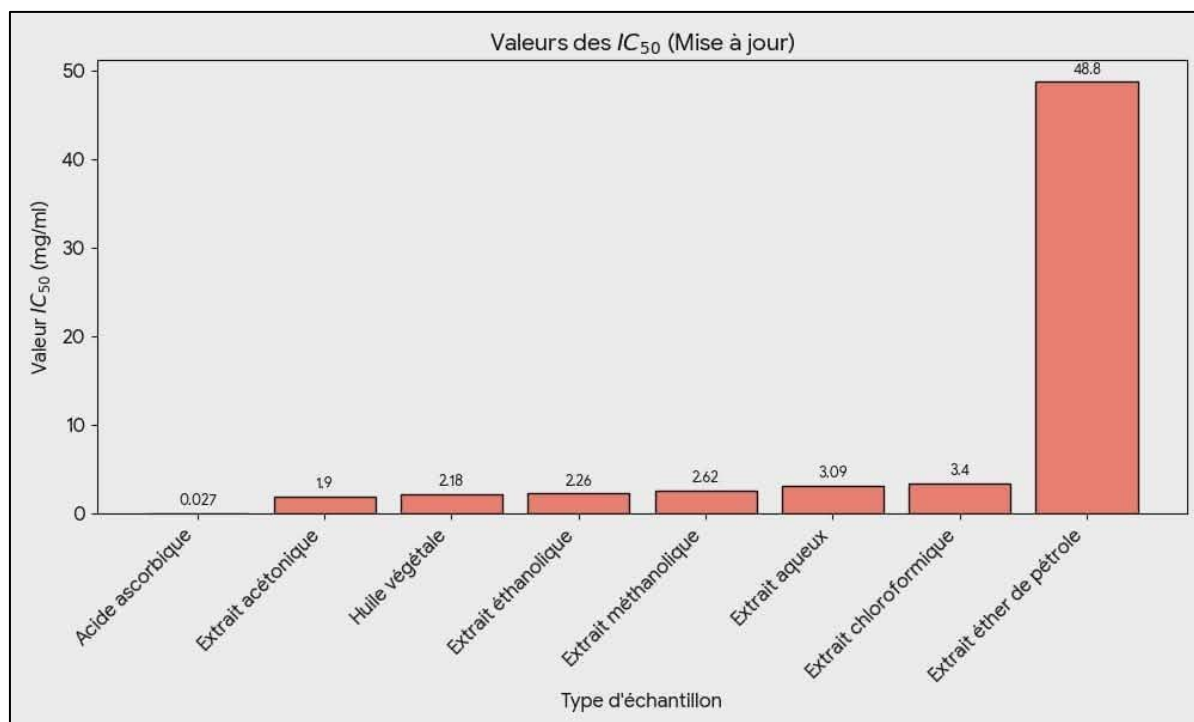


Figure 28: Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50% de DPPH des différents extraits en mg/ml.

Cette hiérarchie indique que les solvants polaires ou de polarité intermédiaire, notamment l'acétone, permettent une meilleure extraction des composés antioxydants présents dans les graines de *Silybum marianum*.

Les valeurs obtenues dans notre étude sont supérieures à celles rapportées par **Benmansour (2020)**, qui a observé pour l'extrait chloroformique de *S. marianum* une IC_{50} de 17,94 mg/ml et pour l'extrait butanolique une IC_{50} de 6,45 mg/ml. Notre extrait chloroformique a présenté une IC_{50} de 3,40 mg/ml, indiquant ainsi une activité antioxydante plus importante. Cette différence pourrait être liée à l'origine géographique des graines, au stade de maturité de la plante, aux conditions d'extraction ou encore à la richesse en métabolites secondaires des échantillons étudiés.

Par ailleurs, nos résultats sont relativement similaires à ceux observés dans plusieurs travaux montrant que les extraits bruts de *S. marianum* possèdent une activité antioxydante modérée à élevée, dépendante de leur teneur en composés phénoliques. **Çelik et al(2017)** ont démontré que l'extrait éthanolique des graines de chardon-Marie possède une forte capacité de piégeage du radical DPPH et protège efficacement les biomolécules contre le stress oxydatif. Ces auteurs ont attribué cette activité à la présence de flavonolignanes et de polyphénols dans les graines.

En revanche, plusieurs études ont rapporté des activités antioxydantes nettement supérieures à celles observées dans notre travail. **Hashem et Kadum (2022)** ont obtenu une IC_{50} de 5,13 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait éthanolique à 80 % des graines de *S. marianum*, tandis qu'**El Guiche et al. (2025)** ont rapporté une IC_{50} de 19,2 $\mu\text{g/ml}$. Ces valeurs, exprimées en microgrammes par millilitre, témoignent d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus élevé que celui de nos extraits, dont les IC_{50} sont exprimées en milligrammes par millilitre. Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation de techniques d'extraction optimisées, notamment l'extraction assistée par micro-ondes, ainsi que par une concentration plus élevée en composés phénoliques et flavonoïdes.

De même, **Abenavoli et al(2020)** ont montré que la silymarine purifiée extraite des graines de *S. marianum* présente une IC_{50} de 6,56 $\mu\text{g/ml}$. Cette activité très élevée comparativement à nos résultats s'explique par le fait que la silymarine est une fraction enrichie en flavonolignanes bioactifs, alors que nos extraits sont des mélanges complexes contenant à la fois des composés actifs et inactifs.

Enfin, l'acide ascorbique utilisé comme référence a présenté une IC_{50} de 27,10 $\mu\text{g/ml}$, confirmant son fort pouvoir antioxydant. La différence observée entre le standard et les extraits végétaux est attendue, car l'acide ascorbique est un composé pur doté d'une activité antiradicalaire élevée, tandis que les extraits végétaux renferment une diversité de molécules dont les effets peuvent être synergiques ou antagonistes. Nos résultats confirment néanmoins que les graines de *Silybum marianum* constituent une source naturelle intéressante d'antioxydants et que l'extrait acétonique est le plus efficace parmi les extraits étudiés.

Conclusion générale

Conclusion

Les plantes médicinales de la nature présentent une source indéfinie des molécules bioactives, ces molécules résultant de métabolites secondaires produits à partir de métabolisme des nutriments, que sont très utilisées par l'homme dans les domaines médicinales. Dans le cadre de la valorisation de ces ressources, Une plante médicinale *Silybum marianum* a fait l'objet d'une étude phytochimique de ses extraits, de son potentiels antioxydant et de son activité antimicrobienne.

Ce travail a porté sur l'étude phytochimique ainsi que sur l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne des graines de *Silybum marianum*. Les rendements d'extraction ont montré une variation importante selon la polarité du solvant utilisé. Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'extrait chloroformique (20,68 %), suivi de l'hexane (18 %), de l'éther de pétrole (14,76 %), du méthanol (10,72 %), de l'acétone (7,6 %), de l'éthanol (7,4 %) et de l'extrait aqueux (4,52 %).

Le criblage phytochimique a révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires d'intérêt biologique, notamment les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les saponosides. Les extraits méthanolique, éthanolique et acétonique se sont distingués par une richesse plus importante en composés phénoliques, tandis que l'extrait à l'éther de pétrole a présenté une absence de ces métabolites, ce qui souligne l'influence de la nature du solvant sur l'extraction des substances bioactives.

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH a montré que tous les extraits possèdent une capacité de piégeage des radicaux libres, avec des intensités variables. L'extrait acétonique a présenté la meilleure activité antioxydante avec une IC_{50} de 1,90 mg/ml, suivi de l'huile végétale (2,18 mg/ml), de l'extrait éthanolique (2,26 mg/ml), du méthanolique (2,62 mg/ml), de l'aqueux (3,09 mg/ml) et du chloroformique (3,40 mg/ml). L'extrait à l'éther de pétrole a montré l'activité la plus faible avec une IC_{50} de 48,80 mg/ml. Ces résultats confirment la relation entre la richesse en composés phénoliques et le potentiel antioxydant des extraits.

Concernant l'activité antimicrobienne, les extraits ont montré une efficacité variable selon les microorganismes testés. Les diamètres d'inhibition ont varié de 6 à 15 mm. L'extrait acétonique a présenté la meilleure activité contre *Candida albicans* ATCC 10231 avec un diamètre d'inhibition de 15 mm, tandis que l'extrait éthanolique a montré une inhibition de 13 mm sur la même souche. Les extraits ont également exercé une activité modérée contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. En revanche, l'extrait

Conclusion

aqueux a montré une activité faible avec des diamètres d'inhibition généralement limités à 6 mm.

L'ensemble de ces résultats démontre que les graines de *Silybum marianum* constituent une source prometteuse de composés bioactifs dotés de propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. L'extrait acétonique apparaît comme l'extrait le plus performant, tant sur le plan antioxydant que sur le plan antimicrobien, ce qui suggère sa richesse en molécules actives susceptibles d'être valorisées dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et cosmétique.

À la lumière des résultats obtenus au cours de ce travail, il apparaît que *Silybum marianum* (Asteraceae), récoltée en Algérie, représente une source prometteuse de composés bioactifs dotés de remarquables potentiels antioxydant et antimicrobien. Néanmoins, la réalisation d'une étude toxicologique approfondie s'avère indispensable afin d'évaluer l'innocuité de ces extraits, d'identifier d'éventuels effets secondaires et de caractériser précisément les mécanismes et les sites d'action de leurs principes actifs.

Enfin, au vu de l'immense biodiversité de la flore algérienne qui demeure encore largement inexplorée, les perspectives de recherche dans ce domaine s'avèrent particulièrement vastes. Chaque espèce végétale constitue un réservoir unique de métabolites secondaires, caractérisé par un profil phytochimique et des propriétés pharmacologiques spécifiques qui méritent d'être valorisés.

Références bibliographiques

Références bibliographies

A

Abenavoli, L., et al. (2020). Extraction, Chemical Composition, Antioxidant Property, and In-vitro Anticancer Activity of Silymarin from *Silybum marianum*. Current Drug Discovery Technologies.

Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Ryan D. Sample preparation in the analysis of phenolic compounds in fruits. Analyst 2000 ; 125 : 989-1009.

Adreea Smeu 1, 2. M.-I. (2025, 2 8). Flavonoids and Flavonoid-Based Nanopharmaceuticals as Promising Therapeutic Strategies for Colorectal Cancer—An Updated Literature Review.

Abbassia, B. (2019, 7 28). Caractérisation et Valorisation d'une plante de la famille des astéracées de la région de Sidi Bel Abbès :Évaluation des substances bioactives de *Silybum marianum*.

Achat S. Polyphénols de l'alimentation, extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec les ions métalliques. Thèse de doctorat. Université A. MIRA-BEJAIA 2013.P22.

Asada Y.,Oshikawa T., Welli,1998, Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. Planta medica. 64(8): 746-747.

Al-Mallah, N. M., et al. (2024). Effects of *Silybum marianum* seed extracts on multidrug-resistant bacteria.

B

Benmansour, D. (2020). L'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de *Silybum marianum*. Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès.

BENCHAACHOUA, A. (2019). Caractérisation et valorisation d'une plante de la famille des astéracées de la région de Sidi Bel Abbès : évaluation des substances bioactives de *Silybum marianum* (Thèse de doctorat). Université Djillali Liabès.

Bessam, F. Z., & Mehdadi, Z. (2014). Evaluation of the antibacterial and antifungal activity of flavonoid extracts from *Silybum marianum* L. seeds and identification of flavonoid compounds by TLC and HPLC. Advances in Environmental Biology, 8(17), 1–9.

BOUAZIZ, A. L. (2014). Identification de métabolites secondaires des plantes,protecteurs des photorécepteurs à cônes pour le traitement de. Paris.

Bouras M. Étude comparative et optimisation de prétraitements des écorces de bois pour l'extraction des composés phénoliques. Thèse de doctorat. Université de Technologie de Compiègne 2015 : 65p.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.

Article gratuit disponible sur PubMed Central .

Badiaga M. Étude ethnobotanique, phytochimique et l'activité biologique de *Nauclea*

Latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au mali ». Thèse de doctorat, Université Bamako 2012:76p.

Bessam, F. Z., & Mehdadi, Z. (2014). Evaluation of the antibacterial and antifungal activity of flavonoid extracts from *Silybum marianum* L. seeds and identification of flavonoid compounds by TLC and HPLC. *Advances in Environmental Biology*, 8(17), 1-9.

Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology* 1995 ; 28 : 25-30.

C

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

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

Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12 (4): 564- 582.

Carole I., Hervé Q., Jean-Christophe O. Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement. Springer-Verlag, France 2011: 312p .

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

Chaouch TM. Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid -Tlemcen (UABT) 2014 : p 18, 35.

Çelik, S., et al. (2017). Assessment of the Antioxidant Activity of *Silybum marianum* Seed Extract and Its Protective Effect against DNA Oxidation, Protein Damage and Lipid Peroxidation. *Food Technology and Biotechnology*.

D

DE Moffarts B., Kirschvink N., Art T., Pincemail J., Michaux C., Cayeux K., Defraigne JO., Lekeux P. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 2004; 1: 211-220.

E

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

El Babili, F., Bouajila, J., Souchard, J. P., Bertrand, C., Bellvert, F., et Fouraste, I. (2020). Valorization of DPPH radical scavenging assay through quantification of reaction products by HPLC-DAD. *European Journal of Medicinal Plants*, 31(5), 1–11.

El Guiche, R., et al. (2025). Preliminary Data on *Silybum marianum* Metabolites: Comprehensive Characterization, Antioxidant, Antidiabetic and Antimicrobial Activities. *Metabolites*.

F

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

Farhat Ali KHan, M. Z. (2014). A general introduction to medicinal plants and *silybum marianum*. *Life Science Journal* , 471_481.

G

Gouveia SC., Castilho PC. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke- based dietary supplements. *Food Research International* 2012; (48): 712–724.

H

Harbome JB. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman & Hall Ed London 1998: p15, 42, 203-214.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10), 628-638.

HAMMA, S. A. (2021). Explorations biochimiques du stress oxydatif : cours destiné aux étudiants de 3ème année médecine. Faculté de Médecine, Université Salah Bounider Constantine 3.

Hulankova, R. (2024). Methods for determination of antimicrobial activity of essential

oils in vitro—A review. *Plants*, 13(19), 2784.

Huda Khalil Al_Bazaz, M. I.-E. (2020). Pharmacological and Pharmacognostical Activity of *Silybum marianum*. *Al Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Hashem, M., & Kadum, H. (2022). Study of Antioxidant and Antidiabetic Activities of Ethanolic and Aqueous Extracts of *Silybum marianum* Seeds in Iraq. *International Journal of Science, Mathematics and Technology Learning*.

J

Janeczko, M., & Kochanowicz, E. (2019). Silymarin, a Popular Dietary Supplement Shows Anti-Candida Activity. *Antibiotics*, 8(4), 206.

K

Khan, F. A., Zahoor, M., Ullah, N., Khan, S., Khurram, M., Khan, S., & Ali, J. (2014). A general introduction to medicinal plants and *Silybum marianum*. *Life Science Journal*, 11(9s), 471–481.

KRIEF, S. (2004, MAI 29). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. OUGANDA.

Kedare, S. B., et Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.

L

Li F., Liuqing Y., Ting Z., Jiangli Z., Yanmin Zou., Ye Z., Xiangyang W. Optimization of enzymatic pretreatment for n-hexane extraction of oil from *Silybum marianum* seeds using response surface methodology (2011) *Food and bioproducts processing*, 90, 87–94.

Lakenbrink C.; Capczynskis M.; Engelhardt U.H., 2000 - Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea other caffeinated beverages . *J Agric Food Chem*; 48, pp.2848-52.

Lukic, I., Milovanovic, S., Pantic, M., Srbljak, I., Djuric, A., Tadic, V., & Tyśkiewicz, K. (2022). Separation of high-value extracts from *Silybum marianum* seeds: Influence of extraction technique and storage on composition and bioactivity. *LWT*, 160, 113319.

Liangli LY. *Wheat Antioxidants*. Hoboken N.J., Wiley-Interscience 2008: 213p.

Lekhal, A., Timziouine, D., & Chouachi, M. (2021). L'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de *Silybum marianum*. *Mémoire de Master, Université Djillali Liabès, Sidi Bel Abbès, Algérie*.

M

Michel T. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Thèse de

doctorat. Université d'Orléans 2011: p28, 50,183, 288.

Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Nature and Technologie* 2013 ; p 36-40.

Magalhães LM. , Segundo MA., Reis S., Lima JL. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta*. 2008 14;613(1).

Milić, N., Milošević, N., Suvajdzić, L., Žarkov, M., & Abenavoli, L. (2013). New therapeutic potentials of milk thistle (*Silybum marianum*). *Natural Product Communications*, 8(12), 1801–1810.

Macheix JJ., Annie F. ; Christian JA. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes, 2005 : p 1, 24,37.

Manach C.; Scalbert A.; Morand C.; Rémésy C.; Jiménez L., 2004 - Polyphénols: food sources and bioavailability. *The American of Clinical Nutrition* 79, pp727-31.

Macheix J.J. ; Fleuriet A. ; Jay –allemand C., 2005 - Les composés phénoliques des végétaux ; Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, pp.122-123.

MPONDO Emmanuel, Y. J. (2015). Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences* , 7804-7823.

Malešev D., Kuntić V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian chemical society* 2007 ; 72 (10) : 921-939.

Marmouzi, I., Bouyahya, A., Ezzat, S. M., El Jemli, M., & Kharbach, M. (2021). The food plant *Silybum marianum* (L.) Gaertn.: Phytochemistry, ethnopharmacology and clinical evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113303.

N

Neïla Ben Rahal. (2012). Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de *Silybum marianum* : étude de leurs activités antioxydante et antitumorale (Thèse de doctorat, Université de Lorraine).

Namsoo, K., et In-Seon, P. (2001). Biological activities of saponins from medicinal plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(8), 1648–1651.

Nkhili FZ. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du fer et du cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. Université de Cadi Ayyad

– Marrakech 2009 : p17-20.

Nabila BOUGANDOURA, N. B. (2013, Juin 9). Evaluation de activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta(L)* Briq. Nature and Technologie .B-Sciences Agronomiques et Biologique , pp. 14-19.

O

Oyaizu M. Studies on products of browning Reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from Glucosamine. Japanese J. of Nutrition 1986;44: 307–315.

Ou BX., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., Deemer EK., Prior RL., Huang DJ. Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002,10 (50): 2772-2777.

Oliveira, D. R., Tintino, S. R. M., Braga, M. F. B. M., et al. (2015). In Vitro Antimicrobial and Modulatory Activity of the Natural Products Silymarin and Silibinin. BioMed Research International, 2015, 292797.

P

Pokorny J., Korczak J., Gordon M. Preparation of natural antioxidant, in Antioxidants in Food: Practical Applications, 1st ed, Woodhead Publishing Limited, Abington, Cambridge, England 2001; p311-330

Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Silybum marianum* L. via Multi-Solvent Extraction. Scientific Reports, 2025.

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

Prior RL., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005; 53(10): 4290-4302.

Padma M1, G. S. (2019). Phytochemical screening and GC–MS analysis of bioactive compounds present in ethanolic leaves extract of *Silybum marianum*(L). Journal of Drug Delivery and Therapeutics , 85_89.

Prieto PM., Pineda M. Aguilar Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 1999; 269: 337–341.

Q

Quy Diem DO., Angkawijaya Q., Tran-Nguyen AE., Lien HuongHuynh PL., Edi

SF., Suryadi I., HsuJu Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*, journal of food and drug analysis 2014 ;(22): 296 -302.

R

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. FreeRadical Biology and Medicine 1999; 26(9-10): 1231-1237.

S

Sbayou, H., Ababou, B., Boukachabine, K., Manresa, A., Zerouali, K., & Amghar, S. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Artemisia herba-alba* and *Mentha pulegium* essential oils. Journal of Life Sciences, 8(1), 35–41.

Saraçoğlu, O., et al. (2017). Effects of Potassium Sulfate on the Element Contents, Polyphenol Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Milk Thistle (*Silybum marianum*). Pakistan Journal of Medical Sciences, 33(1), 102–107.

Selim, S., et al. (2025). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Silybum marianum* L. via multi-solvent extraction.

Syed Muhammad Mukarram Shah, F. A. (2011). Evaluation of Phytochemicals and Antimicrobial Activity of White and Blue Capitulum and Whole Plant of *Silybum Marianum*. World Applied Sciences Journal , 1139_1144.

SEREME A, M.-R. J. (2008). PROPRIETES THERAPEUTIQUES DES PLANTES A TANNINS DU BURKINA FASO. Pharmacopée et Médecinetraditionnelle Africaines , p. 41_49.

V

Vergely C. ; Luc R. Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. Médecine thérapeutique Cardiologie 2003; 1(3): 131-139.

Y

Yadav, M. K., & Tiwari, S. K. (2023). Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, 92(6), 745 765.

Z

Zhang, X., Liu, M., Wang, Z., Wang, P., Kong, L., Wu, J., Wu, W., Ma, L., Jiang, S., Ren, W., Du, L., Ma, W., & Liu, X. (2024). A review of the botany, phytochemistry, pharmacology, synthetic biology and comprehensive utilization of *Silybum marianum*. Frontiers in Pharmacology, 15, 1417655.

Annexes

Annexe n°1

Milieux de culture

Bouillon nutritif (BN) (g/l)

Peptone... 10 g
Extrait de viande... 5 g
Chlorure de sodium... 5 g
Eau distillée... 1000 ml
pH = 7,3 ± 0,2

Gélose nutritive (GN) (g/l)

Peptone... 10 g
Extrait de viande... 3 g
Extrait de levure... 3 g
Chlorure de sodium... 5 g
Agar... 18 g
Eau distillée... 1000 ml
pH = 7,3 ± 0,2

Mueller Hinton gélosé (M-H) (g/l)

Extrait de viande... 3 g
Hydrolysate acide de caséine... 17,5 g
Amidon... 1,5 g
Agar... 16 g
Eau distillée... 1000 ml
pH = 7,3

Bouillon Mueller Hinton (g/l)

Extrait de viande... 3 g
Hydrolysate acide de caséine... 17,5 g
Amidon... 1,5 g
Eau distillée... 1000 ml
pH = 7,3