



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ ECHAHID HAMMA LAKHDAR EL-OUED



FACULTÉ DES SCIENCES APPLIQUÉE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE DES PROCÉDÉS
Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat LMD

Filière : Génie Des Procédés

Spécialité : Génie Chimique

**Screening phytochimiques et identification de polyphénols,
évaluation de l'activité antioxydante et étude de propriétés
biologiques d'extrait de *Silybum marianum* (L.)**

Présenté par :

GUEMARI Fathi

Soutenu publiquement Le : 12 Mars 2022

Devant le jury composé de

Mr. KHELEF Abdelhamid	Pr	Université d'El-Oued	Président
Mr. LAOUINI Salah Eddine	Pr	Université d'El-Oued	Rapporteur
Mr. REBIAI Abdelkrim	MCA	Université d'El-Oued	Co-Rapporteur
Mr. BENMYA Omar	Pr	Université d'El-Oued	Examineur
Mr. ATIA Djamel	MCA	Université d'El-Oued	Examineur
Mr. SEKIRIFA Mohamed Lamine	Pr	Université d'Ouargla	Examineur
Mr. CHENNOUF Nasreddine	Pr	Université d'Ouargla	Examineur

Année Universitaire : 2021-2022

Remerciements

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail.

Je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force

A l'esprit de mon père, que Dieu ait pitié de lui et prenne pitié de tous les musulmans morts.

À la chère mère.

Je tiens à remercier : professeurs membres de jury.

A mon très chère femme Mehri Zakia, en signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, pour ces sacrifices, ces encouragements, sa fidélité et sa gentillesse. Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail.

A mes chers frères et sœurs, Idris, Hamza, Foussef, Melouda et Karima et Henda et Hajete et Khadija ainsi qu'à leurs petites familles.

J'adresse mes très sincères remerciements à Monsieur Dr. L. Salah Eddine, Et Dr. R. Abdelkrim, Et B. Abderrahmane, Professeurs à l'université de Hamma Lakhdar El oued pour leur soutien et leurs précieux conseils.

J'adresse mes très sincères remerciements à Monsieur. T. Ali, Et Sadek, et tous les conseils qu'ils ont pu me fournir, les efforts, la gentillesse, et le support que j'ai reçu lors des moments les plus difficiles de ce travail.

À tous les ingénieurs du laboratoire, M. Laouini, B. Djamilia, M. Dia, M. Founess, M. Adrika.

Toute personne a participé de près ou de loin dans la réalisation de mon travail.

A tous ceux qui m'aiment.

G. Fathi

ملخص:

قمنا من خلال هذه الرسالة بدراسة نبات شوك الجمل (*Silybum marianum* (L.) ، حيث قسمنا النبات الى أربعة اجزاء: الأوراق، الأغصان، الازهار والبذور ولعل الأصل الجغرافي والاستخدام التقليدي لهذا النبات واللذان يؤثران على التكوين الطبيعي للنبات يعتبران من بين معايير الاختيار لهذه النبتة محل الدراسة، تركز بحثنا على تحديد المركبات الفينولية (البوليفينول، الفلافونويد والفلافانول) ، كما قمنا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للميكروبات للأجزاء الأربعة من النبات. تم تحديد البوليفينولات الكلية بطريقة سينفليتون وروس Ross و Singleton باستخدام كاشف الفولان Folin-Ciocalteu كما تم تحديد الفلافونويدات الكلية بطريقة كلوريد الألومنيوم وتقدير محتوى الفلافانولات الكلية في المستخلصات المختلفة بطريقة Mbaebie et al. كما قمنا بابتكار طريقة جديدة لتقدير كمية البوليفينولات الكلية باستعمال برنامج الأورانج (طريقة التنبؤ). من ناحية أخرى تم تقييم السعة الإجمالية لمضادات الأكسدة بعدة طرق: طريقة الفسفوموليبيدينوم، اختبار DPPH، طريقة FRAP والتي تعتمد على اختزال شوارد Fe^{+3} في المركب $K_3Fe(CN)_6 (Fe^{+2})$. كما قمنا بتحديد جملة من المواد عن طريق الفصل بواسطة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء HPLC. بالنسبة لتقييم النشاط المضاد للبكتيريا فقد استخدمنا طريقة الانتشار بالقرص. بينت النتائج اختلاف محتوى الفينولات الفلافونويدات الفلافانولات في العينات النباتية الأربعة ووجد أن المحتوى الفينولي أكثر فعالية للنشاط المضاد للأكسدة والمحتوى الفلافونويدي أكثر فعالية لمضادات الميكروبات.

الكلمات المفتاحية: استخلاص، مركب حيوي، بوليفينول، مضاد للأكسدة، *Silybum marianum* (L.) شوك الجمل، مضاد للجراثيم.

Abstract

This thesis was devoted to the study of the plant *Silybum marianum* (L.), to study this plant we divided it into four parts of leaves, twigs, flowers and grains. Among the criteria that led to the selection of this plant, is the geographical origin and traditional use of this plant, which affects the natural composition of the plant, our research focuses on the identification of phenolic compounds (polyphenols, flavonoids, and flavanol), evaluation of antioxidant and activity antimicrobial For the four samples of plant *Silybum marianum* (L.). The determination of the total polyphenols (TPC) by the method of Singleton and Ross using the Folin-Ciocalteu reagent, total flavonoid (TFC) by the method aluminum chloride method Ordonnez, and The estimation of the total flavanol content in the various extracts is carried out contained is carried out by the method of Mbaebie et al. Create a new method for estimating total polyphenols (TPC) using orange program (prediction method). The total antioxidant capacity (CAT) of the extracts is evaluated by the phosphomolybdène method, DPPH test We use (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), The determination of antioxidant capacity by the FRAP method is carried out as follows The FRAP method is basedon the present ferric iron (Fe^{3+}) reduction reaction in the $K_3Fe(CN)_6$ ferrous iron (Fe^{2+}) complex by an antioxidant. The results of the separation by high performance liquid chromatography HPLC. Evaluation of antibacterial activity we use the disk spread method [Kar et Jain (1971)]. Phenol content and flavonoid content and flavanol content of the four plant samples varied and phenol content showed more effective for antioxidant activity and flavonoid content showed more effective for antimicrobial.

Keywords: *Silybum marianum* (L.); Extraction; Bioactive compound; Polyphenols; Antioxidant; Antibacterial.

Résumé

Cette thèse a été consacrée à l'étude de la plante *Silybum marianum* (L.), pour étudier cette plante nous l'avons divisée en quatre parties : feuilles, branches, fleurs et grains. Parmi les critères qui ont conduit à la sélection de cette plante, est l'origine géographique et l'utilisation traditionnelle de cette plante, qui affecte la composition naturelle de la plante, nos recherches se concentrent sur l'identification des composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et flavanol), évaluation de l'antioxydant et de l'activité antimicrobienne. Pour les quatre échantillons de plante *Silybum marianum* (L.). La détermination des polyphénols totaux (TPC) par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu, le flavonoïde total (TFC) par la méthode au chlorure d'aluminium méthode Ordonnez, et l'estimation de la teneur totale en flavanol dans les différents extraits est réalisée le contenu par la méthode de Mbaebie et al. Créer une nouvelle méthode d'estimation des polyphénols totaux (TPC) à l'aide de programme orange (méthode de prévision). La capacité antioxydant totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode au phosphomolybdène, test DPPH. Nous utilisons (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), la détermination de l'antioxydante de la capacité par la méthode FRAP est réalisée comme suit : La méthode FRAP est basée sur la présente réaction de réduction du fer ferrique (Fe^{+3}) dans le complexe de fer ferreux (Fe^{+2}) $K_3Fe(CN)_6$ par un antioxydant. Les résultats de la séparation par un liquide haute performance chromatographie HPLC. Évaluation de l'activité antibactérienne. Nous utilisons la méthode d'étalement du disque [Kar et Jain (1971)]. La teneur en phénol et en flavonoïdes et la teneur en flavanol des quatre échantillons de plantes variaient, et la teneur en phénol s'est révélée plus efficace pour l'activité antioxydante, et la teneur en flavonoïdes s'est révélée plus efficace pour les antimicrobiens.

Mots-clés: *Silybum marianum* (L.); Extraction; Composé bioactif; Polyphénols; Antioxydant; Antibactérien.

Liste des figures

Désignations	Page
<i>Chapitre I : Généralités sur l'espèce Silybum marianum (L.)</i>	
Figure I-1. Photo de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.) (Dans la zone de Bin Qasha El-Oued).	11
Figure I-2. Chemin suivie de l'emplacement de la <i>Silybum marianum</i> (L.) (Dans la zone de Bin Qasha El-Oued).	11
Figure I-3. Photo des quatre échantillons de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.)	12
Figure I-4. Image en gros plan de la feuille plante <i>Silybum marianum</i> (L.) Dans la zone de Bin Qasha El-Oued.	12
Figure I-5. Image en gros plan de la feuille plante <i>Silybum marianum</i> (L.) Dans la zone de Bin Qasha El-Oued.	13
Figure I-6. Image en gros plan des branches plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	13
Figure I-7. Vue à distance de la fleur plante <i>Silybum marianum</i> (L.) Dans la zone de Bin Qasha El-Oued.	14
Figure I-8. Image en gros plan de la fleur plante <i>Silybum marianum</i> (L.) Dans la zone de Bin Qasha El-Oued.	14
Figure I-9. Image en gros plan des grains plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	15
Figure I-10. Image en gros plan de grain plante <i>Silybum marianum</i> (L.)	15
Figure I-11. Schéma de la fleur de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.)	16
Figure I-12. Schéma de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.)	16
<i>Chapitre II : Etude sur les polyphénols</i>	
Figure II-01. Structure du noyau phénol.	22
Figure II-02. Structure des polyphénols.	23
Figure II-03. Structure de base des flavonoïdes	27
Figure II-04. Structures de base des principaux Flavonoïdes.	27
Figure II-05. Structure de base des flavanols.	28

Figure II-06. Classification de tanins et leurs structures chimiques.	30
Figure II-07. Structures et classifications des composés phénoliques.	32
Figure II-08. Molécule biradical libre de dioxygène.	33
Chapitre III : Matériel et méthode	
Figure III-1. Cinétique de séchage de l'échantillon des feuilles <i>Silybum marianum</i> (L.).	42
Figure III-02. Cinétique de séchage de l'échantillon des branches <i>Silybum marianum</i> (L.).	42
Figure.III-03. Cinétique de séchage de l'échantillon de la plante des Fleurs <i>Silybum marianum</i> (L.).	43
Figure.III-04. Cinétique de séchage de l'échantillon de la plante des Grains <i>Silybum marianum</i> (L.).	43
Figure.III-05. Cinétique de séchage des quatre échantillons de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	44
Figure III-06. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.	47
Figure III-07. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.	48
Figure III-08. Courbe d'étalonnage pour le dosage des Flavanols totaux.	49
Figure III-09. Structure du flux de travail dans Orange Software	51
Figure III-10. Courbe UV de l'acide gallique aux différentes concentrations	53
Figure III-11. Courbe UV de la quercétine aux différentes concentrations.	53
Figure III-12. Courbe UV de la rutine aux différentes concentrations	54
Figure III-13. Courbe UV pour l'acide gallique, la quercétine et la rutine test de vérification de concentration différent pour les mélanges 1 et 2.	55
Figure III-14. Courbe UV des feuilles de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.) à concentration déférente	57
Figure III-15. Courbe UV des branches de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.) à concentration déférente	58
Figure III-16. Courbe UV des fleurs de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.) à concentration déférente.	58

Figure III-17. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.	60
Figure III-18. Réduction du radical libre DPPH.	61
Figure III-19. Première expérience d'effet d'extrait des fleurs de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	62
Figure III-20. Deuxième expérience d'effet d'extrait des fleurs de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	62
Figure III-21. Troisième expérience d'effet d'extrait des fleurs de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	63
Figure III-22. Première expérience d'effet d'extrait des branches de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	64
Figure III-23. Deuxième expérience d'effet d'extrait des branches de <i>Silybum marianum</i> L sur le radical DPPH.	64
Figure III-24. Troisième expérience d'effet d'extrait des branches de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	65
Figure III-25. Première expérience d'effet d'extrait des feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	66
Figure III-26. Deuxième expérience d'effet d'extrait des feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	66
Figure III-27. Troisième expérience d'effet d'extrait des feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	67
Figure III-28. Première expérience d'effet d'extrait des grains de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	68
Figure III-29. Deuxième expérience d'effet d'extrait des grains de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	68
Figure III-30. Troisième expérience d'effet d'extrait des grains de <i>Silybum marianum</i> (L.) sur le radical DPPH.	69
Figure III-31. Effet de l'acide ascorbique sur le radical DPPH.	70
Figure III-32. Courbe d'étalonnage de FeSO ₄ à H ₂ SO ₄ .	71
Figure III-33. Profil chromatographique HPLC des feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.).	73
Figure III-34. Profil chromatographique HPLC des branches de <i>Silybum marianum</i> (L.).	73

Figure III-35. Profil chromatographique HPLC des Fleurs plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	74
Figure III-36. Profil chromatographique HPLC des grains plante <i>Silybum marianum</i> L.	74
Figure III-37. Spectre de FT-IR des feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.).	75
Figure III-38. Spectre de FT-IR des branches de <i>Silybum marianum</i> (L.).	76
Figure III-39. Spectre de FT-IR des fleurs de <i>Silybum marianum</i> (L.).	76
Figure III-40. Spectre de FT-IR des grains de <i>Silybum marianum</i> (L.).	77
<i>Chapitre IV : Résultats et discussions</i>	
Figure IV-01. Pourcentage des Polyphénols totaux dans les quatre extraits de la plante.	86
Figure IV-02. Pourcentage des Flavonoïdes totaux dans les quatre extraits de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	87
Figure IV-03. Pourcentage des Flavanols totaux dans les quatre extraits de la plante.	88
Figure IV-04. Capacité antioxydante totale des extraits des quatre échantillons.	92
Figure IV-05. Valeurs des resultants d'activités antioxydante DPPH des extraits des quatre échantillons de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	93
Figure IV-06. Valeurs des resultants d'activités antioxydante FRAP des extraits des quatre échantillons de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	94
Figure IV-07. Valeurs des resultants des Concentrations des polyphénols des extraits des quatre échantillons de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	97
Figure IV-08. Test antibactérien de concentration 100 mg/ml bacteria EC.	102
Figure IV-09. Test antibactérien des fleurs de concentration 50 mg/ml bacteria EC.	103

Liste des tableaux

Désignations	Page
Chapitre I : Généralités sur l'espèce <i>Silybum marianum</i> (L.)	
Le tableau I.1. Classification du <i>Silybum marianum</i> (L.)	10
Chapitre II : Etude sur les polyphénols	
Tableau II-1. Principales classes de composés phénoliques.	29
Chapitre III : Matériel et méthode	
Tableau III-01 : Quantité d'eau et matière sèche pour les quatre échantillons de la plante.	44
Tableau III-02 : Masse des extraits des quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.).	45
Tableau III-03 : Rendements d'extraction des quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.).	45
Tableau III-4. Souches bactériennes testées pour l'activité antibactérienne.	78
Chapitre IV : Résultats et discussions	
Tableau IV-01 : Polyphénols totaux dans les quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.).	86
Tableau IV-02 : Flavonoïdes totaux dans les quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.).	87
Tableau IV-03 : Flavanols totaux dans les quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.).	88
Tableau IV-4 : Résultats obtenus dans les deux mélanges.	89
Tableau IV-5 : Comparaison des résultats des deux méthodes.	89
Tableau IV-06. Pourcentage d'extraction, contenu en polyphénols des trois échantillons d'une plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	90
Tableau IV-7. Concentrations obtenues dans le cadre du programme et valeurs d'absorptions maximales pour les trois échantillons de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.) (Nouvelle et traditionnelle).	90

Tableau IV-8. Comparaison de la teneur totale en polyphénols dans les feuilles, les branches et les fleurs par deux méthodes (nouvelle et traditionnelle)	91
Tableau IV-9. Capacité antioxydante totale des quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.).	92
Tableau IV-10 : Résultats d'activités antioxydant FRAP des quatre échantillons.	94
Tableau IV-11. Concentration des polyphenols des extraits de feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.).	95
Tableau IV-12. Concentration des polyphénols des extraits de branches de <i>Silybum marianum</i> (L.).	95
Tableau IV-13. Concentration des polyphénols des extraits de Fleurs de <i>Silybum marianum</i> (L.).	96
Tableau IV-14. Concentration des polyphénols des grains de variété <i>Silybum marianum</i> (L.).	96
Tableau IV-15. Polyphénols des extraits des quatre échantillons de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	97
Tableau IV-16. Résultats d'antibactérienne des quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.).	102
Annexe	
Tableau III-01 : Cinétique de séchage de l'échantillon des feuilles <i>Silybum marianum</i> (L.).	108
Tableau III-02 : Cinétique de séchage de l'échantillon des branches <i>Silybum marianum</i> (L.).	108
Tableau III-03 : Cinétique de séchage de l'échantillon des Fleurs <i>Silybum marianum</i> (L.).	108
Tableau III-04 : Cinétique de séchage de l'échantillon des Grains <i>Silybum marianum</i> (L.).	108
Tableau III-05 : Absorption de l'acide gallique à l'éthanol à différente concentration.	109
Tableau III-06 : Absorption de quercitrine à l'éthanol à différente concentration.	109

Tableau III-07 : Absorption Quercétine à l'éthanol à différente concentration.	109
Tableau III-08 : Absorption de l'acide ascorbique à l'éthanol à différente concentration.	109
Tableau III-09 : Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition des Fleurs.	109
Tableau III-10 : Equation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des Fleurs.	110
Tableau III-11 : Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition des branches.	110
Tableau III-12 : Equation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des branches.	110
Tableau III-13 : Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition des feuilles.	110
Tableau III-14 : Equation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des feuilles.	110
Tableau III-15 : Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition des grains.	111
Tableau III-16 : Equation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des grains.	111
Tableau III-17 : Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.	111
Tableau III-18 : Equation de graphe, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.	112
Tableau III-19 : Absorption de l'acide ascorbique à l'éthanol à différente concentration.	112
Tableau IV-01 : Absorption des quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.). Pour calculer les Polyphénols.	112
Tableau IV-02 : Absorption des quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.) Pour calculer les Flavonoïdes.	112

Tableau IV-03 : Absorption des quatre échantillons de <i>Silybum marianum</i> (L.).Pour calculer les Flavanols.	113
Tableau IV-04 : Absorption des quatre extraits de <i>Silybum marianum</i> (L.) Pour la capacité antioxydante totale.	113
Tableau IV-05 : Absorption des quatre extraits de <i>Silybum marianum</i> (L.) Pour l'activité antioxydante FRAP.	113
Tableau IV-06 : Temps des retentions des standards des composés phénoliques.	114
Tableau IV-07 : Equations des standards des composés phénoliques.	114

Liste des abréviations

Abréviation	Designations
PPT	Polyphénols totaux
FVT	Flavonoïdes totaux
FLT	Flavanols totaux
AG	Acide gallique
EAG	Équivalent acide gallique
EQ	Équivalent quercétine
ER	Équivalent Rutine
ECa	Équivalent catéchine
Orange Data Mining	les méthodes de prédiction de régression linéaire dans l'outil Orange Data Mining pour l'analyse et la prédiction de la teneur en phénols dans <i>Silybum marianum</i> (L.).
C_{GA}	Concentration d'acide gallique en mélange.
C⁽²⁾	Concentration calculée par Orange Data Mining Tool en mg/ml.
Absor	Absorbance des mélanges 1 et 2 en λ max de GA et Qer et Rou en (nm).
C_{Sample}	Concentration de polyphénol des échantillons de la plante en (mg GA / g DW).
C_{ODMT}	Concentration calculée par Orange Data Mining Tool en (mg/m).
Absor	Absorbance de l'échantillon en λ max en (nm)
EAA	Équivalent acide ascorbique
BHA	Butyl hydroxy anisole
BHT	Butyl hydroxy toluene
CAT	Capacité antioxydante totale
DPPH	1,1- diphenyl-2-pierylhydrazyl
FRAP	Ferrique Réductrice Antioxydante Puissance

EFeSO₄	Équivalent sulfate de fer
MS	Masse sèche
TPTZ	2, 4,6-tris (2-pyridyl)-1,3, 5-s-triazine
IC	Concentration inhibitrice
HPLC	La chromatographie liquide de haute performance
UV- visible	Spectrophotométrie ultra violet
FT-IR	Spectrophotométrie de l'infrarouge
OH	Groupe hydroxyle
E. coli	Escherichia coli (ATCC 25922)
Pa	Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)
Sa	Salmonella (ATCC 44300)
M₃	Candida albicans (ATCC 10231)
Lm	Liseria monocytogenes (ATCC 13932)
Sa.typhi	Salmonella enterica serovar Typhi (ATCC 14028)
B.s	Bacillus subtilis (ATCC 6633)

Table des Matières

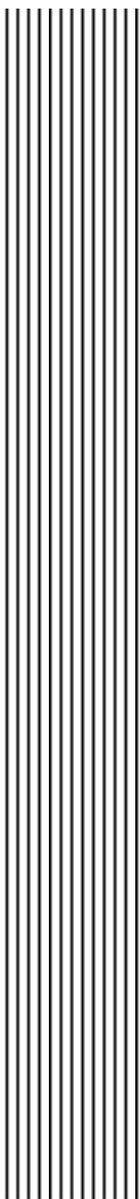
Désignations	page
Remerciements	I
ملخص	II
Abstract	III
Résumé	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	IX
Liste des abréviations	XIII
Table des Matières	XV
Introduction Générale	02
Chapitre I : Généralités sur l'espèce <i>Silybum marianum</i> (L.)	
I.1. Définition de la plante médicinale.	9
I.2. Généralités sur le <i>Silybum marianum</i> (L.).	9
I.2.1. Histoire de la plante.	9
I.2.2. Définition de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	9
I.2.3. Noms communs.	10
I.2.4. Classification botanique.	10
I.2.5. Régions en croissance.	11
I.2.6. Morphologie de la plante <i>Silybum marianum</i> (L.)	12
I.2.7. Localisation et répartition géographique.	17
I.2.9. Composition chimique.	17
Chapitre II : Etude sur les polyphénols	
II.1. Composés phénoliques.	22
II.1.1 Phénol.	22
II .1.2 Polyphénols.	22
II.2. Classification des composés phénoliques.	24
II.2.1 Acides phénoliques.	24
II.2.2 Flavonoïdes.	24
II.2.2.1 Propriétés physico-chimiques.	25
II.2.2.2 Activité antioxydante et antibactérienne.	25

II.2.2.2.1 Activité antioxydante.	25
II.2.2.2.2 Activité antibactérienne.	25
II.2.2.3 Sources.	26
II.2.2.4 Indications.	26
II.2.2.5 Propriétés.	26
II.2.2.6 Flavanols.	28
II.2.2.6.1 Propriétés médicinales.	28
II.2.3 Tanins.	30
II.2.3.1 Tanins hydrolysables.	30
II.2.3.2 Tanins condensés.	30
II.3. Propriétés thérapeutiques des composés phénoliques.	31
II.4. Structures et classifications des composés phénoliques.	31
II.5. Rôle des polyphénols dans les plantes.	32
II.6. Radicaux libres.	33
II.6.1 Rôle des radicaux libres.	33
II.6.1.1 Rôle des radicaux libres chez l'homme.	33
II.6.1.2 Rôle des radicaux libres chez les plantes.	33
II.7. Activité antioxydante.	34
Chapitre III : Matériels et méthodes	
III.1. Matériels et méthodes.	40
III.1.1. Réactifs chimiques et appareillage.	40
III.1.2. Matériels végétaux.	41
III.2. Méthodologie.	41
III.2.1. Préparation des extraits.	41
III.3. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, et Flavanols totaux.	46
III.3.1. Dosage des polyphénols totaux.	46
III.3.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux (PPT).	46
III.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux.	47
III.3.4. Courbe d'étalonnage pour le dosage de flavonoïdes totaux (FVT).	47
III.3.5. Dosage des flavanols totaux.	48
III.3.6. Courbe d'étalonnage pour le dosage de Flavanols totaux (FLT).	48
III.4. Prédiction de la teneur totale en phénols de <i>Silybum marianum</i> (L.) à l'aide de	49

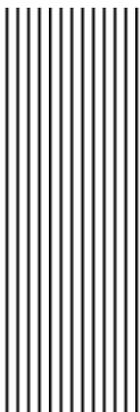
l'outil d'exploration de données Orange.	
III.4.1. Matériaux et méthodes.	50
III.4.2. Détermination de la teneur totale en polyphénols pour ancienne méthode.	50
III.4.3. Description de la nouvelle méthode.	50
III.4.4. Méthodologie.	50
III.4.5. Analyse phytochimique quantitative par nouvelle méthode.	54
III.4.4.1. Essai de vérification de la nouvelle méthode d'analyse phytochimique.	54
III.4.4.2. Méthode de calcul.	55
III.4.4.3. La loi du calcul de la concentration.	55
III.4.5. Teneur totale en polyphénols par une nouvelle méthode.	56
III.4.5.1. Polyphénols totaux dans les feuilles, les branches et les fleurs.	56
III.4.5.2. loi du calcul de la concentration.	56
III.5. Activité antioxydante.	59
III.5.1. Activité antioxydante totale (CAT).	59
III.5.1.1. Méthode de la Capacité antioxydante totale (CAT).	59
III.5.2. Test DPPH.	60
III.5.2.1. Test DPPH pour les fleurs de <i>Silybum marianum</i> (L.).	61
III.5.2.2 Test DPPH pour les branches de <i>Silybum marianum</i> (L.).	63
III.5.2.3 Test DPPH pour les feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.).	65
III.5.2.4. Test DPPH pour les grains de <i>Silybum marianum</i> (L.).	67
III.5.2.5. Courbe d'étalonnage pour Le test DPPH.	69
III.6. Activité antioxydante FRAP.	70
III.6.1 Préparation des solvants de méthode.	70
III.6.2 Mode opératoire.	70
III.6.3 Courbe d'étalonnage pour la méthode d'antioxydante FRAP.	71
III.7. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).	71
III.7.1. Appareillage.	72
III.7.2. Analyse par HPLC des composés phénoliques.	73
III.7.2.1 Chromatogrammes HPLC d'extrait des feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.).	73
III.7.2.2 Chromatogrammes HPLC d'extrait des branches de <i>Silybum marianum</i> (L.).	73
III.7.2.3. Chromatogrammes HPLC d'extrait des Fleurs de la plante <i>Silybum</i>	74

<i>marianum</i> (L.).	
III.7.2.4. Chromatogrammes HPLC d'extrait de grains la plante <i>Silybum marianum</i> (L.).	74
III.8. Spectrophotométrie IR.	75
III.8.1. Principe de la machine IR.	75
III.8.2 Préparation des échantillons.	75
III.8.3. Analyses structurales des échantillons de Plante de <i>Silybum marianum</i> (L.).	75
III.8.3.1. Analyses structurales des échantillons des feuilles de <i>Silybum marianum</i> (L.).	75
III.8.3.2. Analyses structurales des échantillons des branches de <i>Silybum marianum</i> (L.).	76
III.8.3.3. Analyses structurales des échantillons des fleurs de <i>Silybum marianum</i> (L.).	76
III.6.3.4. Analyses structurales des échantillons des grains de <i>Silybum marianum</i> (L.).	77
III.9. Evaluation de l'activité antibactérienne.	77
III.9.1. Méthode de diffusion en milieu gélose (méthode des disques).	77
III.9.2. Provenance des souches.	78
<i>Chapitre IV : Résultats et discussions</i>	
IV.1. Résultats et discussions des PPT, FVT et FLT.	86
IV.1.1 Résultats et discussions des Polyphénols totaux pour les quatre échantillons.	86
IV.1.2 Résultats et discussions des Flavonoïdes totaux pour les quatre échantillons.	87
IV.1.3 Résultats et discussions des Flavanols totaux pour les quatre échantillons.	88
IV.2. Résultats et discussions pour ancienne et nouveau méthode.	89
IV.2.1. Résultats de Test de vérification.	89
IV.2.2. Discussion de Test de vérification.	89
IV.2.3. Analyse phytochimique quantitative en laboratoire pour ancienne méthode.	90
IV.2.4. Analyse phytochimique quantitative en laboratoire pour nouveau méthode.	90
IV.2.5. Discussion de Test de vérification.	91
IV.2.6. Discussion et conclusion de la nouvelle méthode.	91
IV.3. Résultats et discussions de la Capacité antioxydante.	92
IV.3.1. Résultats et discussions de la Capacité antioxydante totale (CAT).	92
IV.3.1.1. Résultats de la Capacité antioxydant totale (CAT).	92
IV.3.1.2. Discussion de la Capacité antioxydant totale (CAT).	93
IV.3.2. Résultats et discussions d'activité antioxydant DPPH.	93
IV.3.2.2. Résultats d'activité antioxydant DPPH.	93

IV.3.2.1. discussion d'activité antioxydant DPPH.	93
IV.3.3. Résultats et discussions d'activités antioxydant FRAP.	93
IV.3.3.1. Résultats d'activités antioxydant FRAP.	94
IV.3.3.2. Discussion d'activités antioxydant FRAP.	94
IV.4. Résultats et discussion de la Profile chromatographique HPLC des extraits.	95
IV.4.1. Résultats et discussion de la Profil chromatographique HPLC des extraits des feuilles.	95
IV.4.2. Résultats et discussion de la Profil chromatographique HPLC des branches.	95
IV.4.3. Résultats et discussion de la Profil chromatographique HPLC des Fleurs.	96
IV.4.4. Résultats et discussion de la Profil chromatographique HPLC des grains.	96
IV.5. Résultats et discussions de la d'analyse structurales pour les échantillons <i>Silybum marianum</i> (L.). Par FT-IR.	97
IV.5.1. Discussion d'analyses structurales pour les feuilles de variétés dès la plante <i>Silybum marianum</i> (L.). Par FT-IR.	97
IV.5.2. Discussion d'analyses structurales pour les branches de la plante par FT-IR.	98
IV.5.3. Discussion d'analyses structurales pour les fleurs de <i>Silybum marianum</i> (L.). Par FT-IR.	99
IV.5.4. Discussion d'analyses structurales pour les grains de <i>Silybum marianum</i> (L.). Par FT-IR.	100
IV.6. Résultats et Discussions d'antibactérienne des quatre échantillons de la plante.	101
IV.6.1. Résultats d'antibactérienne des quatre échantillons de la plante.	101
IV.6.2. Discussion d'antibactérienne des quatre échantillons de la plante.	101
Conclusion générale	105
Annexe	108



Introduction Générale



INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation de plantes médicinales est aussi ancienne que la civilisation humaine [1]. Ainsi, les plantes peuvent être considérées comme des réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées [2]. En effet, la communauté scientifique a réalisé plusieurs travaux scientifiques pour étudier les plantes médicinales pour la recherche et la valorisation de nouvelles molécules, qui représentent les principaux groupes dotés d'une puissante activité antioxydante ou piègeuses de radicaux libres ou autres d'activité afin de fournir solutions au stress oxydatif [3]. Les plantes médicinales sont les ressources naturelles de composés biodynamiques potentiels qui peuvent être utilisés pour le développement de médicaments majoritaires [4]. Si les métabolites secondaires, les flavonoïdes, les phénols et les Flavanol dérivés des plantes médicinales sont utilisés dans le monde entier pour le traitement de plusieurs maladies. Dépendent l'efficacité thérapeutique et de la qualité des plantes médicinales et aromatiques leurs métabolites secondaires, qui à leur tour dépendent des facteurs environnementaux qui l'entourent [5]. Aussi, l'intérêt pour les antioxydants naturels a augmenté ces dernières années, en ce qui concerne leurs propriétés thérapeutiques, de manière significative. La recherche scientifique a été développée dans diverses disciplines scientifiques pour extraire, identifier et mesurer ces composés à partir de nombreux matériaux naturels et produits alimentaires agricoles [6]. Il est considéré comme *Silybum marianum* (L.), plante médicinale, et ses fruits sont utilisés depuis plus de 20 siècles comme traitement pour plusieurs maladies, en particulier les maladies du foie et les voies biliaires. L'extrait de plante médicinale *Silybum marianum* (L.), la silymarine, stimule la régénération du foie et ses constituants agissent comme des agents antioxydants, anti-inflammatoires et hépato protecteurs et sont donc efficaces dans le traitement de l'intoxication aux champignons (*Amanita* sp), de la cirrhose et fibro-sis du foie. De plus, les extraits de fruits du chardon-Marie ont des antiviraux [7]. et des anti tumeurs [8]. les fruits et leurs extraits peuvent être ajoutés à des mélanges d'aliments pour animaux[9, 10]. et peut-être un ingrédient d'aliments fonctionnels[11]. *Silybum marianum* (L.), est une plante médicinale dont l'histoire thérapeutique remonte à 2000 ans et a été utilisée comme médicament hépato protecteur pour traiter la jaunisse et l'hypertrophie du foie et de la rate. À l'origine, *Silybum marianum* (L.), était originaire d'Asie et d'Europe du Sud, mais maintenant il se trouve dans le monde entier [12]. Il est disponible aux États-Unis comme complément alimentaire [13]. La plupart des données documentées sur *Silybum marianum* (L.), concernent les troubles hépatiques ; cependant, il a des propriétés bénéfiques sur une grande variété d'autres troubles tels que l'activité hypoglycémique et la réduction de la résistance à l'insuline chez les patients atteints de diabète de type 2 sucré et ses complications [14, 15]. La culture du *Silybum marianum* (L.), a été largement lancée dans les

années 1980 et n'est recherchée que des facteurs conditionnant le rendement et la qualité de la matière première. En Pologne, la superficie de plantation de cette culture varie de 1500 à 2000 ha et est principalement située dans le partie centrale et septentrionale du pays (plus de 53 ° N de latitude), et donc sous climat et conditions très différentes de l'endroit d'où l'espèce est originaire. Recherche menée en Pologne et dans ses pays voisins a démontré que le Chardon-Marie accumule plus de silymarine pendant les années chaudes et lorsqu'il est exposé à des pluies régulières distributionne en mai et juin et une fertilisation riche en phosphore et azote ainsi qu'une date de récolte retardée augmente le niveau de silymarine dans les fruits [16-21]. Les extraits de cette plante ne provoquent pas d'effets secondaires graves lorsqu'ils sont utilisés comme chimiothérapie à l'exception de légères réactions gastro-intestinales et allergiques [22]. La situation géographique de cette plante se trouve en Europe, il peut également être trouvé aux États-Unis, en Amérique du Nord et du Sud, en Russie du Sud, en Asie Mineure et en Afrique du Nord. Selon Belouahem (2009) [23]. La plante que nous étudions provient de la ferme Bin Hamdah, district de Shakshak, Bini Qasha Wilaya de Oued Souf dans le pays Algérie municipalité, coordonnées du nord-est de l'Algérie (N 34 21 12,9, E 007 10 28,6). Et comme la plupart des études précédentes portaient sur l'étude de la silymarine pour cette plante, nous avons voulu diriger cette étude pour étudier les taux des composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et Flavanols), évaluation de l'antioxydant et de l'activité antimicrobienne pour les quatre échantillons de plante *Silybum marianum* (L.), Cette thèse a été consacrée à l'étude de la plante *Silybum marianum* (L.). Pour étudier cette plante, nous l'avons divisée en quatre parties de feuilles, branches, fleurs et grains. Parmi les critères qui ont conduit à la sélection de cette plante, est l'origine géographique et l'utilisation traditionnelle de cette plante, qui affecte la composition naturelle de la plante.

Notre travail se répartit donc comme suit et après l'introduction :

Dans le premier chapitre :

Etude botanique de la plante *Silybum marianum* (L.). (Classification, description, et utilisation).

Dans le deuxième chapitre :

Etude de la définition, la structure, la classification, et l'activité biologique des polyphénols. Ainsi que l'évaluation des activités antioxydante et l'évaluation des activités antibactériennes.

Dans le troisième chapitre :

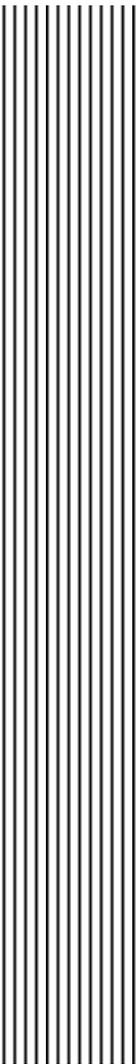
- ✓ Cinétique de séchage de quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).
- ✓ Quantité d'eau et matière sèche pour les quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

- ✓ Les rendements d'extraction des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).
- ✓ Extraction de la matière végétale de la plante par macération dans l'éthanol 70°.
- ✓ Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, et Flavanols totaux.
- ✓ Prédiction de la teneur totale en phénols de *Silybum marianum* (L.) à l'aide de l'outil d'exploration de données Orange.
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante des extraits par trois méthodes, la capacité antioxydante totale et le piégeage du radical libre DPPH et Test FRAP.
- ✓ Analyse des extraits par les méthodes colorimétriques et chromatographie liquide de haute performance (HPLC).
- ✓ Analyses structurales par spectrophotométrie IR des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).
- ✓ Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.). Par méthode de diffusion en milieu gélose (méthode des disques).

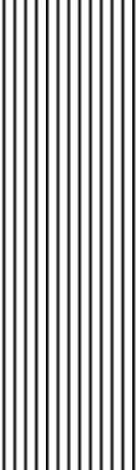
Dans le quatrième chapitre :

Dans cette partie, nous affichons tous les résultats obtenus dans la partie précédente, et nous étudions, analysons et évaluons les résultats.

On termine ce travail par une conclusion générale donnant un récapitulatif sur les principaux résultats obtenus durant ce travail ainsi que les perspectives qui feront les objectifs d'ultérieurs travaux et une liste complète des références bibliographiques pour l'ensemble des chapitres.



Références bibliographiques



- [1] A. A. Salim, Y.-W. Chin, and A. D. Kinghorn, "Drug discovery from plants," in *Bioactive molecules and medicinal plants*: Springer, 2008, pp. 1-24.
- [2] I. Karmakar, N. Dolai, P. Saha, N. Sarkar, A. Bala, and P. K. Haldar, "Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species," *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 221-228, 2011.
- [3] I. B. REBEY *et al.*, "Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeniculum vulgariae* Mill.)."
- [4] D. Belouahem-Abed, F. Belouahem, and G. De Bélair, "Biodiversité floristique et vulnérabilité des aulnaies glutineuses de la Numidie algérienne (NE Algérie)," *European Journal of Scientific Research*, vol. 32, no. 3, pp. 329-361, 2009.
- [5] S. Gairola, N. M. Shariff, A. Bhatt, and C. P. Kala, "Influence of climate change on production of secondary chemicals in high altitude medicinal plants: issues needs immediate attention," *J Med Plants Res*, vol. 4, no. 18, pp. 1825-1829, 2010.
- [6] C. Popovici, I. Saykova, and B. Tylkowski, "Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH," 2010.
- [7] S. J. Polyak *et al.*, "Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin," *Proceedings of the national academy of sciences*, vol. 107, no. 13, pp. 5995-5999, 2010.
- [8] G. Scambia *et al.*, "Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin," *European Journal of Cancer*, vol. 32, no. 5, pp. 877-882, 1996.
- [9] J. Urbańczyk, E. Hanczakowska, and M. J. M. W. Świątkiewicz, "Herb mixture as an antibiotic substitute in pig feeding," vol. 58, no. 11, pp. 887-889, 2002.
- [10] J. Urbanczyk, E. Hanczakowska, and M. J. M. W. Swiatkiewicz, "Mieszanka ziolowa jako zamiennik antybiotyku w paszy dla tucznikow," vol. 58, no. 11, pp. 887-889, 2002.
- [11] M. Hadolin, M. Škerget, Z. e. Knez, and D. J. F. c. Bauman, "High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum*," vol. 74, no. 3, pp. 355-364, 2001.
- [12] R. D. Sewell and M. Rafieian-Kopaei, "The history and ups and downs of herbal medicines usage," *Journal of HerbMed pharmacology*, vol. 3, 2014.
- [13] M. Jakkula *et al.*, "A randomized trial of Chinese herbal medicines for the treatment of symptomatic hepatitis C," *Archives of internal medicine*, vol. 164, no. 12, pp. 1341-1346, 2004.
- [14] C.-H. Wu, S.-M. Huang, and G.-C. Yen, "Silymarin: a novel antioxidant with antiglycation and antiinflammatory properties in vitro and in vivo," *Antioxidants & redox signaling*, vol. 14, no. 3, pp. 353-366, 2011.

- [15] T. Brodniewicz and G. Gryniewicz, "PLANT PHENOLICS AS DRUG LEADS ¿ WHAT IS MISSING?," 2012.
- [16] R. Zalecki and A. J. H. P. Gorna, "Wpływ desykacji preparatem Reglone no plon i jakosc owocow ostropestu plamistego (Silybum marianum Gaertn.)," 1983.
- [17] J. Kozłowski and M. J. H. P. Hołyńska, "Wpływ nawożenia mineralnego w doświadczeniu polowym na plon owoców ostropestu plamistego (Silybum marianum Gaertn.) oraz na zawartość i wydajność silymaryny [Effect of mineral fertilization in a field experiment on the fruit yield of milk thistle (Silybum marianum Gaertn.) and on the content and efficiency of silymarin]," vol. 31, no. 1-2, pp. 51-9, 1985.
- [18] J. Andrzejewska and Z. J. H. P. Skinder, "Yield and quality of raw material of milk thistle [Silybum marianum (L). Gaertn.] grown in monoculture and in crop rotation. Part I. Reaction of milk thistle to the sowing date," vol. 52, no. 4, pp. 11-17, 2006.
- [19] J. Andrzejewska and K. J. A. S. P. A. Sadowska, "Effect of cultivation conditions on the variability and interrelation of yield and raw material quality in milk thistle (Silybum marianum (L.) Gaertn.)," vol. 7, no. 3, 2008.
- [20] M. Habán, P. Otepka, and M. J. H. S. Habánová, "Production and quality of milk thistle (Silybum marianum [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion," vol. 36, no. 2, pp. 69-74, 2009.
- [21] M. Habán, M. Habánová, P. Otepka, and Ľ. J. R. J. o. A. S. Kobida, "Milk thistle (Silybum marianum [l.] gaertn.) cultivated in polyfunctional crop rotation and its evaluation," vol. 42, no. 1, pp. 111-117, 2010.
- [22] R. Saller, R. Meier, and R. Brignoli, "The use of silymarin in the treatment of liver diseases," *Drugs*, vol. 61, no. 14, pp. 2035-2063, 2001.
- [23] K. Gangwar, G. R. Deepali, and R. Gangwar, "Ethnomedicinal plant diversity in Kumaun himalaya of Uttarakhand, India," *Nature and Science*, vol. 8, no. 5, pp. 66-78, 2010.

*Chapitre I : Généralités sur l'espèce
Silybum marianum (L.)*



I.1. Définition de la plante médicinale :

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences simples en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne [1]. En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales [2]. Il existe plusieurs définitions pour désigner une plante médicinale mais, pour faire simple, le terme désigne une plante ou une partie d'une plante possédant des substances appelées principes actifs, pouvant être utilisés à des fins thérapeutiques sans effets nocifs aux doses recommandées [3]. Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (feuilles, branches, fleurs, grains etc.) peut être employée dans le but de se soigner. Elles sont utilisées depuis au moins 7.000 ans avant notre ère par les Hommes et sont à la base de la phytothérapie [4]. On qualifie de plante médicinale toute plante possédant des propriétés agissant sur l'organisme humain ou animal de façon bénéfique. Les plantes médicinales sont utilisées en médecine naturelle. Généralement, seule une partie de la plante est utilisée, que ce soit le bulbe, les branches, les feuilles, les graines, les fruits ou les fleurs. La branche de la médecine qui utilise des plantes médicinales est appelée phytothérapie. Parmi les principes actifs les plus courants des plantes médicinales, on peut nommer les polyphénols, les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes [5, 6].

I.2. Généralités sur le *Silybum marianum* (L.) :

I.2.1. Histoire de la plante :

Silybum marianum (L.), est une plante spontanée découverte depuis plus de vingt siècles et utilisée en médecine alternative et en médecine populaire et traditionnelle en Europe et en Asie[7]. Elle se distingue par sa résistance aux diverses tentatives de pâturage grâce à la distribution de ses graines et sa propagation dans l'air avec le vent[8, 9].

I.2.2. Définition de la plante *Silybum marianum* (L.) :

Silybum marianum (L.) est de la famille des Asteriaceae et porte divers autres noms, notamment le Chardon-Marie, le Chardon Marial, le Chardon de Sainte-Marie, le Chardon de lait béni, le Chardon de lait méditerranée, le Chardon panaché, *Cardus Marianus* et le Chardon

écossais. *Silybum marianum* a un vert pâle brillant, feuilles et fleurs rouges à violettes à nervures blanches. Dans les pays perses et arabes, on l'appelle Mary Thiqhal [10]. *Silybum marianum* (L.), est une plante bisannuelle, glabre, vert pâle, spinescente à tiges droites. Les feuilles de cette plante sont grandes et ont des taches blanches autour des nervures. Il a plusieurs parties pennées en tant que parties triangulaires-ovaires. *Silybum marianum* (L.), a des branches simples ou peu ramifiées ou relativement épaisses qui se terminent par une masse verte et avec des râteaux longitudinaux. Il pousse jusqu'à 200 cm de hauteur, avec la tige de coton, ayant une forme globale conique. Ses feuilles sont oblongues à lancéolées et la tige est généralement creuse. *Silybum marianum* (L.), est lobé ou penné, avec des bords épineux et glabre, vert brillant, avec des veines blanc laiteux. Les capitules de cette plante mesurent jusqu'à 12 cm de long et de large, avec une couleur rouge-violet Figure I-1 [10].

I.2.3. Noms communs :

Chardon-Marie, Chardon argenté ou marbré, Chardon de Notre Dame, Artichaut sauvage, Silybe de Marie[11].

Nom botanique : *Silybum marianum* (L.).

Nom anglais : Milk thistle ; Blessed Milkthistle.

Nom arabe et tunisien : Bôq.

Nom chinois : Shui Fei Ji.

Nom allemand : Mariendistel.

Nom italien : Cardo mariano ou Santa Maria[8, 9].

I.2.4. Classification botanique

Le tableau I.1 Classification du *Silybum marianum* (L.) selon Lignée[8, 9].

Phylum	Phanérogames
Sous-phylum	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Astrales
Famille	Asteraceae (Composées)
Sous-famille	Tubuliflores
Genre	<i>Silybum</i>
Espèces	<i>Silybum marianum</i> (L). Gaerthn ,1791

La famille des Astéracées est caractérisée par deux caractères principaux :

- ✓ Des anthères soudées entre elles par leurs bords latéraux
- ✓ Des fleurs groupées en capitule entouré d'un involucre formé par des bractées. La famille des Plantes Asteraceae se distingue par le fait qu'elle est en grande partie comestible car elle contient des ingrédients aromatiques actifs ou des extraits largement utilisés en médecine[8, 9].

I.2.5. Régions en croissance : La plante que nous étudions provient de la ferme Bin Hamdah, district de Shakshak, Bini Qasha Wilaya de Oued Souf dans le pays Algérie municipalité, coordonnées du nord-est de l'Algérie (N 34 21 12,9, E 007 10 28,6) Figure I-1.



Figure I-1. Photo de la plante *Silybum marianum* (L.) (Dans la zone de Bin Qasha El-Oued).



Figure I-2. Chemin suivie de l'emplacement de la *Silybum marianum* (L.) (Dans la zone de Bin Qasha El-Oued).

Les différents organes (feuilles, branches, fleurs, graines) de la plante de *Silybum marianum* (L.) ainsi que leurs parties sont schématisés les Figures suivantes :



Figure I-3. Photo des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.)

I.2.6. Morphologie de la plante *Silybum marianum* (L.)

Les **Feuilles** sont de couleur vert vif et sont généralement tachetées de blanc le long des nervures est bordées sur les côtés d'épines jaunes très fortes. Les feuilles moyennes et inférieures sont allongées, aiguës et embrassent largement la tige par leur base. Les feuilles inférieures ont un pétiole, elles sont relativement très grandes, à limbe profondément divisé en segments élargis[12, 13].



Figure I-4. Image en gros plan de la feuille plante *Silybum marianum* (L.) Dans la zone de Bin Qasha El-Oued.



Figure I-5. Image en gros plan de la feuille plante *Silybum marianum* (L.) Dans la zone de Bin Qasha El-Oued.

Les Branches sont d'hauteur plus d'un mètre, c'est une tige cannelée, dressée et rameuse[12, 13].



Figure I-6. Image en gros plan des branches plante *Silybum marianum* (L.).

Les Fleurs sont de couleurs violets. Les fleurs sont à 5 étamines qui forment un tube autour du style. Elles fleurissent depuis le mois de fin mars jusqu'au mois d'avril en Afrique de nord.



Figure I-7. Vue à distance de la fleur plante *Silybum marianum* (L.) Dans la zone de Bin Qasha El-Oued.



Figure I-8. Image en gros plan de la fleur plante *Silybum marianum* (L.) Dans la zone de Bin Qasha El-Oued.

Les fruits sont de couleur brun clair, luisant, légèrement aplatis, Elles sont lisses ou finement ridées, couronnées avec les touffes plumeuses ; chacune d'elles est insérée sur une sorte de disque (formé par le pédoncule très réduit), d'apparence cornée et portant au centre une sorte de cylindre court qui présente à son sommet 3 à 5 petits mamelons[14].



Figure I-9. Image en gros plan des grains plante *Silybum marianum* (L.).

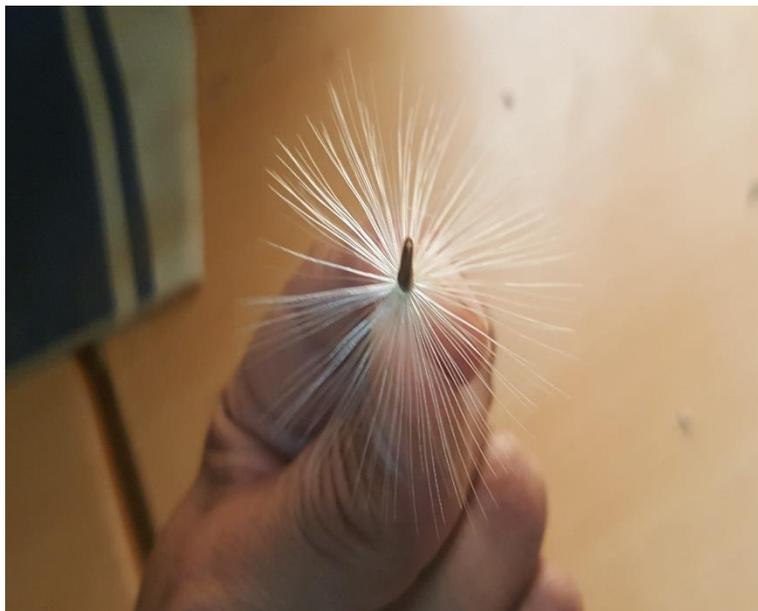


Figure I-10. Image en gros plan de grain plante *Silybum marianum* (L.)



Figure I-11. Schéma de la fleur de la plante *Silybum marianum* (L.)



Figure I-12. Schéma de la plante *Silybum marianum* (L.)

I.2.7. Localisation et répartition géographique :

La plante *Silybum marianum* (L.) pousse généralement dans des sols secs, ensoleillés, acides[15].

I.2.8. Cycle de vie :

Le *Silybum marianum* (L.) est une plante annuelle. La germination est au début de la saison de croissance. Elle change et devient une plante bisannuelle[11]. 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 190 graines soit environ 6350 graines pour une seule plante[16].

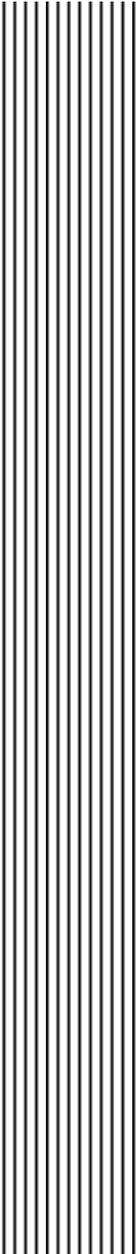
Quatre-vingt-quinze pour cent (95%) de ces graines qui ne passent par aucune phase de dormance, seront capables de germer au cours du cycle suivant et peuvent rester viables pendant neuf ans[17, 18]. La floraison débute dès le mois de mars jusqu'au mois fin d'avril. La pollinisation est autogame (par autofécondation) ou encore entomogame (la fécondation se fait par divers moyens : les insectes, le vent, etc). Le *Silybum marianum* (L.) est une espèce hermaphrodite (ayant des organes reproducteurs des deux sexes mâle et femelle)[11, 19].

I.2.9. Composition chimique :

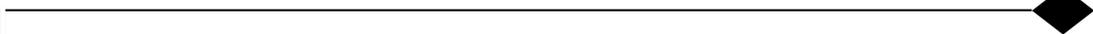
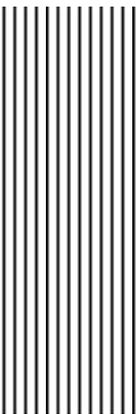
La plante *Silybum marianum* (L.) est très riche en composés actifs, en raison de la présence par un taux élevé de silymarine (qui peut être extraite séparément ou séparé des différents composés de l'huile) d'où l'intérêt porté à cette partie de la plante[20].

Les graines de la plante *Silybum marianum* (L.) contient en fait 4 à 6 % de silymarine[21]. dont 70-80% de flavonolignanes et 20-30% de composés polyphénoliques oxydés non identifiés[22]. Cette graine contient aussi des lipides à 30-20 %, des protéines à 25-30 % et des minéraux dont les teneurs varient selon l'organe étudié[21, 23].

Les organes du végétal (feuilles, graines, branches, roses) de la plante *Silybum marianum* (L.) présente des teneurs élevées en calcium ce qui donne à cette plante une valeur alimentaire très importante. Le phosphore reste le minéral qui distingue les graines de Chardon Marie avec une teneur de 0,6 g.kg-1MS (matière sèche) plus élevée que celle des feuilles et de la tige (respectivement 0,2 et 0,15 g.kg-1MS). Les feuilles se distinguent par des teneurs importantes en sodium, en magnésium et en calcium alors que la tige est riche en potassium[21, 24].

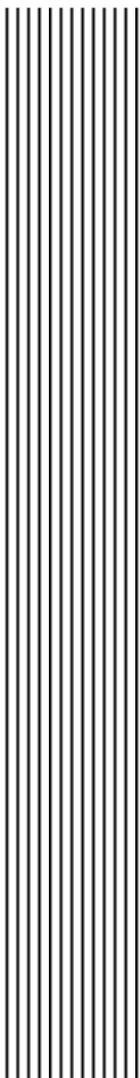


Références bibliographiques

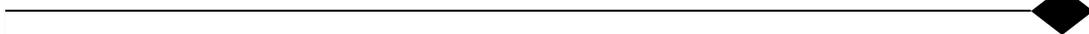
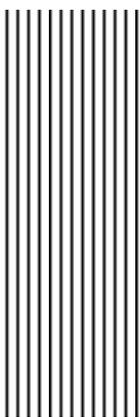


- [1] J. Laird, S. Lew, M. DeBell, and C. Chapman, "Dropout Rates in the United States: 2002 and 2003. ED TAB. NCES 2006-062," *National Center for Education Statistics*, 2006.
- [2] A. Quyou, "Mise au point d'une base de données sur les plantes médicinales. Exemple d'utilisation pratique de cette base," Thèse de Doct. Univ. Ibn Tofail. Fac. Sci. Kénitra, Maroc, 2003.
- [3] R. BETTAHAR, "Extraction des huiles essentielles Analyse par FT-IR et UV-Visible," 2015.
- [4] نوار, نورة, يومبيعي, and درة, "Effet de l'activité antioxydante de plante médicinale cactus les deux espèces: *Opuntia ficus-indica* L et *Aloe vera*," 2019.
- [5] H. H. A. de Santé and O. DT21, "Version 10 de juin 2015 validée par le bureau et le CA Rédaction: B. BRANGER, B. BAILLEUX et le bureau de la FFRSP-Textes de références• Arrêté du 23 juin 2009 fixant les règles de bonnes pratiques [1](voir annexe)• Arrêté du 23 juin 2009 relatif à l'information de la femme enceinte [2]."
- [6] L. Techer, "Étude des addictions et des principales pathologies psychiatriques chez les femmes incarcérées à l'île de La Réunion en 2015: utilisation de l'ASI et du MINI."
- [7] P. Morazzoni, A. Montalbetti, S. Malandrino, G. J. E. j. o. d. m. Pifferi, and pharmacokinetics, "Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats," vol. 18, no. 3, pp. 289-297, 1993.
- [8] G. Bonnier, R. Douin, and J. Poinot, [*La grande flore en couleurs*]; *La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier: France, Suisse, Belgique et pays voisins*. Belin, 1990.
- [9] G. Bonnier, "La grande flore en couleur. Édition Belin," tomes 1-2-3-4, Paris, France. 1: 4011990.
- [10] V. ŠIManek, V. Kren, J. Ulrichová, J. Vicar, and L. Cvak, "Silymarin: what is in the name...? An appeal for a change of editorial policy," *Hepatology*, vol. 32, no. 2, pp. 442-444, 2000.
- [11] N. B. Rahal, "Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de *Silybum marianum*. Étude de leurs activités antioxydante et antitumorale," 2012.
- [12] P. Morazzoni and E. J. F. Bombardelli, "*Silybum marianum* (*Cardus marianus*)," vol. 66, no. 1, pp. 3-42, 1995.
- [13] P. Morazzoni and E. J. F. Bombardelli, "*Silybum marianum* (fitoterapia)," vol. 66, pp. 3-42, 1995.

- [14] T. N. Graf, M. C. Wani, R. Agarwal, D. J. Kroll, and N. H. J. P. m. Oberlies, "Gram-scale purification of flavonolignan diastereoisomers from *Silybum marianum* (Milk Thistle) extract in support of preclinical in vivo studies for prostate cancer chemoprevention," vol. 73, no. 14, p. 1495, 2007.
- [15] R. Martin *et al.*, "Factors influencing silymarin content and composition in variegated thistle (*Silybum marianum*)," vol. 34, no. 3, pp. 239-245, 2006.
- [16] G. Burnie, "Encyclopédie de botanique et de l'horticulture. Plus de 10.000 plantes du monde entier. Ed," ed: Random house Australia ptyltd, 1997.
- [17] B. J. W. R. Sindel, "A review of the ecology and control of thistles in Australia," vol. 31, no. 4, pp. 189-201, 1991.
- [18] B. Sindel, "The persistence and management of thistles in Australian pastures," in *Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference*, 1997, vol. 50, pp. 453-456.
- [19] G.-G. Guitonneau and A. Huon, *Connaitre et reconnaitre la flore et la végétation méditerranées*. Ouest France, 1983.
- [20] A. Karkanis, D. Bilalis, A. J. I. C. Efthimiadou, and Products, "Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed," vol. 34, no. 1, pp. 825-830, 2011.
- [21] F. Bessam and Z. J. A. E. B. Mehdadi, "Evaluation of the Antibacterial and Antifongical Activity of different extract of Flavonoïques *Silybum marianum* L," vol. 8, pp. 1-9, 2014.
- [22] A. Svobodová, D. Walterová, and J. J. B. Psotová, "Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts," vol. 32, no. 8, pp. 973-979, 2006.
- [23] F. Meschy and L. Guéguen, "Ingestion et absorption des éléments minéraux majeurs," in *Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion*, 1995, pp. 721-758: Institut National de la Recherche Agronomique.
- [24] K. LEHADI, "Recherches sur la gestion de la reproduction dans quelques élevages bovins laitiers dans la région de M'sila," UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA, 2019.



Chapitre II :
Etude sur les polyphénols



II.1. Composés phénoliques :

II.1.1 Phénol :

En chimie organique, les polyphénols ou les composés phénoliques sont des composés chimiques aromatiques portant une fonction hydroxyle –OH (Figure II-9). Les dérivés portant plusieurs fonctions hydroxyles sont appelés des polyphénols.

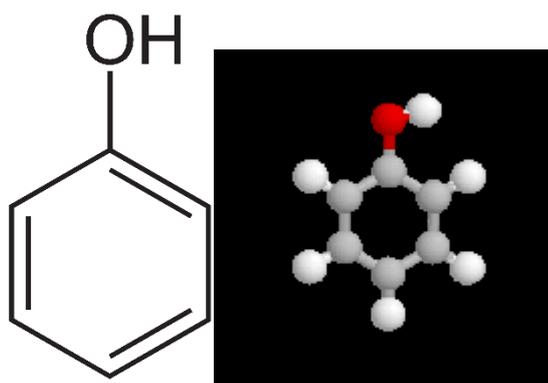


Figure II-01. Structure du noyau phénol.

II .1.2 Polyphénols :

Le terme polyphénol ou composés phénoliques remplace l'ancien terme du tanin végétal. Présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles polyphénols (Figure II-10) habituellement utilisés pour l'ensemble de ces composés.

Polyphénols des plantes sont les plus actifs antioxydants. Maladies chroniques et dégénératives : Athérosclérose, maladies vasculaires, diabète, cancer, Alzheimer, Parkinson [1]. Les composés phénoliques (8000 molécules connues) sont une des principales classes de métabolites secondaires des plantes. Leurs structures et fonctions sont très diverses. Ils possèdent, au minimum, un cycle aromatique portant un à plusieurs groupes hydroxyles. Les acides phénoliques (acide gallique) représentent les formes les plus simples et les tanins, les formes les plus polymérisées de plus de 30000 Dalton. Les principaux polyphénols présents dans les fruits sont les acides-phénols (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique), les stilbénoides et les flavonoïdes, dont les tanins condensés [2].

Le terme « polyphénol » a été introduit en 1980 [3]. En remplacement de l'ancien terme de « tanin végétal ». L'expression « **composés phénoliques** » est aussi employée avec la même valeur.

Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [4, 5]. La désignation « polyphénols » est consacrée par l'usage

et, alors qu'elle ne devrait concerner que les molécules portant plusieurs fonctions hydroxyles phénoliques, elle est habituellement utilisée pour l'ensemble de ces composés.

Le terme « biophénol » fut inventé par Romeo et Uccella en 1996 [6]. Pour désigner les phénols bioactifs dans les olives en remplacement du terme « polyphénol » plus commun mais plus vague d'un point de vue chimique. Utilisé au départ uniquement dans la chimie des olives, le terme a gagné en popularité et est actuellement utilisé par les chercheurs faisant référence aux phénols végétaux en général.

Il s'ajoute à cette définition le fait qu'ils possèdent un pouvoir antioxydant élevé.

Les polyphénols se divisent en plusieurs familles dont les plus populaires sont les **tanins** et les **flavonoïdes**. Ces derniers se divisent en quatre catégories principales :

- les flavanols
- les flavones
- les anthocyanines

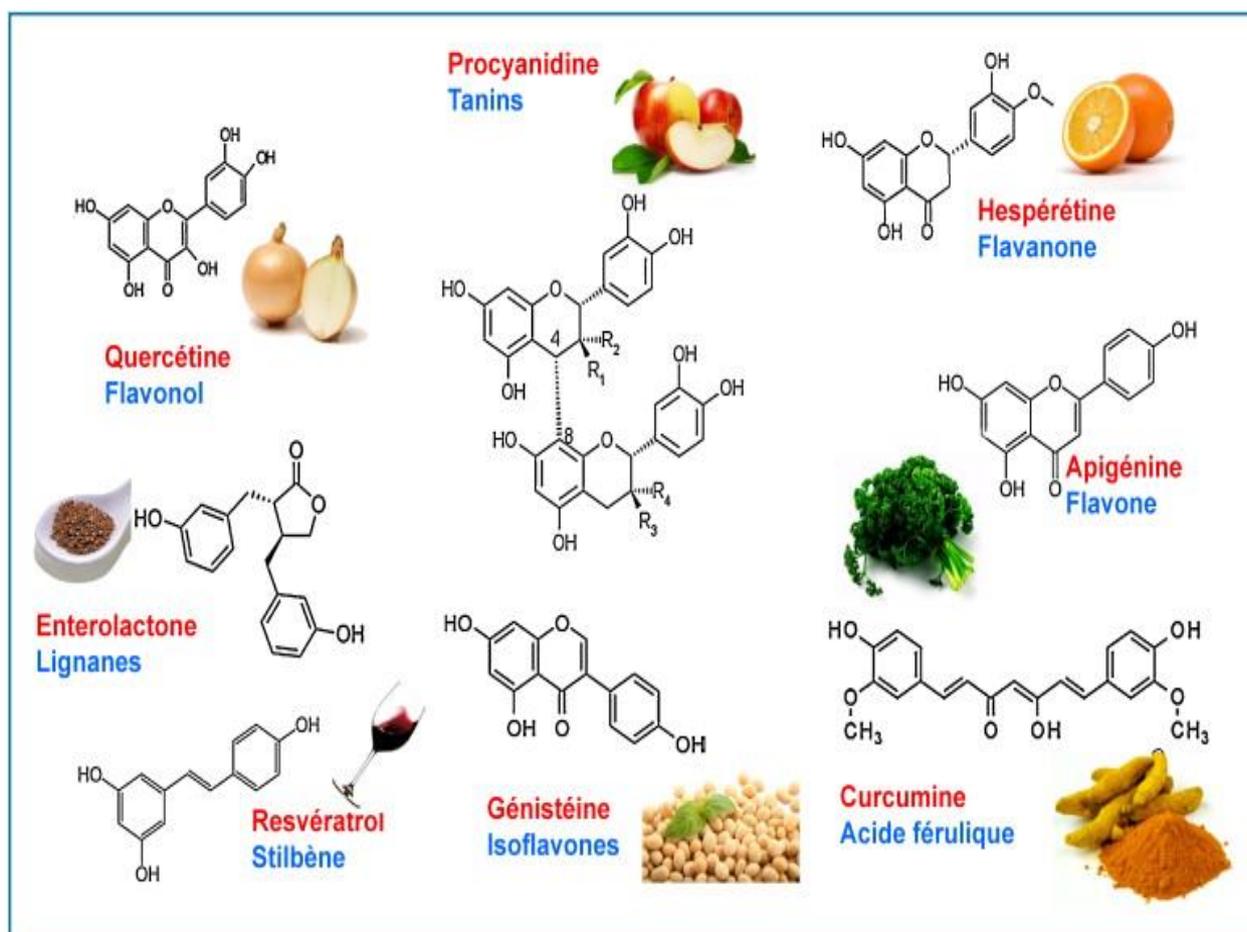


Figure II-02. Structure des polyphénols.

II.2. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols naturels regroupent donc un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants [7]. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques[8]. (Acide gallique), à des composés hautement polymérisés, de plus de trente mille daltons, comme les tanins (acide tannique).

Les polyphénols sont communément subdivisés en phénols simples, acides phénoliques et coumarines, en naphthoquinones, en stilbénoides (deux cycles en C₆ liés par deux atomes de carbone), en flavonoïdes, isoflavonoïdes et anthocyanes, et en formes polymérisées : lignanes, lignines, tanins condensés. Ces squelettes carbonés de base sont issus du métabolisme secondaire des plantes, élaborés par la voie du shikimate [9].

Deux principales classes sont largement répandues [10].

- Les acides phénoliques (acides hydroxy benzoïques, acides hydroxy cinnamiques),
- Les flavonoïdes.
- Les tanins et lignines

Plus rares, les coumarines, les stilbènes ne seront pas décrit en détail ici.

II.2.1 Acides phénoliques

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués :

- Les acides hydroxy benzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique,
- Les acides hydroxy cinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique.

II.2.2 Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes n'ont pris leur essor dans la pharmacopée occidentale que depuis quelques années, même si leur biodisponibilité n'est pas encore complètement élucidée. Ils ont été isolés par le scientifique Eugène Chevreul en 1814, mais n'ont été réellement découverts qu'en 1937, par **Albert Szent-Györgyi**, qui a mis en exergue leur influence pour réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ce scientifique hongrois a reçu le prix Nobel pour ses recherches sur la vitamine "C" et les propriétés biochimiques des flavonoïdes. (Figure II-11).

Le terme "flavonoïdes" proviendrait de "flavedo", qui désigne la couche externe des écorces d'oranges. On appelle flavonoïdes des **composés polyphénoliques** présents dans de nombreux organismes (végétaux, fruits et légumes), que ce soit au niveau de leurs feuilles, de

leurs tiges, de leurs fleurs, de leurs fruits ou du pollen. Il s'agit de pigments colorés qui confèrent à ces organismes la large palette de couleurs qu'ils empruntent. Ils les protègent principalement de l'oxydation et des rayons solaires agressifs. Les flavonoïdes participent également à donner du goût aux fruits et aux légumes. On en compte près de 4 000 variétés regroupées en quatre groupes : la **quercétine** (oignon, brocoli...), les **flavonones** (citron), les **catéchines** (thé, vin rouge) et les **anthocyanines** (fruits rouges, raisin...).

Les flavonoïdes ont été prioritairement mis en évidence par le vin rouge, avec le célèbre "french paradox", c'est-à-dire la faible mortalité notoire chez les habitants des régions méditerranéennes, dont le régime alimentaire serait essentiellement basé sur une consommation de vin rouge et de graisses saturées. (Figure II-12).

II.2.2.1 Propriétés physico-chimiques :

Les hétérosides de flavonoïdes sont en général solubles dans l'eau et les alcools. Les génines sont pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires. L'extraction par macération est réalisée habituellement à l'aide du méthanol ou éthanol ou de mélanges méthanol-eau ou de éthanol-eau parfois d'acétonitrile-eau.

II.2.2.2 Activité antioxydante et antibactérienne :

II.2.2.2.1 Activité antioxydante :

Les flavonoïdes agissent principalement comme antioxydants primaires, en stabilisant les radicaux peroxydes mais ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives (ion super oxyde, radical OH^{*}, oxygène singlet), inhiber la li-oxygenate ou encore chélater les métaux[4, 5].

La limitation principale de cette activité antioxydante est la faible biodisponibilité des flavonoïdes après ingestion d'aliments riches dans ces composés. La faible quantité absorbée entre en concurrence avec les autres piègeurs de radicaux libres (α -tocophérol, ascorbates et glutathione) présents dans des concentrations très supérieures [11].

Exception faite du tractus gastro-intestinal et peut-être du sang, l'action potentielle des polyphénols comme piègeurs de radicaux libres n'a probablement aucune signification physiologique dans la plupart des organes [12].

II.2.2.2.2 Activité antibactérienne :

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes [13]. Des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules. Des études "in vivo" sur animaux se sont révélées encourageantes (quercétine chez le cochon d'inde infectés par *Shigella*,

sophoraisoflavone en injection intrapéritoneale chez des souris infectées par *Salmonella thyphimurium*).

De nombreux ptéocarpanes sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram + [14]. Pour ces composés, il semble que la présence de deux groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité antibactérienne [14].

II.2.2.3 Sources :

Les agrumes, les oignons, la vigne rouge, les pommes, les fruits rouges, l'hamamélis, le gingko, le noisetier, les fines herbes, l'ortie, le poireau... représentent les fruits, légumes ou plantes qui renferment le plus de flavonoïdes. On en trouve également dans le café, le thé, le vin, la bière ou le chocolat (le cacao). Il semble préférable de manger (autant que possible) les fruits et légumes crus, afin de conserver tout le bénéfice des flavonoïdes.

II.2.2.4 Indications :

Les flavonoïdes sont essentiellement préconisés pour leur action antioxydante. Ils contribuent à protéger l'organisme des méfaits liés à la pollution, à l'ingestion de substances toxiques (alcool, tabac...) ou encore à l'exposition au soleil, méfaits responsables du vieillissement cellulaire et de la sénescence.

On trouve les radicaux libres dans l'organisme. Pour l'éviter ou les réagir avec des autres produits.

II.2.2.5 Propriétés :

Les flavonoïdes sont essentiellement connus par ses activités antioxydantes. Ils participent à combattre les radicaux libres, ces molécules issues de l'oxygène et de l'azote, mises en cause dans de nombreux processus dégénératifs, accélérant le vieillissement des tissus et cellules. Le stress oxydatif occasionné par ces radicaux libres semble fragiliser la bonne santé de l'organisme. Les défenses naturelles servent à limiter leur effet, mais, parfois, l'organisme ne peut pas se défendre seul, notamment chez les personnes âgées, et nécessite de trouver de nouvelles armes à travers l'alimentation.

Il semble aujourd'hui indispensable pour le bien-être de l'organisme d'avoir une alimentation variée et de manger au moins cinq fruits et légumes par jour. Les sources d'antioxydants naturels se trouvent principalement dans les fruits et légumes colorés, et dans certaines céréales. Selon certaines études, leur action dans la lutte contre les radicaux libres serait même plus efficace que celle des vitamines "C" et "E". En tout cas, ils améliorent l'action de ces vitamines sur l'organisme en augmentant leur absorption et en retardant leur élimination.

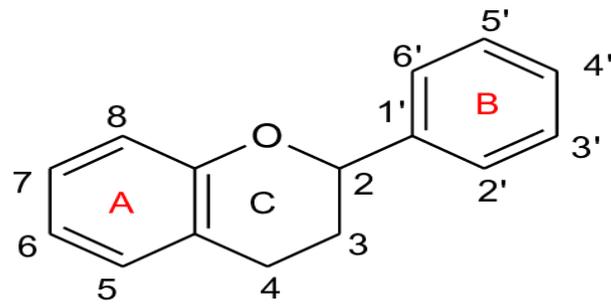


Figure II-03. Structure de base des flavonoïdes

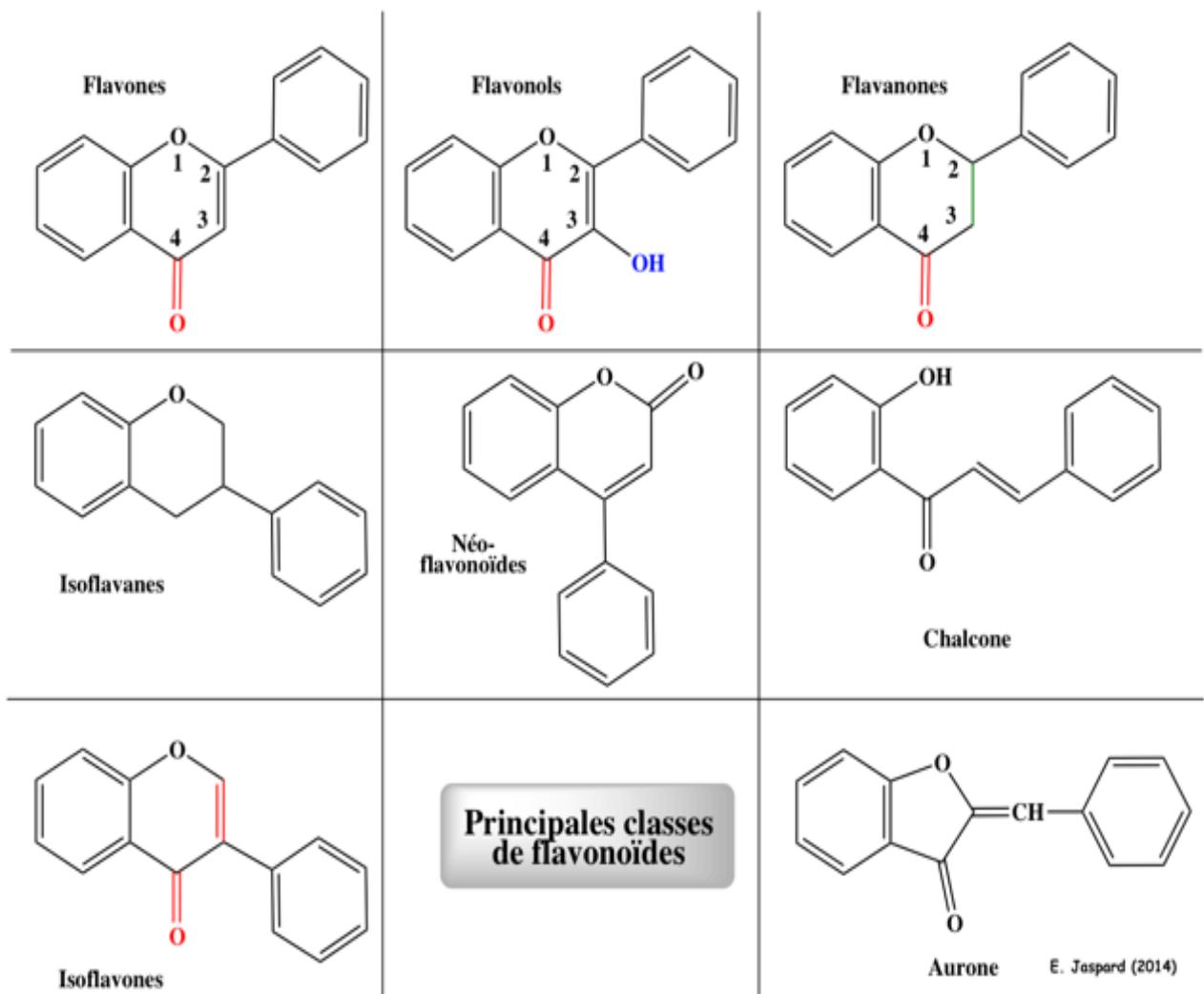


Figure II-04. Structures de base des principaux Flavonoïdes.

II.2.2.6 Flavanols :

Les Flavanols totaux sont des composés qui appartiennent à la famille de Flavonoïdes qui sont largement répandus (Figure II-13) les flavonols tels que la myricétine, la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol sont la plupart du temps présents sous forme d'O-glycosides. La conjugaison est le plus souvent en position 3 du noyau aromatique "C", bien que des substitutions en positions 5, 7, 4, 3 et 5 soient possibles. Le nombre d'aglycones est assez faible, mais il existe un très grand nombre de conjugués, le kaempférol ayant à lui seul 200 conjugués avec des motifs osidiques différents. Il existe une forte variabilité en concentration selon la saison et la variété prise en compte [15]. Leur structure est plane. Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin: le kaempférol, la quercétine (5-10 mg/kg), la myricétine et l'isorhamnétine. Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. La teneur moyenne maximale en flavanols du raisin est de l'ordre de 50 mg/kg mais peut varier entre 10 et 285 mg/kg.

II.2.2.6.1 Propriétés médicinales

Les flavanols sont de bons antioxydants et anti-inflammatoires.

Les diverses méthodes de mesure du pouvoir antioxydant des composés phénoliques donnent des résultats très différents [16]. La moyenne pondérée des résultats obtenus par quatre méthodes différentes donne le classement suivant des Flavanols :

Myricétol-3-rhamnoside > Myricétol > Quercétol, Rutoside > Kaempférol-3-glucoside > Kaempférol.

Une étude de 8 ans portant sur un échantillon de plus de 180 000 personnes a montré qu'une prise alimentaire de flavonols (quercétol, kaempférol et myricétol) était associée à un risque réduit du cancer du pancréas [17].

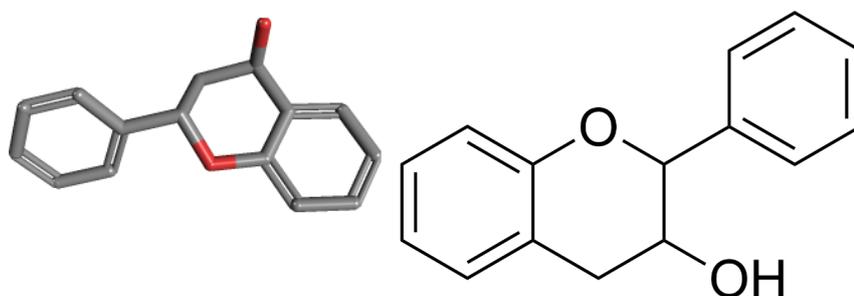
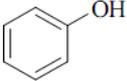
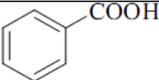
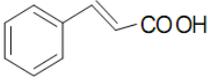
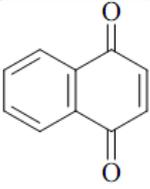
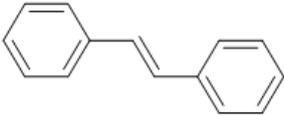
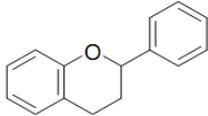


Figure II-05. Structure de base des flavanols.

Tableau II-1. Principales classes de composés phénoliques [18].

Squelette carboné	Classes	Exemples	Origines	Structures de base
C6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces	
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïques	Epices, fraise	
C6-C3	Acides Hydroxycinnamiques, Phenylpropènes, Coumarines, Isocoumarines, Chromones	Acide caféique, acide Férulique, Myristicin, eugénol, Scopolétine, Myristicine, eugénol, Eugenine	Pomme de terre, Pomme, citrus	
C6-C4	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine	Noix	
C6-C1-C6	Xanthonés	Mangiferine		
C6-C2-C6	Stilbènes Anthraquinones	Resvératrol, Anthraquinones	Vigne	
C6-C3-C6	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, Daidzéine	Fruits, légumes,	
(C6-C3)2	Lignanes Neolignanes	Daidzéine, Pinorésinol	Pin	
(C6-C3-C6)2	Biflavonoïdes	Amentoflavone		
(C6-C3) <i>n</i>	Lignines		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki	
(C6-C3-C6) <i>n</i>	Tanins condensés			

II.2.3 Tanins

Le terme tanin dérivé de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux. On distingue : les tanins hydrolysables et condensés. (Figure II-14).

II.2.3.1 Tanins hydrolysables

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique [19]. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude [20-22].

II.2.3.2 Tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevées. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons "C₄-C₈" (parfois "C₄-C₆") des unités adjacentes, et se nomment ainsi pro-anthocyanidines de type "B". Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison "C₄-C₈" et par une liaison d'éther additionnelle entre "C₂" et "C₇", les proanthocyanidines sont dits de types "A". Ci-dessus est représenté le modèle de structure d'un tanin de type "B" [23].

Si R = H ou OH, la structure représente respectivement un procyanidine ou un prodelphinidine. La liaison "4-6" en pointillés est une alternative de liaison interflavanique. On note la présence d'unité terminale dans une telle structure [24, 25].

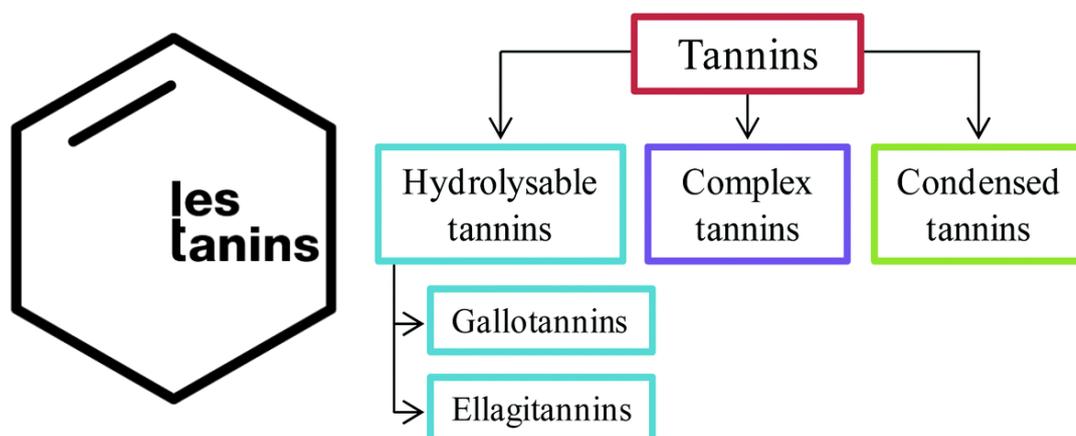


Figure II-06. Classification de tanins et leurs structures chimiques.

II.3. Propriétés thérapeutiques des composés phénoliques

Les polyphénols semblent jouer un rôle important à la fois dans la protection contre le cancer et les maladies cardio-vasculaires [26]. L'action protectrice contre le cancer s'expliquerait par un mécanisme assez semblable à celui des prébiotiques par leur capacité à sélectionner un type particulier de micro biote [27]. En particulier pour les cancers du système digestif (estomac, côlon, etc.).

II.4. Structures et classifications des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, celles de l'acide shikimique conduisant après trans-amination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs dérivés et celles de l'acétate conduisant aux poly-cétoesters ou polyacétates (malonate). La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre et l'arrangement des atomes de carbone les composant, en fonction de la nature de leur squelette carboné et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique [28].

Les composés phénoliques sont capables de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques : de ce fait, on peut les retrouver très souvent présents sous ces formes. Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les Flavonoïdes et les non-flavonoïdes. (Figure II-15).

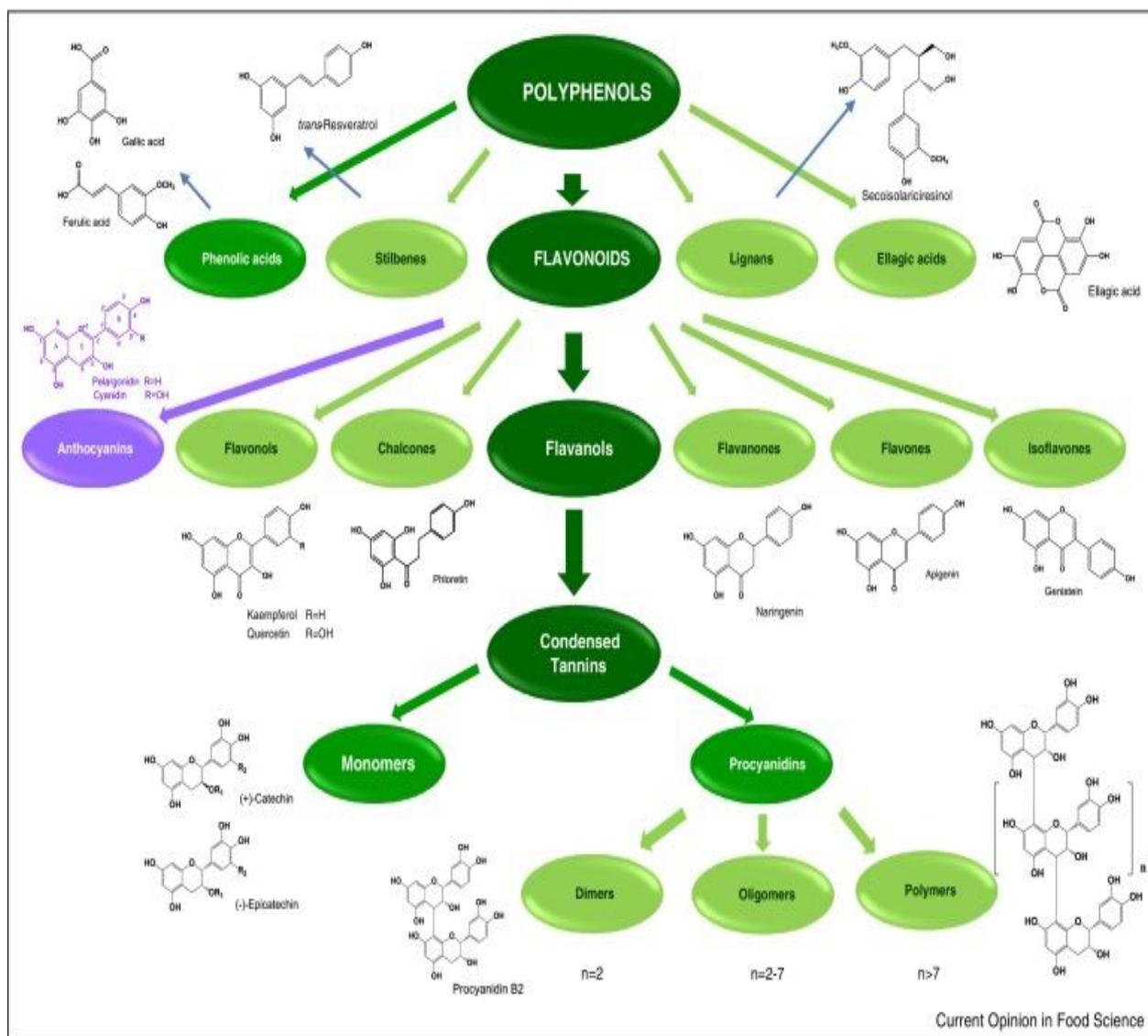


Figure II-07. Structures et classifications des composés phénoliques.

II.5. Rôle des polyphénols dans les plantes

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne. Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance de micro-organismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme [29].

II.6. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O₂) présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre (Figure II-16). En raison de ses deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales de plus grande énergie.

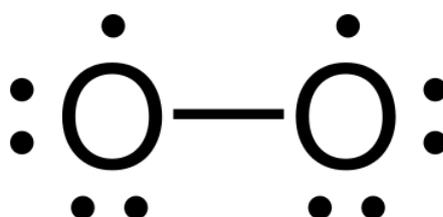


Figure II-08. Molécule biradical libre de dioxygène.

II.6.1 Rôle des radicaux libres

II.6.1.1 Rôle des radicaux libres chez l'homme

De nombreux ligands extracellulaires sont capables d'induire la production cellulaire d'ERO, après interaction avec leur récepteur spécifique. Ces ERO contribuent donc à la transduction du signal, mais assurent également l'amplification de ce signal. Par exemple, cela va se traduire par l'activation de la NAD (P) H oxydase qui formera l'anion superoxyde, et contribuera à l'activation de phosphorylases, dont les cibles sont des protéines.

En résumé, les mécanismes d'action principaux des ERO sont alors de déclencher ou d'amplifier un signal intracellulaire par deux mécanismes principaux (par modification de l'équilibre redox intracellulaire et par modification oxydative des protéines).

Les ERO sont également à l'origine de l'action bactéricide par les leucocytes [30].

II.6.1.2 Rôle des radicaux libres chez les plantes

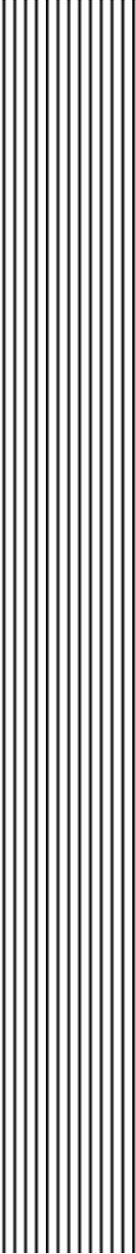
Les ERO sont continuellement produites chez les plantes selon le métabolisme aérobie. En fonction de leur nature, certaines, très toxiques, sont rapidement détoxifiées par divers mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques.

Alors que les végétaux génèrent pléthore de processus pour combattre la croissance des ERO produites dans les conditions de stress abiotique (chocs thermiques, irradiation excessive, couche d'ozone, sécheresse, salinité...), dans d'autres circonstances, ils peuvent tout aussi engendrer délibérément des ERO au titre de molécules signal afin de contrôler de nombreux

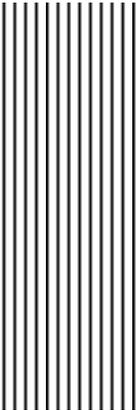
phénomènes comme la défense contre des pathogènes (stress biotique), la mort cellulaire programmée (apoptose) et le comportement stomatique [31].

II.7. Activité antioxydante :

Les antioxydants sont des molécules qui contribuent à la protection de notre corps contre des substances potentiellement dangereuses que l'on appelle radicaux libres. Le thé en est une source très importante notamment de flavonoïdes dont le rôle est la neutralisation des radicaux libre [18, 32-34]



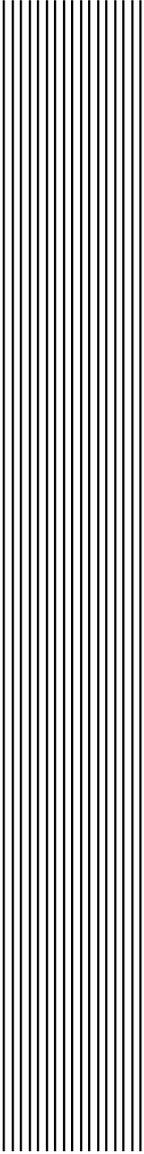
Références bibliographiques



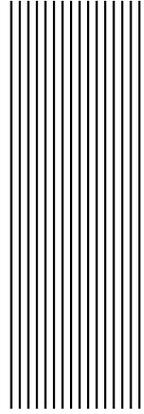
- [1] Y. El Rayess, R. Barbar, E. A. Wilson, and J. Bouajila, "Analytical Methods for Wine Polyphenols Analysis and for Their Antioxidant Activity Evaluation," ed: Nova Science Publishers: New York, NY, USA, 2014, pp. 71-101.
- [2] E. Mehinagic, E. Bourles, and F. Jourjon, "Composés des fruits d'intérêt nutritionnel: impact des procédés de transformation sur les polyphénols," *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture et Horticulture*, vol. 43, p. 364, 2011.
- [3] P.-L. Teissedre and C. Chervin, "9 Grape," *Health-Promoting Properties of Fruits and Vegetables*, p. 154, 2011.
- [4] V. Cheynier and P. Sarni-Manchado, "Les polyphénols en agroalimentaire," *Paris: Lavoisier Tec & Doc*, pp. 50-59, 2006.
- [5] P. Sarni-Manchad and V. Cheynier, "Les polyphénols en agroalimentaire, Éd Tec & Doc," *Coll. Sci. & Techn. Agroaliment.*, Lavoisier, Paris, 2006.
- [6] G. Montedoro, M. Servili, M. Baldioli, and E. Miniati, "Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 40, pp. 1571-1576, 1992.
- [7] C. W. Bamforth, "Beer haze," *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 57, pp. 81-90, 1999.
- [8] P. M. Nishio and T. Ito, "La Préparation et l'isomérisme géométrique des Acides Cinnamiques Méthylthio- α Substitués: 2e communication Stéréochimie et Les Spectres RMN," *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 29, pp. 732-736, 1965.
- [9] Z. HOUBA and H. HIMEUR, "Contribution à l'étude phytochimique et biochimique (In vitro et In vivo) des cônes femelles d'Ephedra alata DC. de la région d'Oued Souf," 2019.
- [10] J. B. Harborne, *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics*: Academic Press Ltd., 1989.
- [11] M. Galleano, S. V. Verstraeten, P. I. Oteiza, and C. G. Fraga, "Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 501, pp. 23-30, 2010.
- [12] C. G. Fraga, M. Galleano, S. V. Verstraeten, and P. I. Oteiza, "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols," *Molecular aspects of medicine*, vol. 31, pp. 435-445, 2010.
- [13] E. D. Lephart, T. W. West, K. S. Weber, R. W. Rhees, K. D. Setchell, H. Adlercreutz, *et al.*, "Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens," *Neurotoxicology and teratology*, vol. 24, pp. 5-16, 2002.

- [14] K. Jamali, S. Shinkaruk, V. Lamothe, M. Potier, and C. Bennetau-Pelissero, "Phytoestrogènes et le déclin mnésique hippocampo-dépendant lié à l'âge," *Médecine & Longévité*, vol. 2, pp. 12-21, 2010.
- [15] A. Crozier, "Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview," *Plants: Diet and Health: The Report of a British Nutrition Foundation Task Force*, pp. 27-48, 2003.
- [16] J. Tabart, C. Kevers, J. Pincemail, J.-O. Defraigne, and J. Dommes, "Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests," *Food chemistry*, vol. 113, pp. 1226-1233, 2009.
- [17] U. Nöthlings, S. P. Murphy, L. R. Wilkens, B. E. Henderson, and L. N. Kolonel, "Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study," *American journal of epidemiology*, vol. 166, pp. 924-931, 2007.
- [18] E.-z. Nkhili, "Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant," *Université Cadi Ayyad-Marrakech*, 2009.
- [19] P. M. Kris-Etherton, K. D. Hecker, A. Bonanome, S. M. Coval, A. E. Binkoski, K. F. Hilpert, *et al.*, "Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer," *The American journal of medicine*, vol. 113, pp. 71-88, 2002.
- [20] W. Leong and H. WAHLERS, "Palm tocotrienol complex in skin nutrition," *Chimica oggi*, vol. 20, pp. 40-42, 2002.
- [21] F. RADICIS-LYCOPERSICI, "ETUDE DE L'EFFICACITE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE D'ECORCES DE PUNICA GRANATUM LINN SUR DEUX SOUCHES PHYTOPATHOGENES: ASCOCYHTA RABIEI (PASS.) LABR. ET FUSARIUM OXYSPORUM."
- [22] S. Feknous, F. Saidi, and R. M. Said, "Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.)," *Nature & Technology*, p. 7, 2014.
- [23] R. Lopez-Velez, J. A. Perez-Molina, A. Guerrero, F. Baquero, J. Villarrubia, L. Escribano, *et al.*, "Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain," *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 58, pp. 436-443, 1998.

- [24] J. Harborne, E. Bell, and B. Charlwood, "Plant phenolics, Encyclopedia of Plant Physiology, Secondary Plant Products," ed: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1980.
- [25] J. Harborne, "Plant phenolics in Encyclopedia of Plant Physiology edited by Bell AD. and Charlwood BV, New Series Vol. 8," ed: Springer, Berlin, 1980.
- [26] V. Habauzit and C. Morand, "Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: an update for clinicians," *Therapeutic advances in chronic disease*, vol. 3, pp. 87-106, 2012.
- [27] T. Ozdal, D. A. Sela, J. Xiao, D. Boyacioglu, F. Chen, and E. Capanoglu, "The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility," *Nutrients*, vol. 8, p. 78, 2016.
- [28] V. Cheynier, H. Fulcrand, P. Sarni, and M. Moutounet, "Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification," *Analisis*, vol. 3, pp. M14-M21, 1997.
- [29] G. OLATUNJI, "Diterpene lactone from the heartwood of *Daniella oliveri*," *Cellulose chemistry and technology*, vol. 34, pp. 505-507, 2000.
- [30] J. Delattre, J.-L. Beaudeau, and D. Bonnefont-Rousselot, "Radicaux libres et stress oxydant(aspects biologiques et pathologiques)," 2005.
- [31] S. Munné-Bosch, "The role of α -tocopherol in plant stress tolerance," *Journal of plant physiology*, vol. 162, pp. 743-748, 2005.
- [32] S. Valcic, A. Muders, N. E. Jacobsen, D. C. Liebler, and B. N. Timmermann, "Antioxidant chemistry of green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-epigallocatechin gallate with peroxy radicals," *Chemical research in toxicology*, vol. 12, pp. 382-386, 1999.
- [33] Q. Y. Zhu, A. Zhang, D. Tsang, Y. Huang, and Z.-Y. Chen, "Stability of green tea catechins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, pp. 4624-4628, 1997.
- [34] S. Valcic, J. A. Burr, B. N. Timmermann, and D. C. Liebler, "Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals," *Chemical research in toxicology*, vol. 13, pp. 801-810, 2000.



Chapitre III :
Matériels et méthodes





III.1. Matériels et méthodes

III.1.1. Réactifs chimiques et appareillage

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualités analytiques. Les réactifs chimiques nous ont été fournis par les sociétés Sigma Aldrich (France), Alpha Aesar (France).

A. Les différents produits utilisés pour nos analyses sont les suivants :

- Ethanol 99,9 % ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) Production par EMD Millipore Corporation Germany.
- Réactif Folin Ciocalteu ($3\text{H}_2\text{O}$, P_2O_5 , 13WO_3 , 5MoO_3 , $10\text{H}_2\text{O}$) Production par (PROLABO).
- Trichlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3) Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- Acétate de sodium (CH_3COONa) Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- Acide gallique 99% ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) Production par (PROLABO).
- Quercitain di hydraté 97% ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) Production par (ALFA AESAR).
- DPPH 95% ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) Production par (ALFA AESAR).
- Acide Sulfurique 98% (H_2SO_4) Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- Sodium phosphate monobasic dehydrate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- Ammonium molybdate tetra hydrate $\text{H}_24\text{MO}_7\text{N}_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- Chlorure de fer (FeCl_3) Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- acide Acétique ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- 2, 4,6-tris (2-pyridyl)-1,3, 5-s-triazine (TPTZ) Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- Sulfate ferreux (FeSO_4) Production par (BIOCHEM Chemo pharma).
- Escherichia coli (ATCC 25922).
- Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853).
- Salmonella (ATCC 44300).
- Candida albicans (ATCC 10231).
- Liseria monocytogenes (ATCC 13932).
- Salmonella enterica serovar Typhi (ATCC 14028).
- Bacillus subtilis (ATCC 6633).

B. Les différents appareils utilisés pour nos analyses sont les suivants :

- Balance analytique (Shanghai Surisse Instrument précision 0.0001g).
- Un Rota vapeur de marque B.U.C.H.I modèle R-210, équipé par un refroidisseur supérieur.
- Un spectrophotomètre Shimadzu UV-Vis 1800, caractérisé par une haute résolution et une erreur inférieure à 0.01 nm. Cet appareil lié avec un microordinateur pour faciliter le traitement des résultats.
- Spectrophotometer FTIR – 1(FTIR- 8400S SHIMADZU).
- Un chromatographe liquide haute performance HPLC (RP - HPLC) de marque Shimadzu composé par un dégazeur DGU-20 A₃, deux pompes LC-20 AT couplé à un détecteur UV-Visible SPD-20 A et équipé d'une boucle d'injection de 20 µl et d'une colonne CTO-20 AC (RP C18 taille 4.6 mm x 150 mm ; avec une taille de particules de 5 µm).
- Ordinateur pour utiliser le logiciel Oronge pour estimer la valeur des polyphénols dans les échantillons de plante *Silybum marianum* (L.).

III.1.2. Matériels végétaux

Les matériels végétaux utilisés au cours de notre étude sont d'origines de la région e'Oued Souf. On obtient notre plante *Silybum marianum* (L.) en 31 Mars 2019.

III.2 Méthodologie**III.2.1. Préparation des extraits**

La récolte de la plante est effectuée le 31/03/2019 dans la zone du chakchake commune d'El Oued, à 10H30. On sépare la plante sur quatre échantillons, les feuilles, les branches, les fleurs, et les grains, pour la comparaison. Puis, les échantillons sont soumis à un lavage par l'eau distillé pour éliminer le sable et les sels. On laisse les quatre échantillons séchés à la température ambiante à l'air libre.

Après lavage, Le séchage des échantillons sont effectuées à l'aide d'une étuve à 50°C. On mesure chaque fois la masse de chaque échantillon pour contrôler la cinétique de séchage, et on a tracé les courbes de cinétique de séchage pour chaque échantillon.

Tableau de la cinétique de séchage de l'échantillon des feuilles *Silybum marianum* (L.) dans Annexe et la figure de la cinétique de séchage suivante.

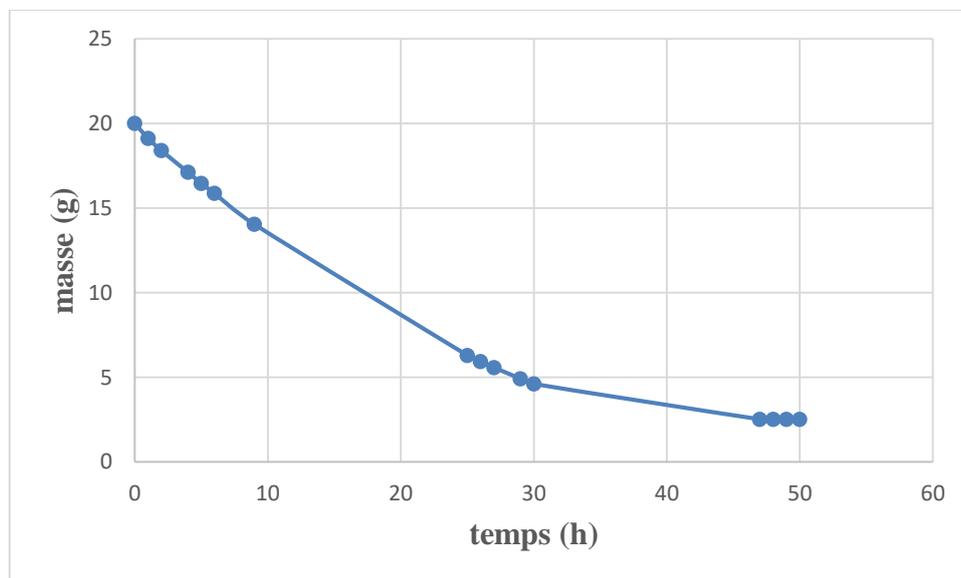


Figure III-1. Cinétique de séchage de l'échantillon des feuilles *Silybum marianum* (L.).

Tableau de la cinétique de séchage de l'échantillon des branches *Silybum marianum* (L.) dans Annexe et la figure de la cinétique de séchage suivante.

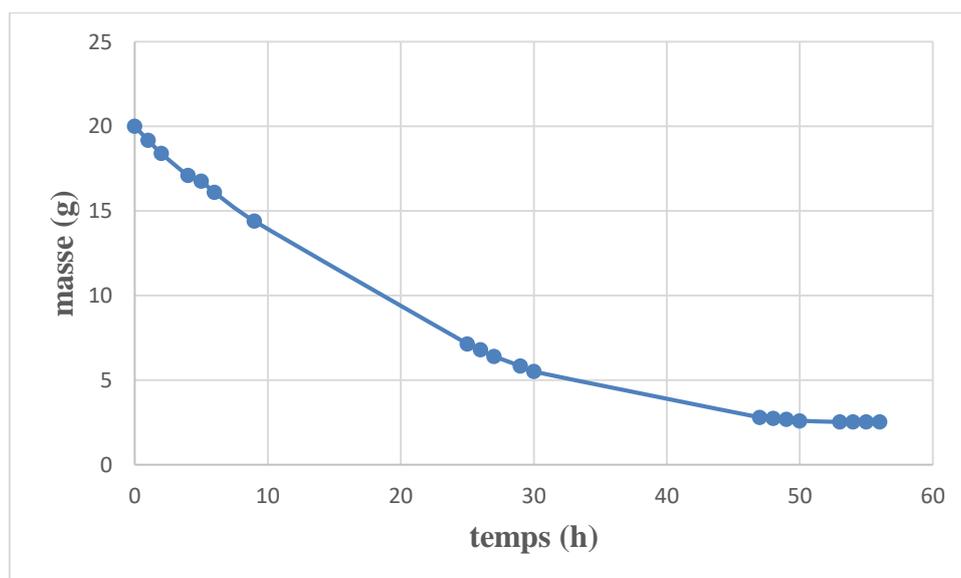


Figure III-02. Cinétique de séchage de l'échantillon des branches *Silybum marianum* (L.).

Tableau de la cinétique de séchage de l'échantillon des Fleurs *Silybum marianum* (L.) dans Annexe et la figure de la cinétique de séchage suivante.

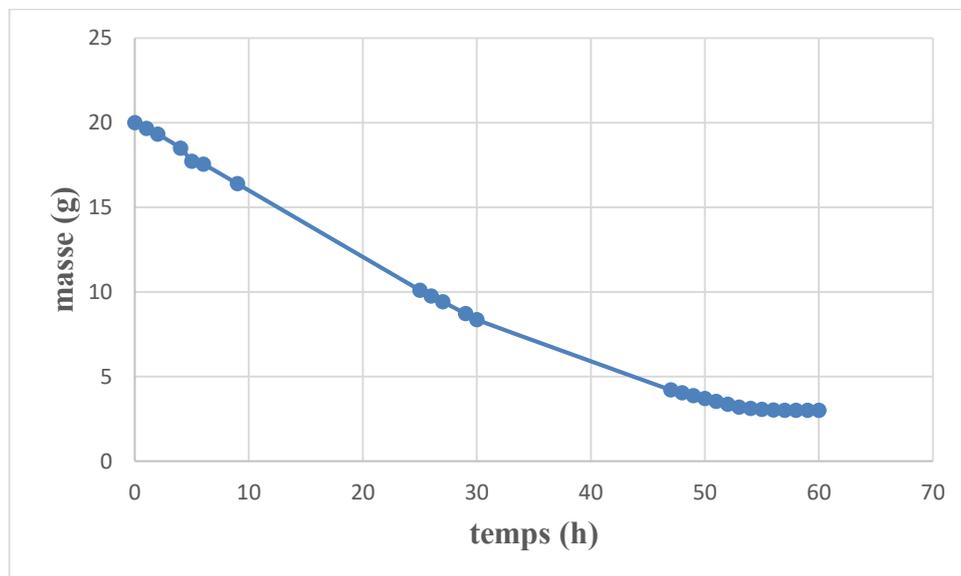


Fig.III-03.Cinétique de séchage de l'échantillon de la plante des Fleurs *Silybum marianum* (L.).

Tableau de la cinétique de séchage de l'échantillon des Grains *Silybum marianum* (L.) dans Annexe et la figure de la cinétique de séchage suivante.

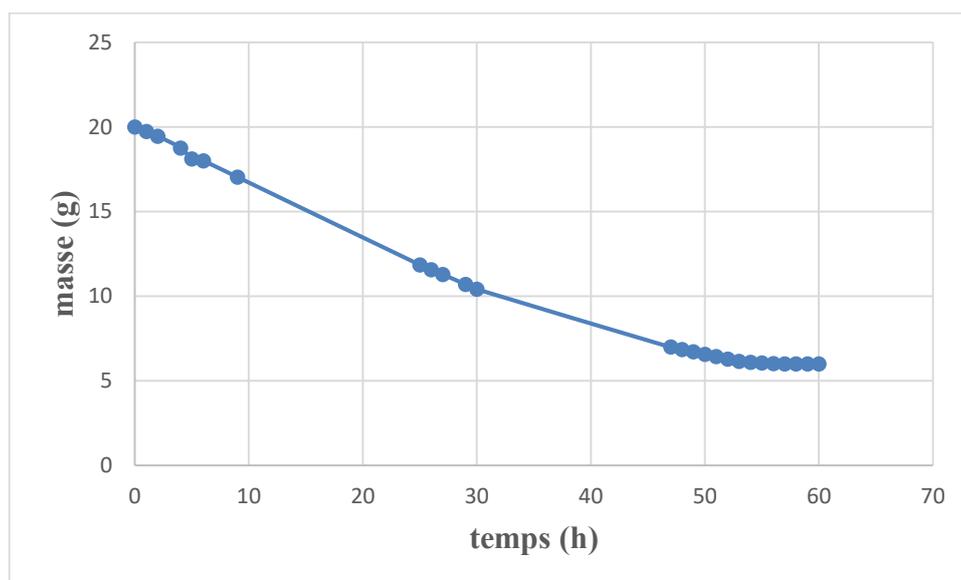


Fig.III-04.Cinétique de séchage de l'échantillon de la plante des Grains *Silybum marianum* (L.).

La figure de la cinétique de séchage de quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.) suivante.

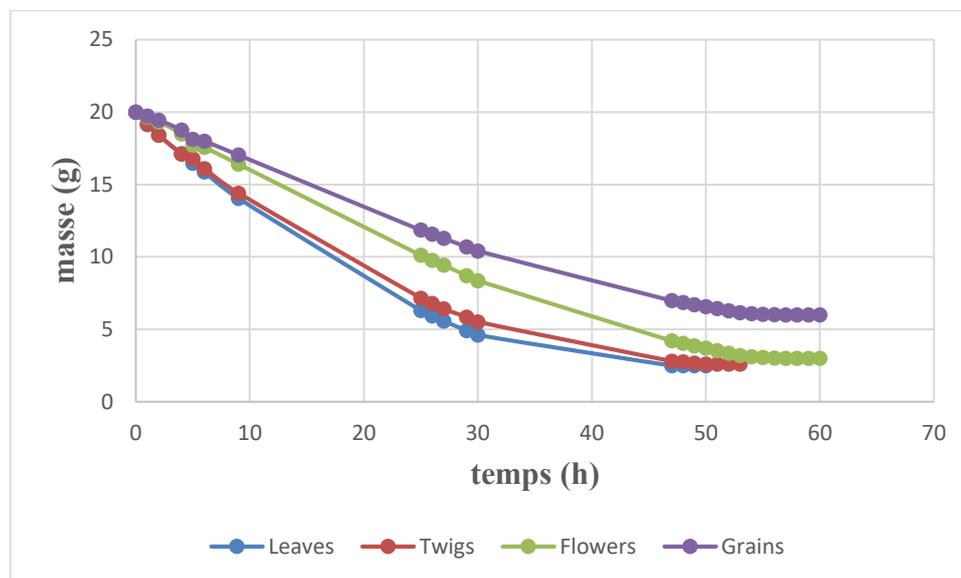


Fig.III-05. Cinétique de séchage des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

Dans le cinquième jour et après le séchage en mesure, la masse de quatre échantillons étudiés, pour les feuilles est égale à 50 grammes, pour les branches est égale à 50 grammes, pour les fleurs est égale à 30 grammes, et pour les grains est égale à 30 grammes.

Le tableau suivant résume le taux d'eau et les matières sèches dans les quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

Tableau III-01 : Quantité d'eau et matière sèche pour les quatre échantillons de la plante.

Extrait	Taux d'eau	Taux de matière sèche
Les feuilles	87,5 %	12,5 %
Les branches	87,5 %	12,5 %
Les fleurs	85 %	15 %.
Les grains	70 %	30 %.

En fin on broyé les quatre échantillons, On prend 50 grammes pour les feuilles et on ajoute 350 ml de hexane, c'est à dire, sept fois la masse des feuilles. On prend 50 grammes pour les branches et on ajoute 350 ml de hexane, c'est à dire, sept fois la masse des branches. Pour les fleurs on utilise 30 grammes et on ajoute 600 ml de hexane, c'est à dire, vingt fois la masse des fleurs. On prend 30 grammes pour des grains et on ajoute 210 ml de hexane, c'est à dire, sept fois la masse des grains.

On laisse les quatre échantillons dans hexane 24 heures avec l'agitation. Après on passe à l'étape de filtration.

En fin. On prend 50 grammes pour les feuilles et on ajoute 350 ml d'éthanol 70°, c'est à dire, sept fois la masse des feuilles. On prend 50 grammes pour les branches et on ajoute 350 ml d'éthanol 70°, c'est à dire, sept fois la masse des branches. Pour les fleurs on utilise 30 grammes et on ajoute 600 ml d'éthanol 70°, c'est à dire, vingt fois la masse des fleurs. On prend 30 grammes pour des grains et on ajoute 210 ml d'éthanol 70°, c'est à dire, sept fois la masse des grains.

On laisse les quatre échantillons dans l'éthanol 70° 24 heure avec l'agitation. On faire la macération trois fois, Après on passe à l'étape de filtration.

Cet appareil et basé sur la pression et on utilise une pompe à vide pour séparer les extraits et la matière solide. Après, on utilise le rota vapeur pour récupérer l'extrait solide de chaque échantillon. On mesure les masses des extrais récupérés de quatre échantillons et on résume les résultats dans le tableau suivant :

Tableau III-02 : Masse des extraits des quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.).

Extrait	La masse de l'extrait
Les feuilles	11.965 grammes
Les branches	20.58 grammes
Les fleurs	3.98 grammes
Des grains	2.80 grammes

Aussi, on mesure les rendements d'extraction de quatre échantillons et on représente les résultats dans le tableau suivant :

Le Rendement : (la masse de l'extrait / la masse de la matière végétale) *100.

Tableau III-03 : Rendements d'extraction des quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.).

Extrait	Rendement (%)w/w
Les feuilles	23,93 %.
Les branches	41,18 %.
Les fleurs	13,28 %.
Grains	9,3 %.

III.3. Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, et Flavanols totaux :

III.3.1 Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu [1, 2].

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 700 nm.

Il y a quatre échantillons, nous avons étudié les feuilles, les branches, les fleurs, et les grains de la plante *Silybum marianum* (L.), mais on prépare les quatre échantillons de même protocole. 10 mg de l'extrait pour chaque échantillon et ajouté à 10 ml de l'éthanol 70° (on déliée l'extrait par l'eau distillée pour éviter les dépôts) on fin préparer une concentration 1 mg/ml pour chaque échantillon. Puis, 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu et ajouté à 9 ml de l'eau distillé, Folin-Ciocalteu est délié dix fois, on prépare aussi la solution de Na_2CO_3 et déliée dix fois à l'eau rapport (10/90). 1 ml de chaque extrait ajouté à 1ml de Folin-Ciocalteu et 0.2 ml de Na_2CO_3 , on prépare le blanc du même protocole précédent mais on remplace l'extrait à l'éthanol c'est-à-dire 1 ml de l'éthanol plus 1 ml de Folin-Ciocalteu plus 0,2 ml de Na_2CO_3 [3, 4]. Puis on laisse les échantillons 40 minute on lit la longueur d'onde à 700 nm, On fait l'operations trois fois et en fin, on obtienne les résultats en (mg extrait /ml éthanol).

Remarque : les quatre échantillons d'extraits est déliés à l'eau distillée pour éviter les dépôts.

III.3.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux (PPT)

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg E Ga/ g Ms). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9997$ (figure III-06).

Pour trace cette courbe, on utilise dix échantillons à déférentes concentrations de l'acide gallique avec l'eau distillée (0.007, 0.008, 0.009, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.023, 0.035, 0.040) mg de l'acide gallique / ml de l'eau distillée).

On prend 1ml de l'acide gallique déliée par l'eau distillée, on ajoute 1ml de Folin-Ciocalteu et 0.2 ml de Na_2CO_3 . On prépare le blanc pour lit à UV visible et on remplace l'acide

gallique à l'eau distillée. On laisse les échantillons 40 minutes. On lit la longueur d'onde à 700 nm, on représente les résultats dans le tableau dans Annexe :

On trace la courbe d'étalonnages de l'acide gallique avec l'eau distillée en fonction de l'absorption, et on représente les résultats dans la figure suivante :

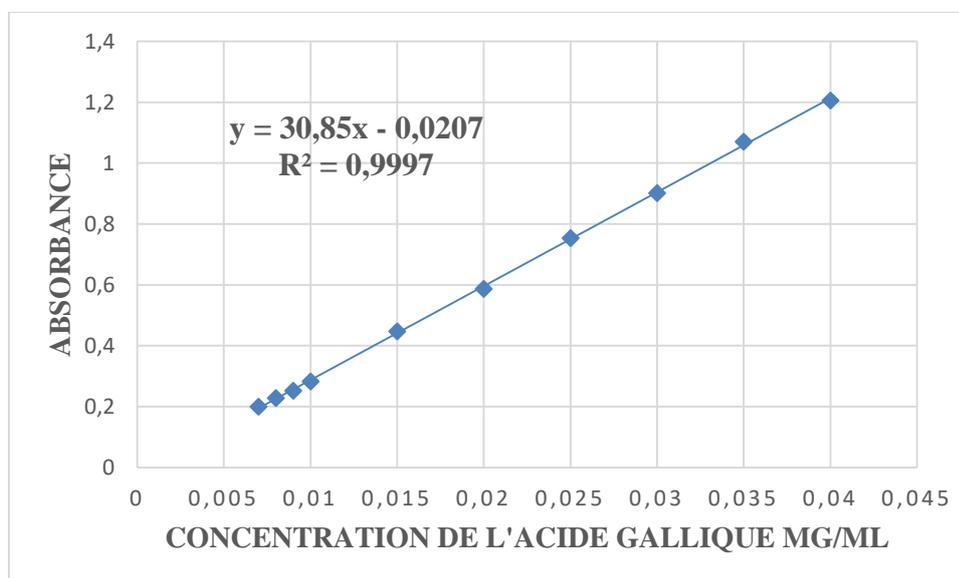


Figure III-06. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.

III.3.3 Dosage des flavonoïdes totaux :

La méthode utilisée pour l'estimation des taux de flavonoïdes est celle décrite par Ordonnez[5].

La coloration jaunâtre donnée dans cette méthode est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes[6].

On prend un volume de 1 ml (AlCl_3 , 2 %), on ajoute 1 ml de l'extrait pour les quatre échantillons, pour le blanc remplacé 1 ml de l'extrait par l'éthanol 70°. Puis, on laisse les échantillons 15 minutes et on lit l'absorption par spectrophotomètre UV-visible à 410 nm[7].

III.3.4 Courbe d'étalonnage pour le dosage de flavonoïdes totaux (FVT)

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la quercétine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9996$ (figure III-07). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg E QE /g Ms).

Pour tracer cette courbe on utilise dix échantillons à différentes concentrations de quercétine avec l'éthanol 70° (0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04, 0.045, 0.05, 0.055) mg de quercitrine / ml de l'éthanol 70°).

On prend 1 ml d'extract de quercétine et on ajoute 1 ml de (AlCl_3 , 2 %). On prépare le blanc pour lire à UV visible et on remplace le quercétine à l'éthanol 70°, on laisse les échantillons 15 minutes. En fin, on lit l'absorption à la machine spectrophotométrie UV-visible. On lit la longueur d'onde à 410 nm, on représente les résultats dans le tableau dans Annexe :

On trace la courbe d'étalonnage de quercétine avec l'éthanol 70° en fonction de l'absorption, on obtient les résultats dans la figure suivante :

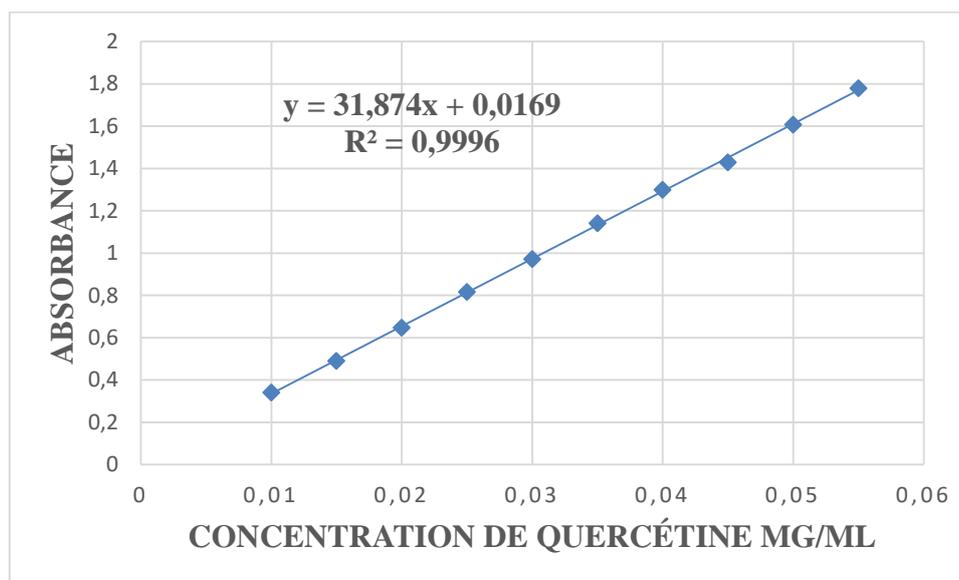


Figure III-07. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.

III.3.5 Dosage des flavanols totaux :

La méthode utilisée pour l'estimation de taux de Flavanols totaux est celle décrite par Kumaran et Karunakaran[8, 9].

On prend un volume de 1 ml d'extract et on ajoute 1 ml de (AlCl_3 , 2 %), et on ajoute 1.5 ml d'acétate de sodium (50 gramme/ (litres l'éthanol 70°)). Pour le blanc on remplace l'extract par l'éthanol. Puis, on laisse les échantillons 150 minutes. En fin, on lit l'absorption par spectrophotomètre UV-visible à 440 nm[10, 11].

III.3.6 Courbe d'étalonnage pour le dosage de Flavanols totaux (FLT)

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la routine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9969$ (figure III-08). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent routine par gramme de matière sèche (mg RE /g Ms).

Pour tracer cette courbe, on utilise huit échantillons à différentes concentrations de routine avec l'éthanol 70° (0.03, 0.04, 0.05, 0.065, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1) mg de routine / ml de l'éthanol 70°).

On prend 1 ml de routine et on ajoute 1 ml de (AlCl_3 , 2 %), on ajoute aussi 1.5 ml (acétate de sodium 50 gramme/litres). Le blanc pour lit à UV visible. On remplace routine a l'éthanol 70°, on laisse les échantillons 150 minutes et on lit l'absorption à la machine spectrophotométrie UV-visible. On lit la longueur d'onde à 440 nm, on représente les résultats dans le tableau dans Annexe :

On trace la courbe d'étalonnage de routine avec l'éthanol 70° en fonction de l'absorption on obtient les résultats dans la figure suivante :

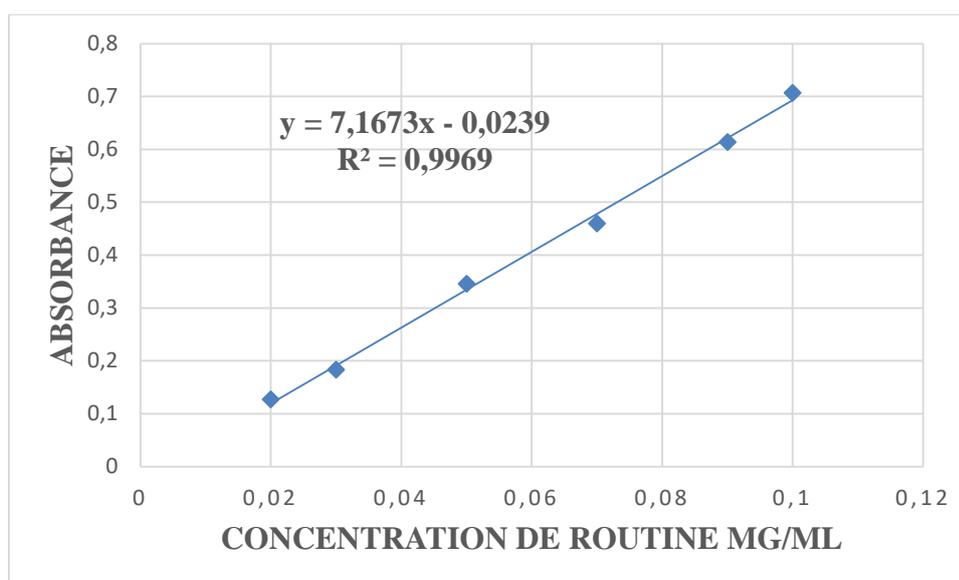


Figure III-08. Courbe d'étalonnage pour le dosage des Flavanols totaux.

III.4. Prédiction de la teneur totale en phénols de *Silybum marianum* (L.) à l'aide de l'outil d'exploration de données Orange :

Silybum marianum (L.) est connu comme une riche source végétale de composés phytochimiques actifs sous forme de polyphénols, qui sont connus pour avoir des propriétés importantes favorisant la santé. Cette étude étudie la teneur totale en polyphénols de l'extrait de *Silybum marianum* (L.) à l'aide de la spectroscopie UV-Vis combinée à l'outil d'exploration de données Orange. Cette méthode ne nécessite que 1 mg de l'extrait et 1 mg des réactifs au maximum, et elle n'est utilisée qu'une seule fois en créant une base de données associée à chaque détecteur ou modèle mathématique. Où l'on note que les résultats obtenus dans la méthode de réaction sont très proches des résultats prédits à partir de l'outil Orange Data Mining Tool. La méthode prévue est utile pour évaluer les composés phénoliques dans les plantes médicinales.

III.4.1. Matériaux et méthodes

Après une année, on effectue l'opération de dosage des polyphénols totaux de trois échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.) les feuilles, les branches, et les fleurs.

III.4.2. Détermination de la teneur totale en polyphénols pour ancienne méthode :

Les mesures des polyphénols totaux (TPC) dans divers extraits sont effectuées par la méthode Singleton et Rossi à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu [1, 12-14]. Des volumes de 1000 µl à différentes concentrations dans différents extraits ont été ajoutés à 200 µl de Na₂CO₃ (10 %). 1000 µl de Réactif Folin-Ciocalteu dilué dix fois ont été ajoutés au milieu réactionnel. Après avoir incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 40 minutes. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Créer une courbe d'étalonnage en utilisant de l'acide gallique à diverses concentrations (7-40 µg / ml) comme étalon [15-18]. Par conséquent, le résultat est l'équivalent en milligrammes d'acide gallique par gramme de poids sec (mg GAE / g DW).

III.4.3. Description de la nouvelle méthode

Logiciels et outils

Orange Data Mining est un outil d'exploration de données utile pour la programmation visuelle et l'analyse exploratoire des données qui peut être écrite en Python. Orange possède de nombreux composants appelés widgets. Chaque widget intègre une récupération de données, un pré-traitement, une visualisation, tâche de modélisation ou d'évaluation. La combinaison de différents widgets dans un workflow vous permet de créer des schémas d'analyse de données complets au fur et à mesure. Avec une grande bibliothèque de widgets, vous ne serez pas à court de choix. Le programme Orange permet une analyse simple même sans en savoir beaucoup sur les statistiques, l'apprentissage automatique ou l'exploration de données exploratoire en général [19-24].

III.4.4. Méthodologie

Dans cette étude propose une comparaison de la méthode Singleton et Rossi (Singleton et Rossi, 1965), et les méthodes de prédiction de régression linéaire dans l'outil Orange Data Mining pour l'analyse et la prédiction de la teneur en phénols dans *Silybum marianum* (L.). Le flux méthodologique utilisé dans cette étude est illustré à la **Fig. 09** suivante :

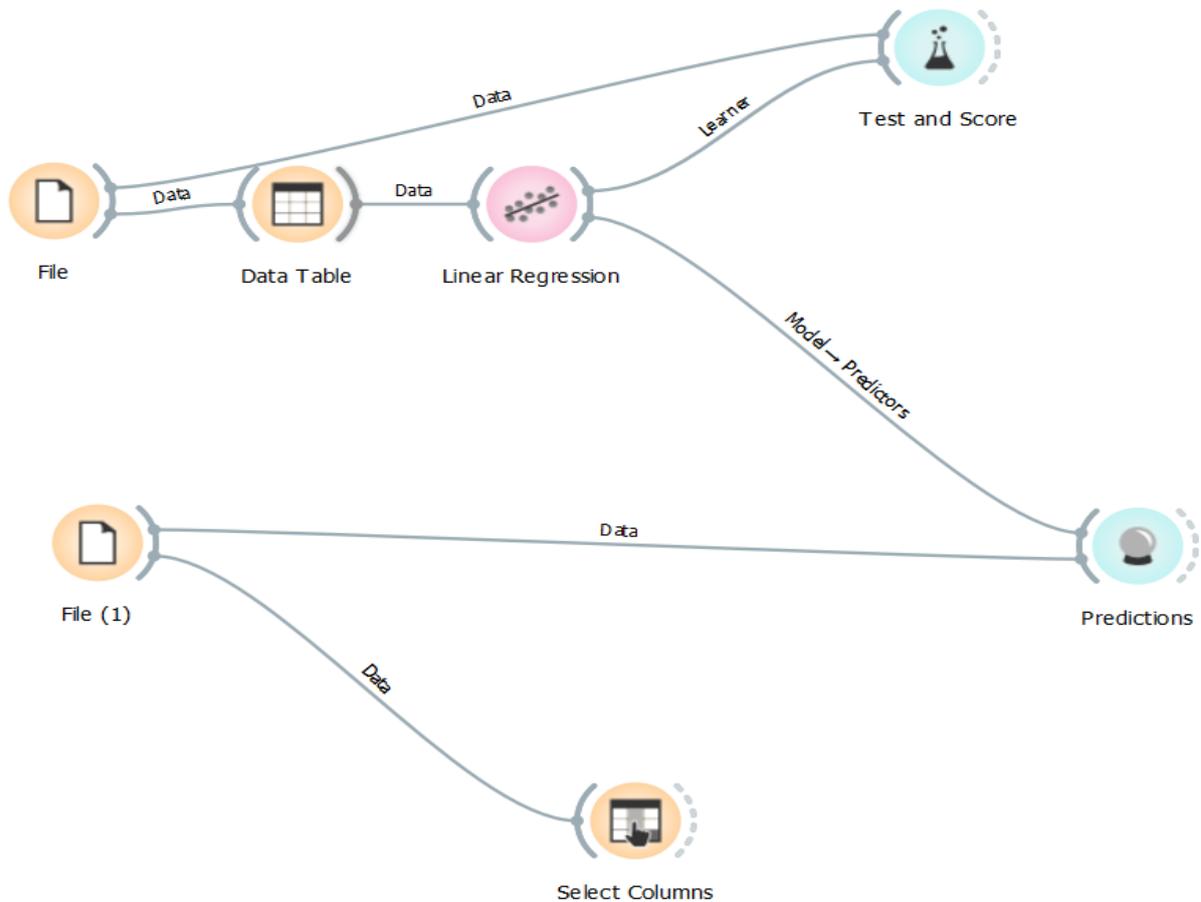


Figure III-09. Structure du flux de travail dans Orange Software.

Dans cette **Fig. 09**, nous concevons le programme en utilisant des modèles de prophétie qui sont présents dans le logiciel Orange pour extraire les résultats que nous voulons obtenir, qui sont la concentration en polyphénols des échantillons scolaires de la plante *Silybum marianum* (L.), des feuilles, des brindilles et des fleurs ou un autres plantes médicinale.

Un nouveau fichier : Tout d'abord, nous mettons l'information que nous connaissons sa concentration, qui est l'échantillon de chacun de l'acide gallique, de la quercétine et de la rutine dans le logiciel Orange, qui est une matrice reliant la concentration de tout l'acide gallique, la quercétine et la rutine, et l'absorption dans le champ de 200-500, à travers laquelle nous voulons prédire les concentrations des échantillons étudiés.

Table de données : C'est une table dans laquelle nous mettons les données et il organise et stocke les tableaux sous la forme d'une table pour faciliter le travail du programme pour prédire le résultat que nous voulons obtenir.

Régression linéaire : qui est le processus de liaison de la relation entre les concentrations étudiées et la courbe de chaque concentration dans la première partie du programme pour chacun

de l'acide gallique, quercétine, et rutine avec la deuxième partie du programme pour les échantillons étudiés de la plante de *Silybum marianum* (L.).

Testez et marquez : il extrait le facteur de correction et calcule le taux de réussite du modèle de prédiction et le résultat associé aux modèles de prédiction précédemment utilisés.

Le deuxième nouveau fichier : dans lequel nous mettons les informations dont nous voulons prédire le résultat et qui est d'un objectif inconnu dans le logiciel Orange, qui est une matrice reliant les concentrations de l'échantillon étudiée et l'absorption dans la gamme comprise entre 200-500, qui est les trois échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

Enfin, les prédictions : sont d'extraire les concentrations obtenues à partir du programme pour les trois échantillons étudiées de la plante *Silybum marianum* (L.), de concentrations inconnues, qui est la concentration de polyphénols.

Nous préparons différentes concentrations d'acide gallique, quercétine et de rutine dans de l'éthanol à 70 °, et ces concentrations sont indiquées dans les **Fig. 10, Fig. 11, et Fig. 12**, suivantes :

Ensuite, nous lisons les échantillons dans le dispositif UV-vis de la plage 200-500 pour chacun de l'acide gallique, de la quercétine et de la rutine. Où nous obtenons une grande matrice reliant les concentrations et l'absorption pour chaque échantillon séparément et cette matrice contient dans la première colonne une concentration. Des concentrations approuvées pour l'un de ces témoins, sauf si l'acide gallique ou la quercétine ou la rutine comme le montre les trois figures (**Fig.10,11, et 12**), et chaque concentration a une absorption dans chaque gamme de 200-500, alors nous entrons les tableaux pour chacun de l'acide gallique ou de la quercétine ou la rutine dans la première partie de l'outil d'exploration de données Orange (ODMT). A la fin, en fonction de ce que nous voulons obtenir sa concentration, nous obtenons le facteur de correction suivant, l'acide gallique avec un facteur de correction **R² 0,989**, et la quercétine avec un facteur de correction de **R² 0,996**, et une rutine avec un facteur de correction de **R² 0,978**. Enfin, ces résultats mentionnés dans la première partie du programme sont considérés comme étant la base de données de la nouvelle méthode. Utilisez-le pour toute plante ou mélange de concentration inconnue :

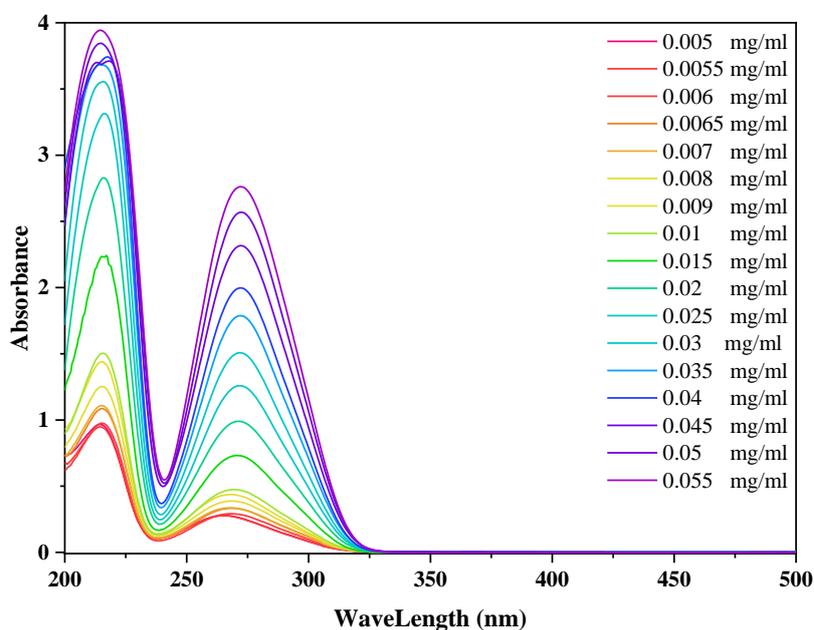


Figure III-10. Courbe UV de l'acide gallique aux différentes concentrations

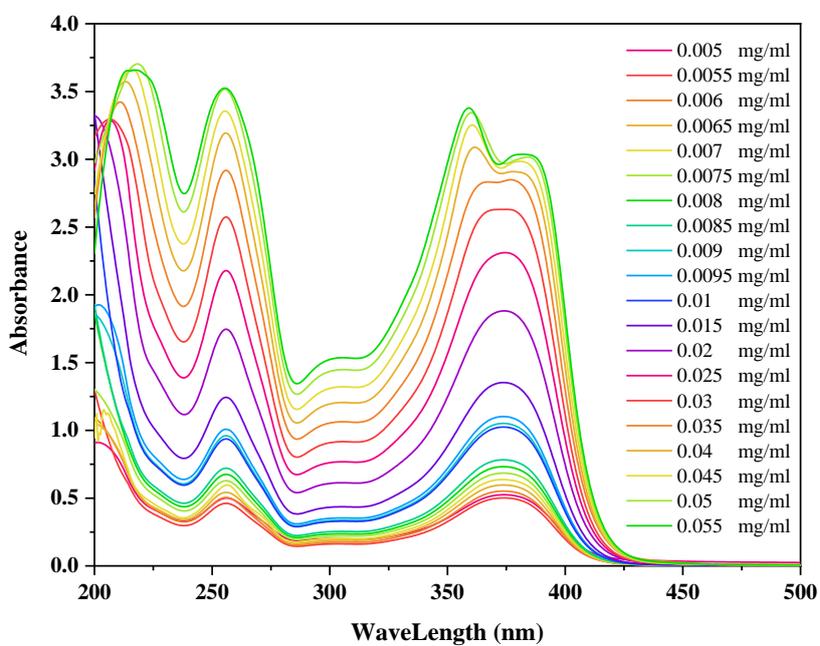


Figure III-11. Courbe UV de la quercétine aux différentes concentrations.

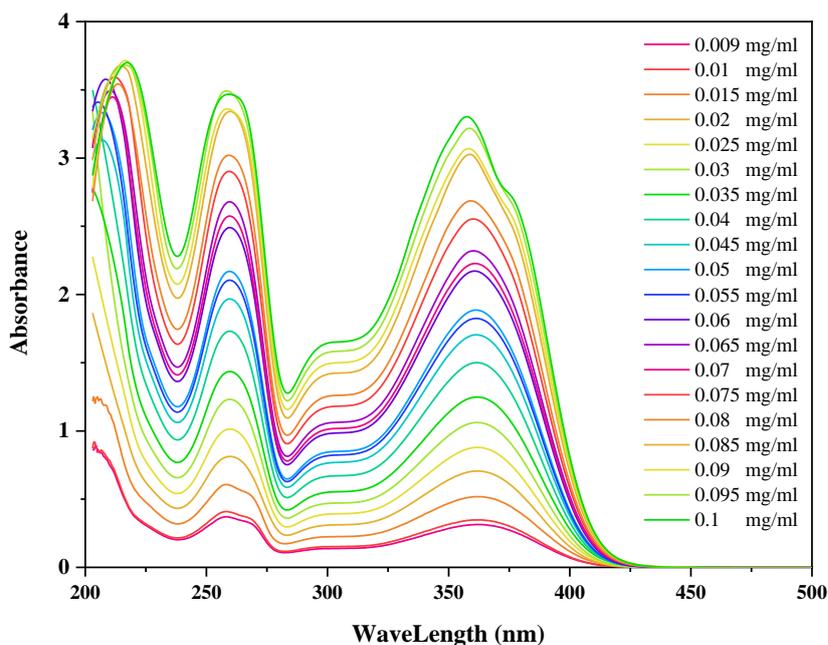


Figure III-12. Courbe UV de la rutine aux différentes concentrations

III.4.5. Analyse phytochimique quantitative par nouvelle méthode

III.4.4.1. Essai de vérification de la nouvelle méthode d'analyse phytochimique

Pour un test de validation de notre nouvelle méthode, nous avons préparé deux mélanges de concentrations différentes d'acide gallique, quercétine et de rutine **Fig. 13**.

Mélange 1 :

- ✓ 0,4 ml d'acide gallique avec une concentration de 0,07 mg / ml.
- ✓ 0,4 ml de quercétine avec une concentration de 0,02 mg / ml.
- ✓ 0,4 ml de concentration Rutine 0,04 mg / ml.

Mélange 2 :

- ✓ 0,4 ml d'acide gallique avec une concentration de 0,08 mg / ml.
- ✓ 0,4 ml de quercétine avec une concentration de 0,03 mg / ml.
- ✓ 0,4 ml de concentration Rutine 0,05 mg / ml.

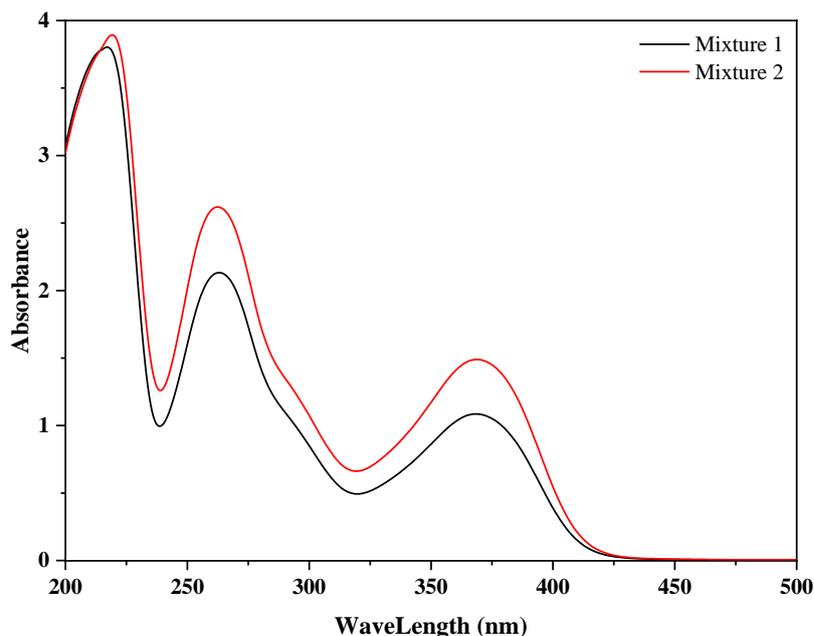


Figure III-13. Courbe UV pour l'acide gallique, la quercétine et la rutine test de vérification de concentration différent pour les mélanges 1 et 2.

III.4.4.2. Méthode de calcul

Lorsque nous voulons calculer la concentration d'acide gallique dans le mélange, nous insérons la matrice de l'acide gallique dans la première partie du programme et nous entrons la première matrice du mélange dans la deuxième partie du programme où nous obtenons la première concentration mentionnée dans le tableau 2, à l'absorption maximale du premier mélange et lorsque nous voulons calculer la concentration en acide gallique dans le mélange pour la 2^{ème} fois, nous entrons dans la matrice du deuxième mélange dans la deuxième partie du programme où nous obtenons la deuxième concentration mentionnée dans le tableau 2, qui correspond à l'absorption maximale du deuxième mélange. Pour calculer la concentration de la quercétine ou de la rutine dans le premier et le deuxième mélange, nous insérons la matrice de quercétine ou la rutine dans la première partie du programme, et de la même manière, nous changeons les premier et deuxième mélanges dans la deuxième partie du programme comme nous l'avons fait avec l'acide gallique.

III.4.4.3. La loi du calcul de la concentration

La concentration à calculer est égale à la concentration de l'extrait du programme, divisant l'absorption maximale du mélange multipliée par mille (**Eq.1**). A titre d'illustration, nous prenons la concentration d'acide gallique dans le premier et le deuxième mélange.

$$C_{GA} = (C^{(2)}/Absor) \times 1000 \quad (\text{Eq.1})$$

Avec C_{GA} : Concentration d'acide gallique en mélange.

$C^{(2)}$: Concentration calculée par Orange Data Mining Tool en mg/ml.

Absor: Absorbance des mélanges 1 et 2 en λ max de GA et Qer et Rou en (nm).

III.4.5. Teneur totale en polyphénols par une nouvelle méthode :

III.4.5.1. Polyphénols totaux dans les feuilles, les branches et les fleurs :

De plus, après nous sommes assurés de l'exactitude de la méthode, nous l'avons appliqué aux trois échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.), où nous avons préparé les concentrations suivantes pour chaque échantillon, qui sont indiquées dans le tableau 4 suivant :

Après cela, nous lisons les trois échantillons dans le dispositif UV-vis de la gamme de 200-500, où nous obtenons une grande matrice reliant les concentrations et l'absorption de chaque échantillon séparément. **Fig. 14, Fig. 15, et Fig. 16.** Ensuite, nous entrons dans la matrice pour chacune de trois concentrations de trois échantillons du *Silybum marianum* (L.). Dans la deuxième partie du programme, puis nous obtenons les concentrations suivantes du logiciel orange, où nous notons que les résultats obtenus dans la méthode de réaction sont très proches des résultats obtenus à partir de l'outil d'exploration de données Orange.

$\lambda_{\max} = 216$ nm Acide Gallique.

Méthodes ODMT : Ethanol 70 °, R^2 0.989 pour feuilles, branches, et fleurs.

III.4.5.2. loi du calcul de la concentration

La concentration à calculer est égale à la concentration des extraits du programme divisée par l'absorbance maximale de l'échantillon multipliée par mille (**Eq.2**)

$$C_{Sample} = \left(\frac{C_{ODMT}}{Absor} \right) \times 1000 \quad \text{Eq. 2}$$

Avec :

- ✓ C_{Sample} : Concentration de polyphénol des échantillons de la plante en (mg GA / g DW).
- ✓ C_{ODMT} : Concentration calculée par Orange Data Mining Tool en (mg/m).
- ✓ **Absor** : Absorbance de l'échantillon en λ max en (nm)

À titre d'exemple :

Concentration de polyphénol à partir des échantillons des feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.) est égale : $C_{\text{Sample}} = (0,197/0,0022) \times 1000 = 11,19$ (mg GA/g DW).

Concentration de polyphénol à partir des échantillons des branches de la plante *Silybum marianum* (L.) est égale : $C_{\text{Sample}} = (0,0007/0,082) \times 1000 = 8,54$ (mg GA/g DW).

Concentration de polyphénol à partir des échantillons des Fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.) est égale : $C_{\text{Sample}} = (0,0030/0,219) \times 1000 = 13,70$ (mg GA/g DW).

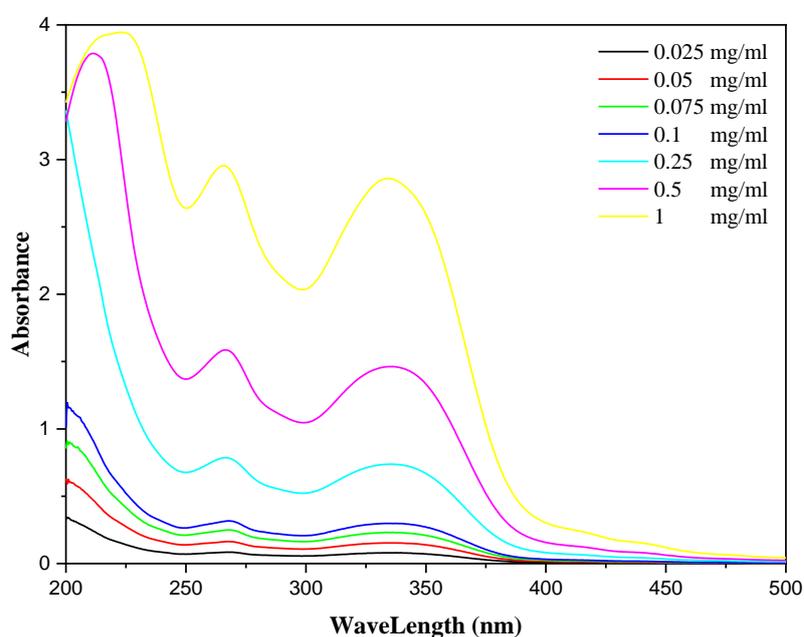


Figure III-14. Courbe UV des feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.) à concentrations différentes

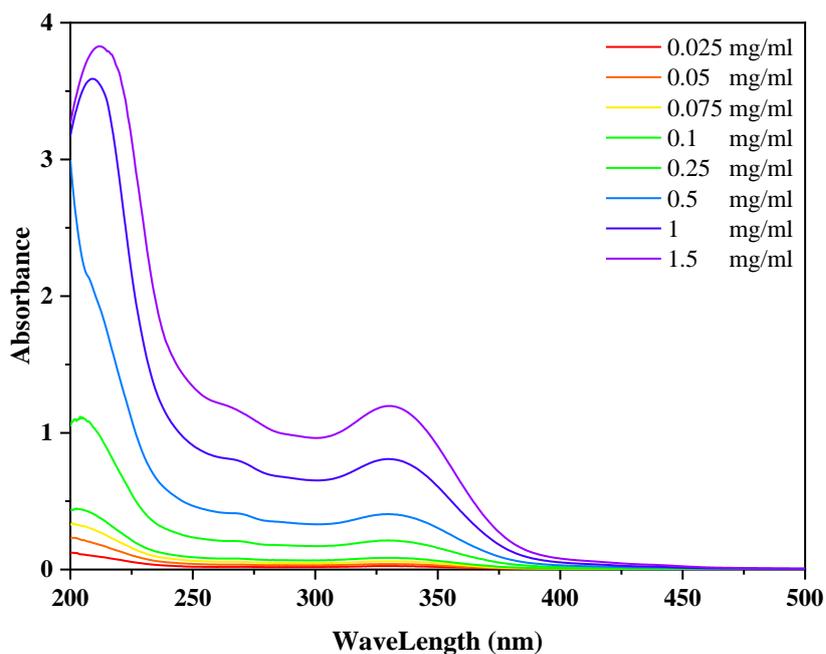


Figure III-15. Courbe UV des branches de la plante *Silybum marianum* (L.) à concentration déférente

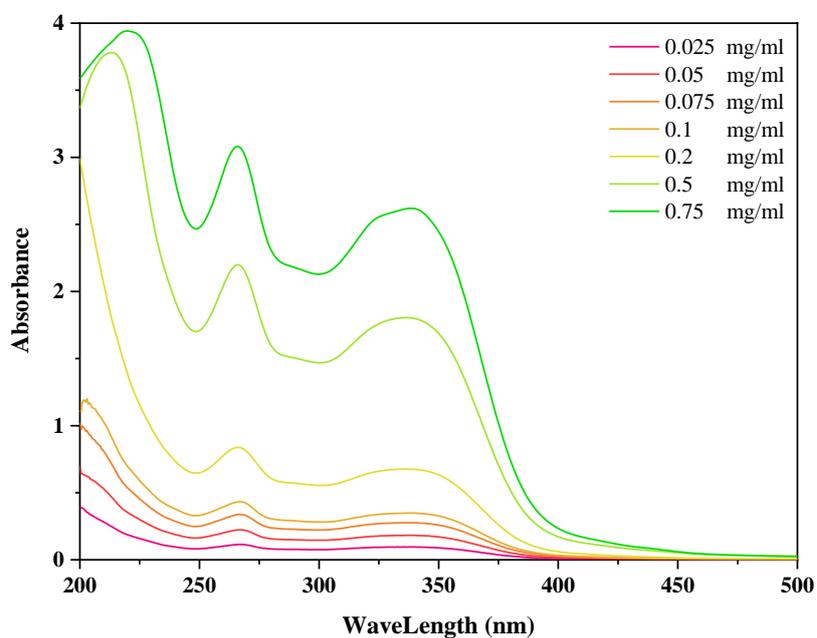


Figure III-16. Courbe UV des fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.) à concentration déférente

III.5. Activité antioxydante :**III.5.1. Activité antioxydante totale (CAT) :**

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_4^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide [25, 26].

➤ Mode opératoire

Un volume de 0.1 ml de chaque extrait à différentes concentrations est mélangé avec 1 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 1 ml de la solution du réactif et 0.1 ml du solvant utilise l'éthanol 70° et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) [27-29].

III.5.1.1. Méthode de la Capacité antioxydante totale (CAT) :

L'acide ascorbique a été utilisée comme étalon à différentes concentrations, La teneur en capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg AA/g). Le taux de capacité antioxydante totale des extraits ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique. (Figure III-17) :

On prend les différentes concentrations de l'acide ascorbique à l'éthanol 70°, on obtient différentes absorptions des résultats obtenus dans le tableau dans Annexe :

En prend les résultats de (tableau III-08 Annexe) et on trace la courbe d'étalonnages de l'acide ascorbique avec l'éthanol 70° en fonction de l'absorption, on obtient les résultats dans la Figure suivant :

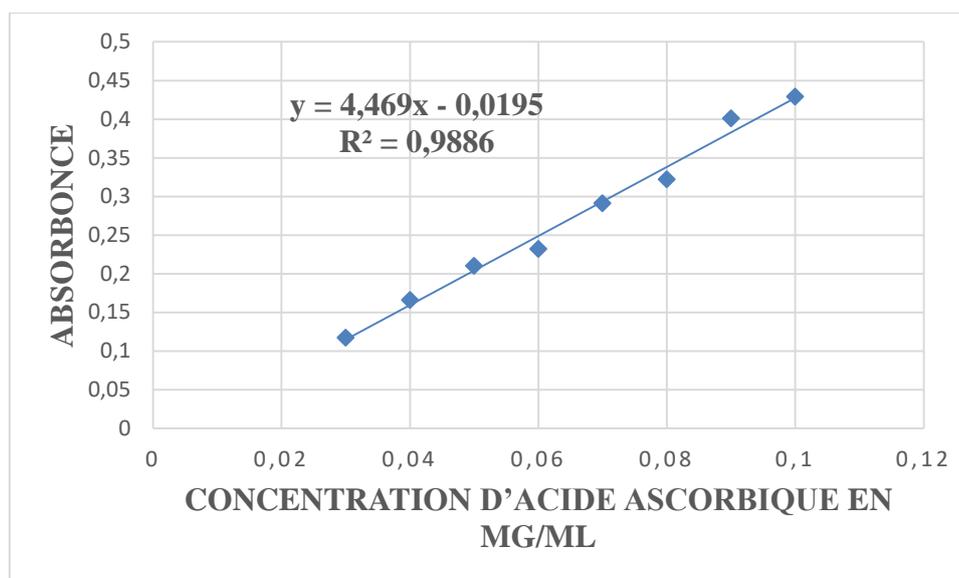


Figure III-17. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

III.5.2. Test DPPH :

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante[30].

En effet, le DPPH est un radical libre stable. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution à examiner[31, 32].

L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée comme suit : à 0.5 ml d'une solution éthanoïque de DPPH (7.8 mg DPPH dans 100 ml éthanol) a été mélangé 0.3 ml de l'extrait des échantillons. Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc qui contient de d'éthanol pur. Le contrôle est la solution DPPH avec le solvant (éthanol) [33-37].

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires[38, 39]. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IC (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\% \text{ IP} = [(A_{t_0} - A_{t_{30}}) / A_{t_0} \times 100]$$

Avec A_{t_0} : absorbance du témoin (ne contenant aucun antioxydant) après 30 minutes

$A_{t_{30}}$: absorbance des extraits mesurés après 30 minutes.

L'activité anti radicalaire exprimée en IC_{50} (mg / ml), la dose anti radicalaire nécessaire pour provoquer 50% d'inhibition. Toutes les résultats présentés sont des moyennes (\pm SEM) et analysées avec trois répétitions.

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le % IC correspondant, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes concentrations et les % IC.

A partir de cette régression, nous avons déduit la valeur correspondante d' IC_{50}

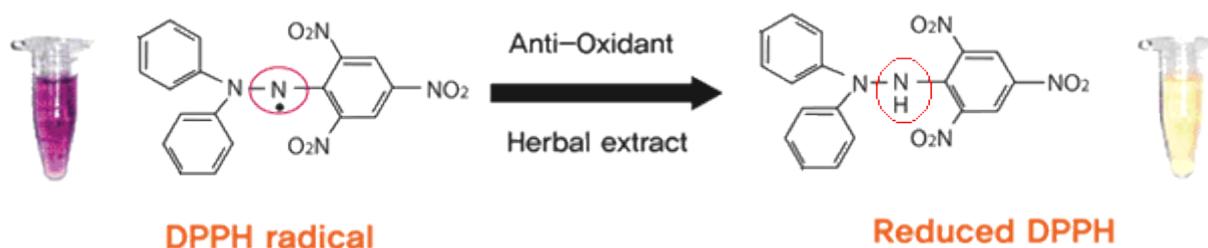


Figure III-18. Réduction du radical libre DPPH.

III.5.2.1. Test DPPH pour les fleurs de *Silybum marianum* (L.) :

On prépare dix échantillons à différentes concentrations partir de 0.1 mg/ml à 3 mg/ml des fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.). Ensuite, on prépare le blanc éthanol. Et le contrôle de la solution DPPH avec le solvant éthanol pur. On utilise le test DPPH à partir de cette concentration de l'extrait, on obtient les résultats dans le (tableau III-14) Suivant :

L'absorption de solution DPPH avec le solvant éthanol est égale $A_{t_0} = 1.268$.

Enfin, on obtient les résultats dans le tableau dans Annexe :

On utilise les valeurs de cette tableau pour tracer la courbe d'effet d'extrait des fleurs de *Silybum marianum* (L.) sur le radical DPPH (% IP en fonction des concentrations). On fait l'opération trois fois, on obtient le **Tableau III-13** et les trois courbes suivantes **Figure III-19**, **Figure III-20**, **Figure III-21**.

L'équation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des Fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.) représentés dans annexe.

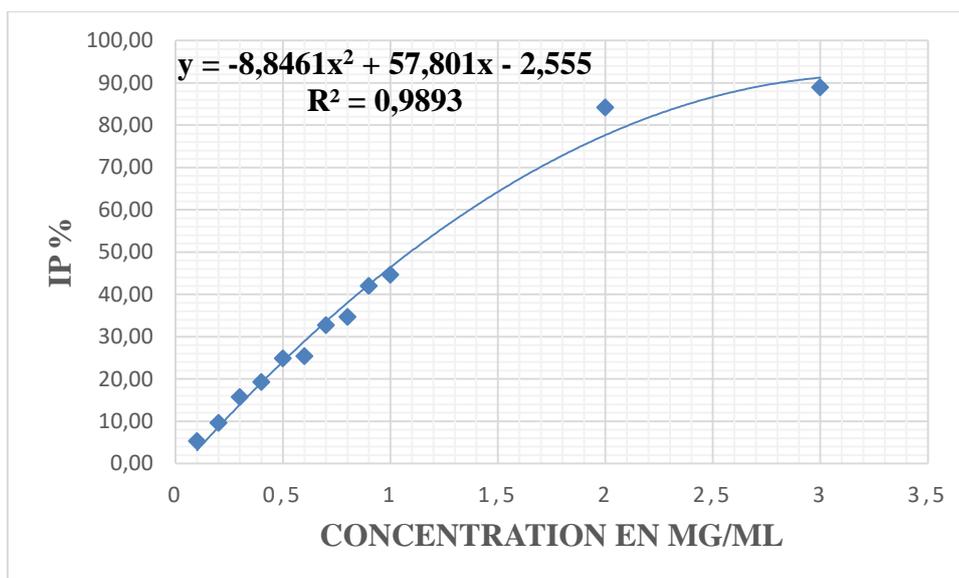


Figure III-19. Première expérience d'effet d'extrait des fleurs de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

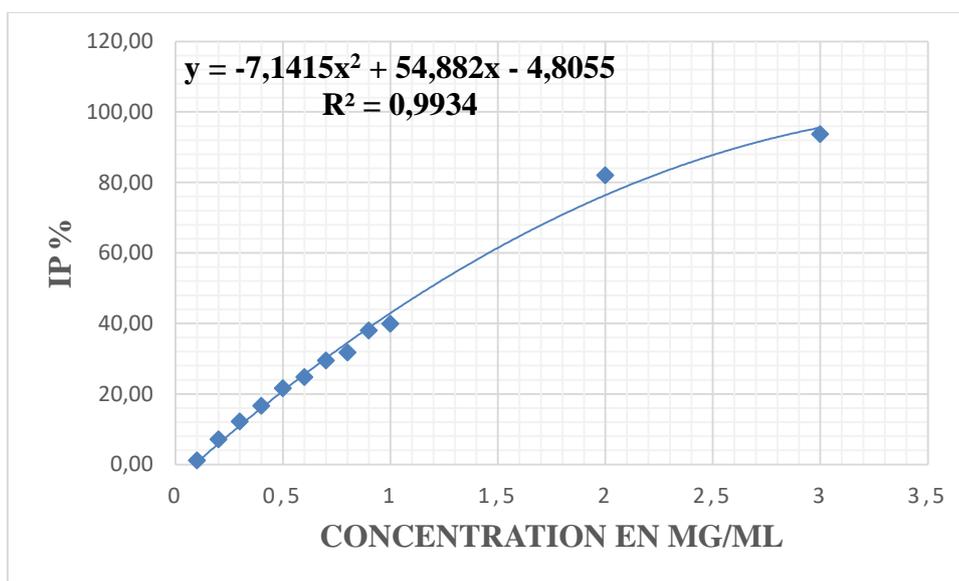


Figure III-20. Deuxième expérience d'effet d'extrait des fleurs de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

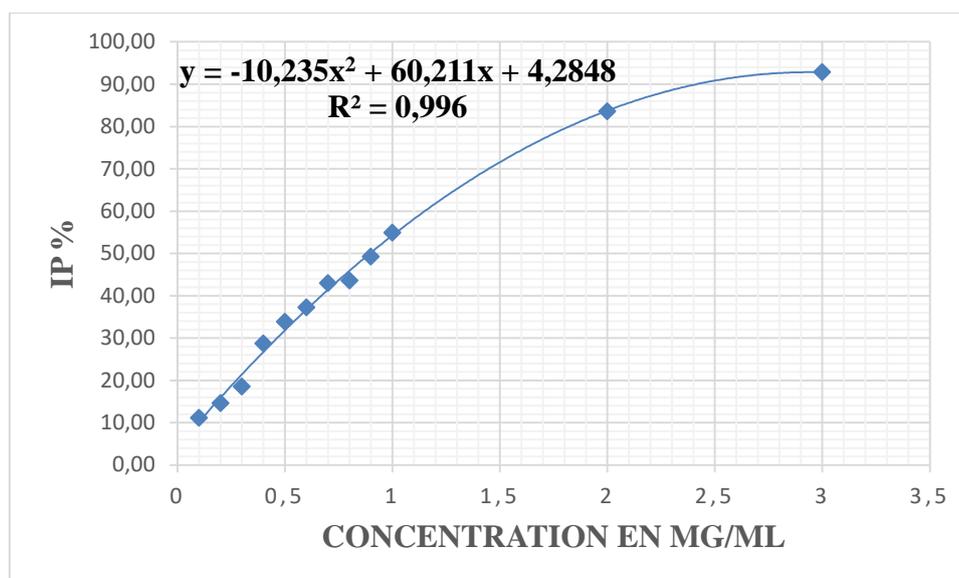


Figure III-21. Troisième expérience d'effet d'extrait des fleurs de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

III.5.2.2 Test DPPH pour les branches de *Silybum marianum* (L.) :

On prépare dix échantillons à différentes concentrations partant de 0,1 mg/ml à 1 mg/ml des branches de la plante *Silybum marianum* (L.). Ensuite, on prépare le blanc éthanol 70°, et le contrôle de la solution DPPH avec le solvant éthanol. On utilise le test DPPH à partir de cette concentration de l'extrait, on obtient les résultats dans le (tableau III-14) Suivant :

L'absorption de solution DPPH avec le solvant éthanol est égale $A_{t_0} = 1.268$.

Enfin, on obtient les résultats dans le tableau dans annexe :

On utilise les valeurs de ce tableau pour tracer la courbe d'effet d'extrait des branches de *Silybum marianum* (L.) sur le radical DPPH (% IP en fonction des concentrations). On fait l'opération trois fois on obtient le **Tableau III-15** et les trois courbes suivantes **Figure III-22**, **Figure III-23**, **Figure III-24**.

L'équation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des branches de la plante *Silybum marianum* (L.) représentés dans annexe.

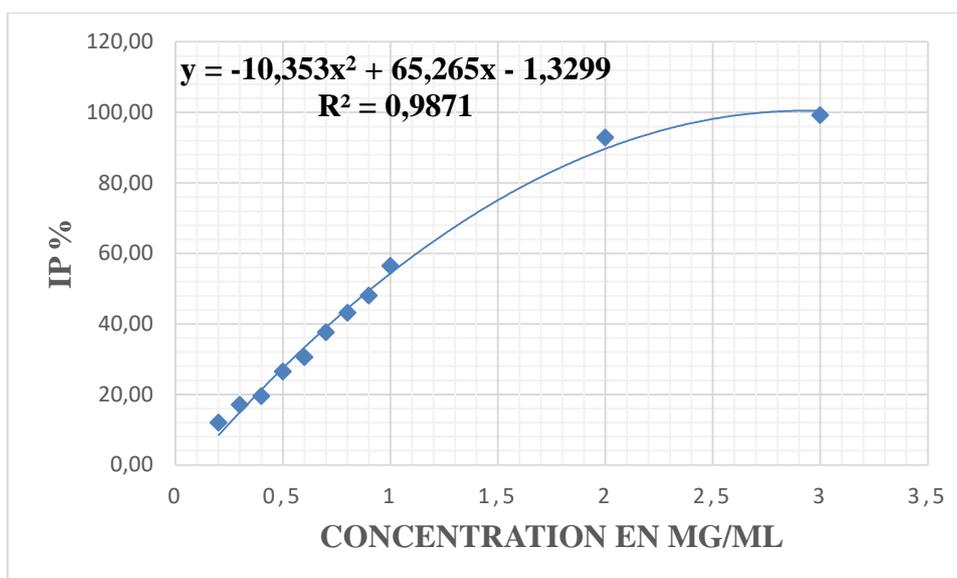


Figure III-22. Première expérience d'effet d'extrait des branches de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

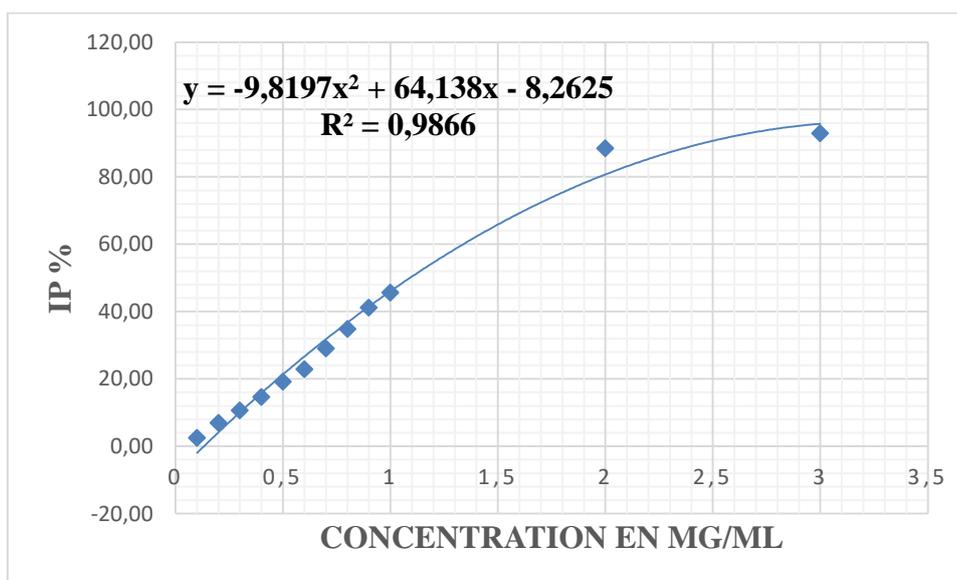


Figure III-23. Deuxième expérience d'effet d'extrait des branches de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

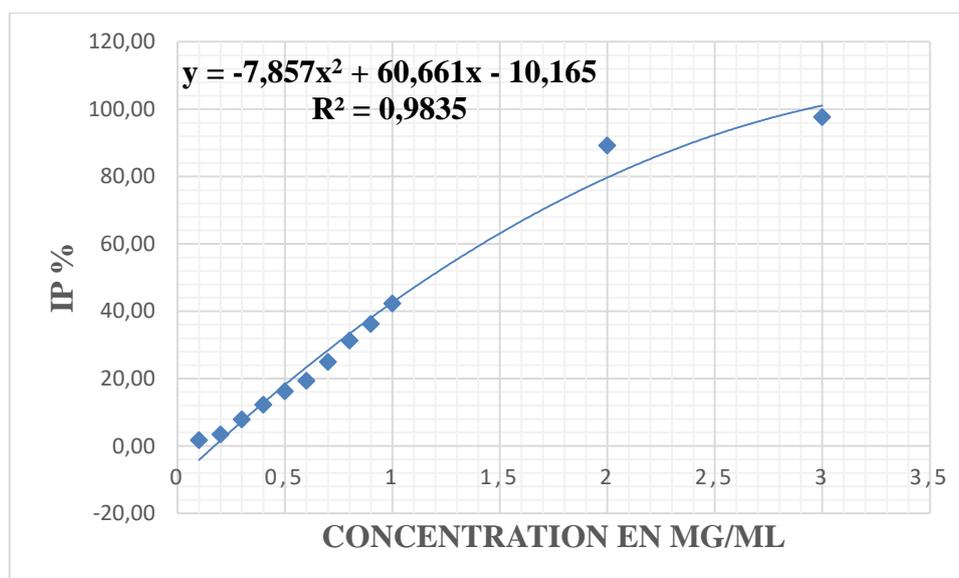


Figure III-24. Troisième expérience d'effet d'extrait des branches de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

III.5.2.3 Test DPPH pour les feuilles de *Silybum marianum* (L.) :

On prépare dix échantillons à différentes concentrations partir de 0.1 mg/ml à 1 mg/ml des feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.). Ensuite, on prépare le blanc éthanol 70°, et le contrôle de la solution DPPH avec le solvant éthanol. On utilise le test DPPH à partir de cette concentration de l'extrait, on obtient les résultats dans le (tableau III-14) Suivant :

L'absorption de solution DPPH avec le solvant éthanol est égale $A_{t_0} = 1.268$.

Enfin, on obtient les résultats dans le tableau dans annexe :

On utilise les valeurs de cette tableau pour tracer la courbe d'effet d'extrait des feuilles de *Silybum marianum* (L.) sur le radical DPPH (% IP on fonction des concentrations). On fait l'operations trois fois, on obtient **Tableau III-17** et les trois courbes suivantes **Figure III-25**, **Figure III-26**, **Figure III-27**.

L'équation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.) représentés dans annexe.

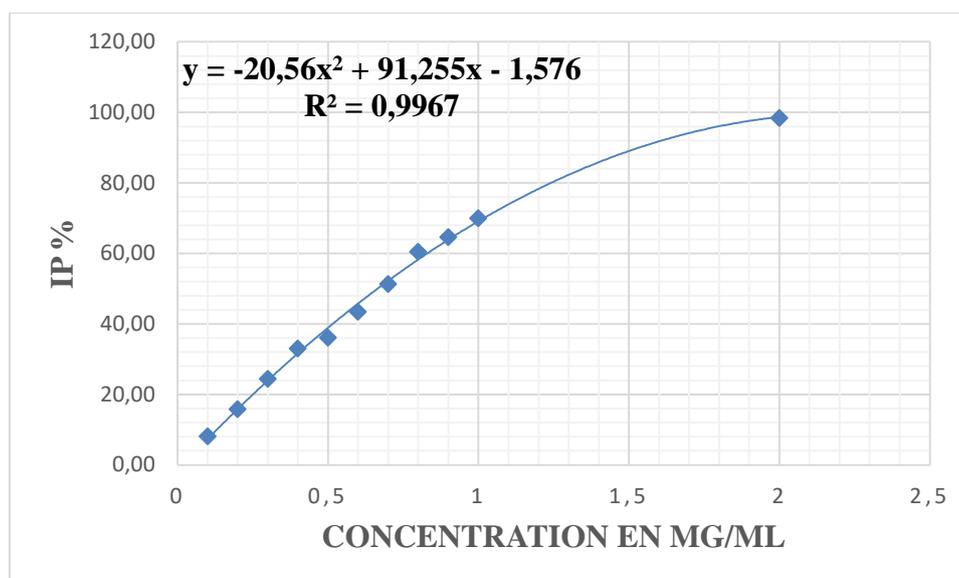


Figure III-25. Première expérience d'effet d'extrait des feuilles de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

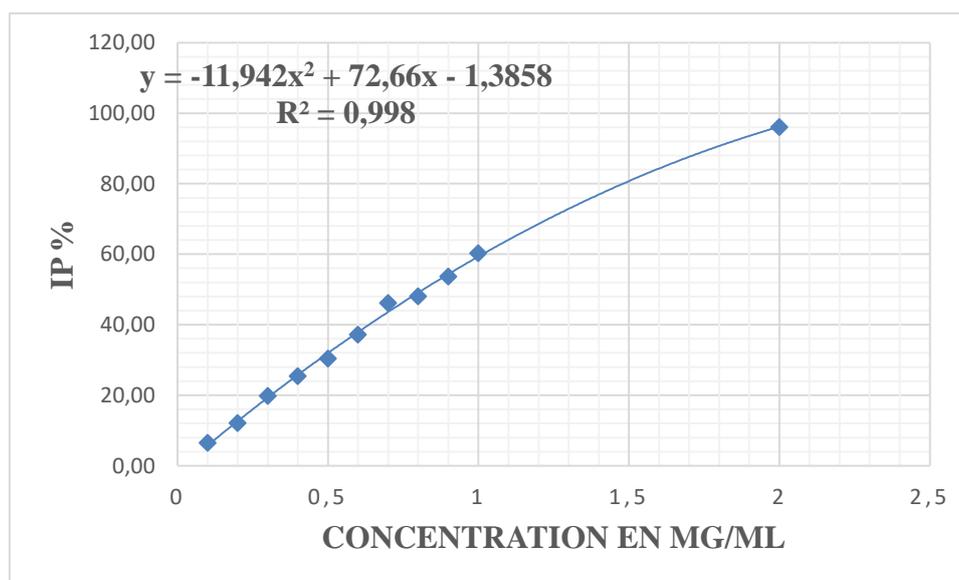


Figure III-26. Deuxième expérience d'effet d'extrait des feuilles de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

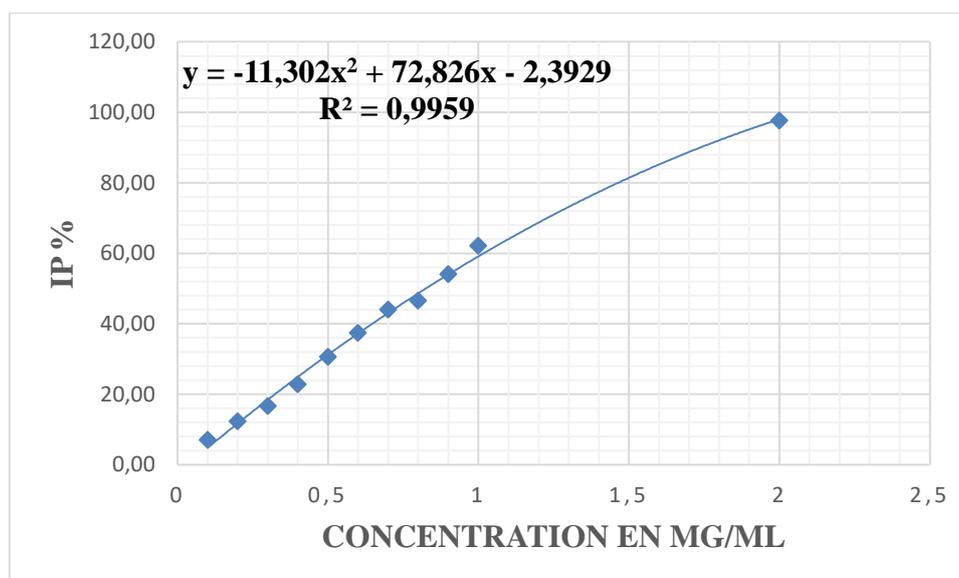


Figure III-27. Troisième expérience d'effet d'extrait des feuilles de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

III.5.2.4. Test DPPH pour les grains de *Silybum marianum* (L.) :

On prépare dix échantillons à différentes concentrations partir de 0.1 mg/ml à 1 mg/ml des grains de la plante *Silybum marianum* (L.). Ensuite, on prépare le blanc éthanol 70°, et le contrôle de la solution DPPH avec le solvant éthanol. On utilise le test DPPH à partir de cette concentration de l'extrait on obtient les résultats dans le (tableau III-14) Suivant :

L'absorption de solution DPPH avec le solvant éthanol est égale $A_{t_0} = 1.268$.

Enfin, on obtient les résultats dans le tableau dans annexe :

On utilise les valeurs de cette tableau pour tracer la courbe d'effet d'extrait des grains de *Silybum marianum* (L.) sur le radical DPPH (% IP en fonction des concentrations). On fait l'opération trois fois on obtient **Tableau III-19** et les trois courbes suivantes **Figure III-28**, **Figure III-29**, **Figure III-30**.

L'équation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des grains de la plante *Silybum marianum* (L.) représentés dans annexe.

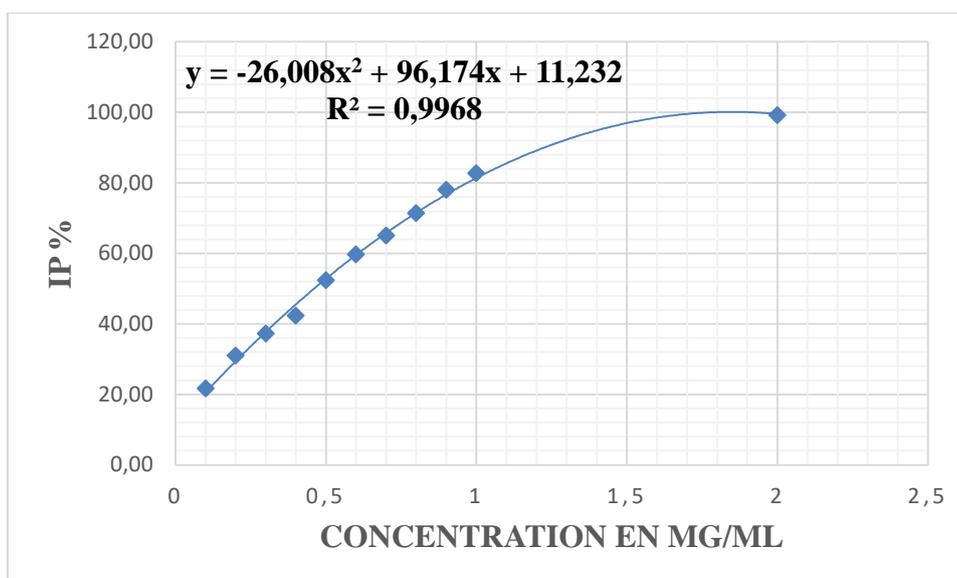


Figure III-28. Première expérience d'effet d'extrait des grains de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

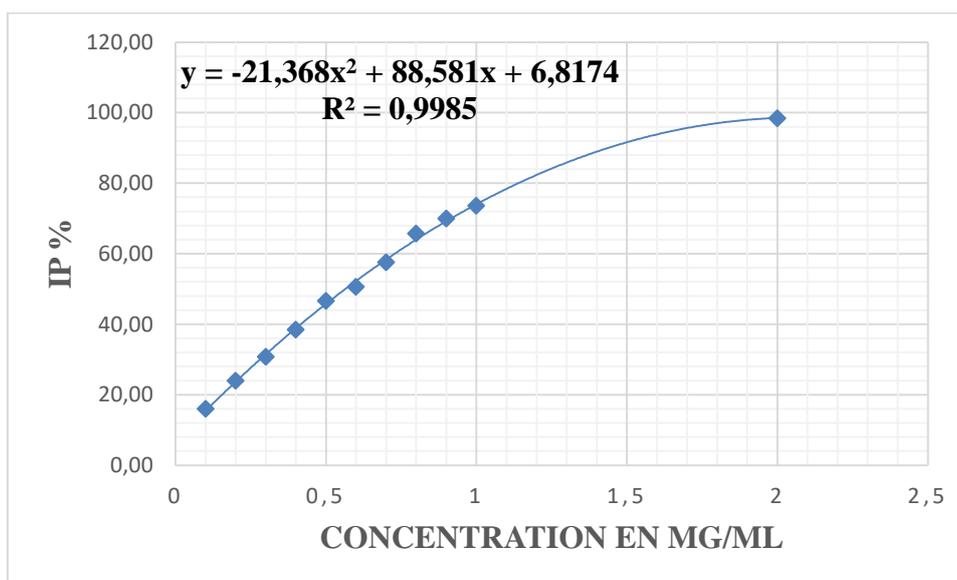


Figure III-29. Deuxième expérience d'effet d'extrait des grains de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

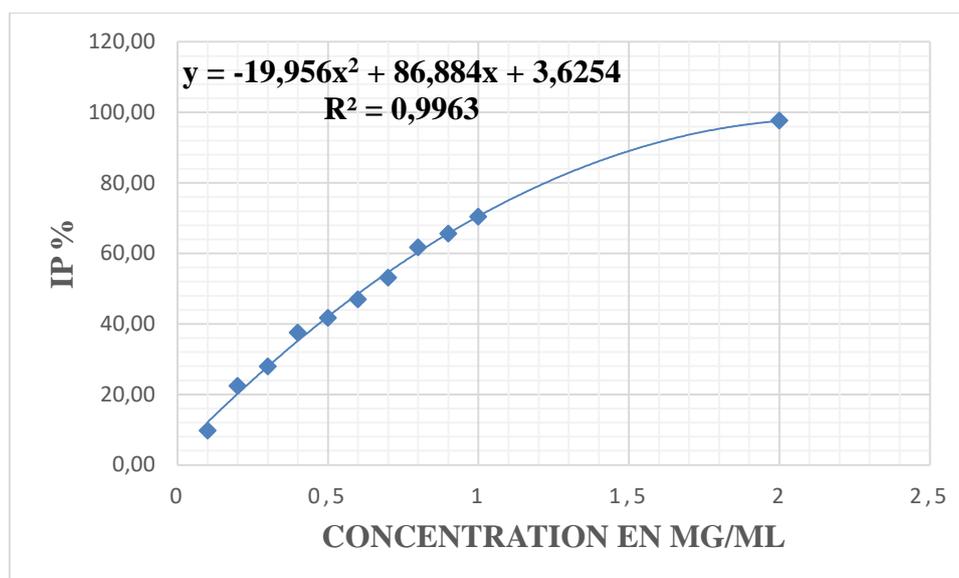


Figure III-30. Troisième expérience d'effet d'extrait des grains de *Silybum marianum* (L.), sur le radical DPPH.

III.5.2.5. Courbe d'étalonnage pour Le test DPPH

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe d'étalonnage pour Le test DPPH l'acide ascorbique. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9958$

Figure III-31. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent l'Acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg AAS /g Ms).

Pour tracer cette courbe on utilise treize échantillons à différentes concentrations de l'acide ascorbique avec l'éthanol absolu (0.02, 0.04, 0.05, 0.065, 0.07, 0.08, 0.09,..... 0.035) mg de l'acide ascorbique / ml de l'éthanol. Dans annexe : (tableau III-17 Annexe)

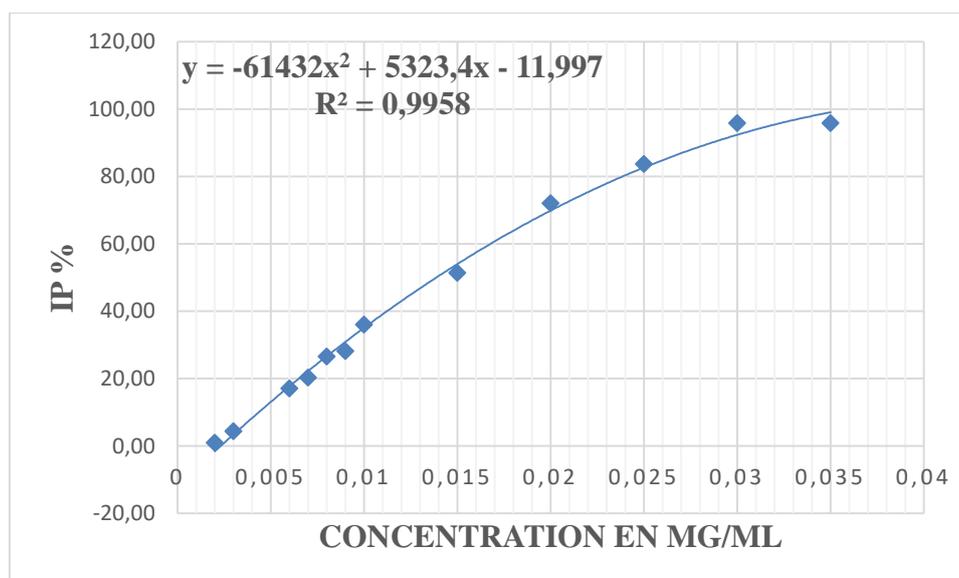


Figure III-31. Effet de l'acide ascorbique sur le radical DPPH.

L'équation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des de l'acide ascorbique. Représentés dans annexe.

III.6. Activité antioxydante FRAP :

L'Activité antioxydante FRAP des extraits est évaluée par la méthode de travail à déterminer le pouvoir réducteur de l'extrait de la plante *Silybum marianum* L. Ce pouvoir réducteur a été étudié en observant les transformations de Fe^{+3} à Fe^{+2} [40].

III.6.1 Préparation des solvants de méthode :

On prépare la solution tampon acétate (PH = 3,6 / 3 mM), pour la préparer la solution tampon on prépare d'abord la solution acide Acétique (C = 0,2 M) dans l'eau distillée et la solution acétate de sodium (C = 0,2 M) dans l'eau distillé a volume (90 à 10) pour réglais le PH = 3,6 , on prépare la solution TPTZ (C = 10 mM) dans un milieu acide HCL (C = 40 mM), on prépare la solution $FeCl_3$ (C = 20 mM) dans un milieu acide HCL (C = 40 mM). On prend 25 ml de la solution tampon acétate (PH = 3.6, 3 mM), 2,5 ml de la solution TPTZ (C = 10 mM), 2,5 ml de la solution $FeCl_3$ (C = 20 mM), et 3 ml de l'eau distillée.

III.6.2 Mode opératoire :

On prend 0,03 ml de chaque extrait des chaque échantillons est mélangé avec 0,970 ml de solution, de mélange obtenu a gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 593 nm contre un blanc qui contient de d'éthanol 70° avec 0,970 ml de solution de mélange obtenu[41].

III.6.3 Courbe d'étalonnage pour la méthode d'antioxydante FRAP :

Le FeSO_4 a été utilisé comme étalon à différentes concentrations, La teneur en capacité antioxydante est exprimée en milligramme d'équivalent FeSO_4 par gramme d'extrait. Le taux de capacité antioxydante des extraits ont été obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique. Pour préparer le FeSO_4 , on utilise un milieu d'acide H_2SO_4 , sur différentes concentration de FeSO_4 à H_2SO_4 , on utilise le même protocole, on obtient de différentes absorptions des résultats obtenus dans le tableau dans annexe :

On prend les résultats de (tableau III-19), et on trace la courbe d'étalonnages de FeSO_4 à H_2SO_4 en fonction de l'absorption, on obtient les résultats dans la **Figure III-32** suivant :

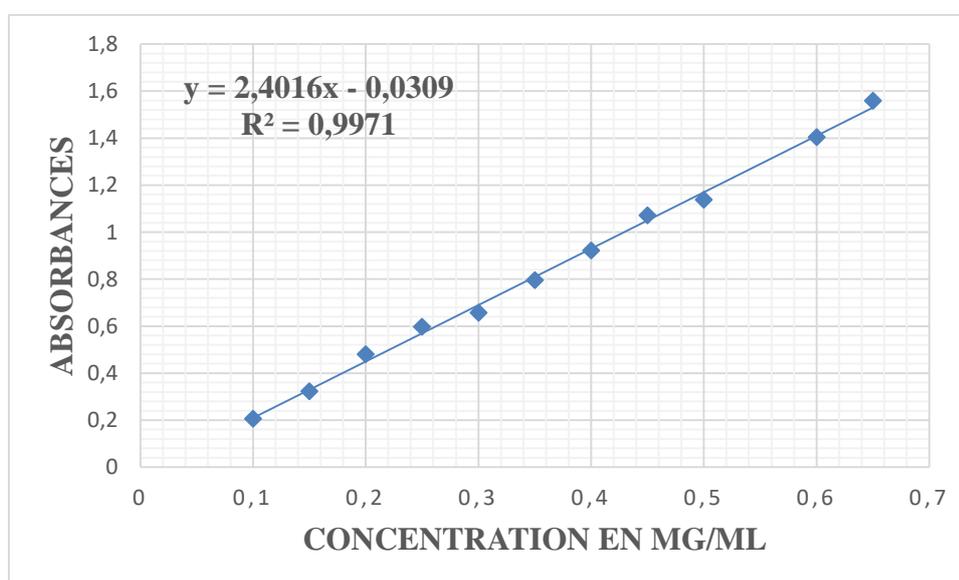


Figure III-32. Courbe d'étalonnage de FeSO_4 à H_2SO_4 .

III.7. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La HPLC est un moyen très flexible et simple d'isoler et d'identifier les différents composés d'un mélange[42].

La HPLC peuvent être assez largement décrite par des théories communes. Un fluide appelé phase mobile traverse une colonne qui contient une phase solide (silices, silices fondues, silice greffées).

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplée à un enregistreur permet d'obtenir un trace appelé chromatogramme[43].

III.7.1. Appareillage

Les différentes parties constituant l'HPLC sont décrites ci-dessous :

- **Pompe** : une pompe est alimentée à partir des plusieurs flacons contenant des solvants de polarités différentes permet d'effectuer une programmation des solvants pour assurer un système de gradient.
 - En mode isocratique : 100% d'un mélange du même éluant tout au long de l'analyse,
 - En mode gradient, la concentration des constituants du mélange d'éluant varie en fonction du temps.
- **Injecteur** : c'est une vanne d'injection qui porte une boucle d'échantillonnage.
- **Colonne** : elle contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse.
 - La phase normale :
Dans le cas d'une chromatographie en phase normale, la silice est greffée par des groupements polaires et l'éluant utilisée est apolaire.
 - La phase inverse :
Dans le cas de la phase inverse, la silice est greffée par des chaînes carbonées linaires (C8, C18 et l'éluant utilisé est polaire (ACN (acétonitrile), Et OH).
- **Détecteur** : un détecteur UV-visible à longueur d'onde variable (190-400 nm) qui permet de détecter les différents composés contenus dans l'échantillon à analyser. Notons qu'il est important que les produits à détecter portent un chromophore qui absorbe dans cette plage de longueur d'onde. Le principe de fonctionnement de l'HPLC est schématisé ci-dessous.
- **Les solvants**
L'équilibre en adsorption est un phénomène de compétition. Les molécules de la phase mobile entrent en compétition avec les molécules de solutés pour les sites polaires d'adsorption (séparation liquide-solide). Plus l'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire est forte moins l'adsorption du produit en solution sera importante. Les solvants sont donc classés selon leur force qui va dans le même sens que leur polarité.

III.7.2. Analyse par HPLC des composés phénoliques

III.7.2.1 Chromatogrammes HPLC d'extrait des feuilles de *Silybum marianum* (L.) :

Les résultats de la séparation des différents extraits de la feuille de *Silybum marianum* (L.). Par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectres suivants **Figure III-33** :

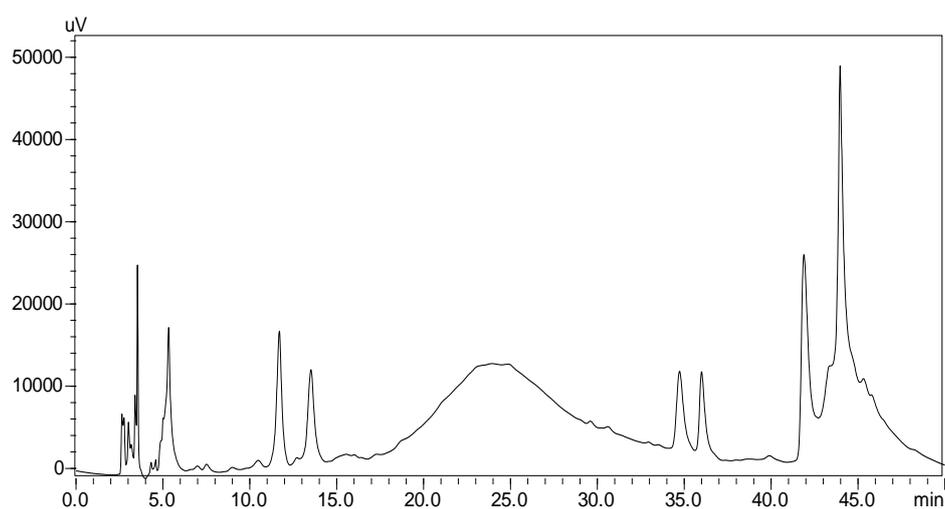


Figure III-33. Profil chromatographique HPLC des feuilles de *Silybum marianum* (L.).

III.7.2.2 Chromatogrammes HPLC d'extrait des branches de *Silybum marianum* (L.) :

Les résultats de la séparation des différents extraits de la branche de *Silybum marianum* (L.). Par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectres suivants **Figure III-34** :

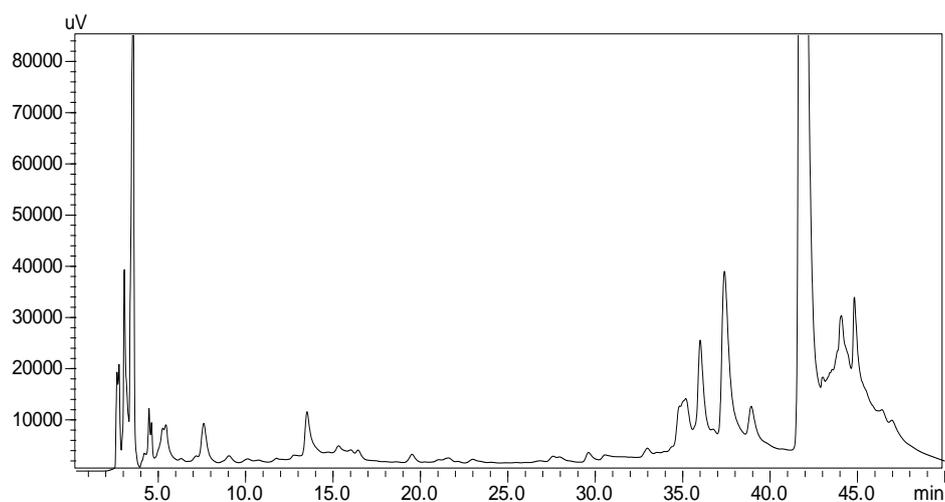


Figure III-34. Profil chromatographique HPLC des branches de *Silybum marianum* (L.).

III.7.2.3. Chromatogrammes HPLC d'extrait des Fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.).

Les résultats de la séparation des différents extraits de la plante *Silybum marianum* (L.). Par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectres suivants **Figure III-35** :

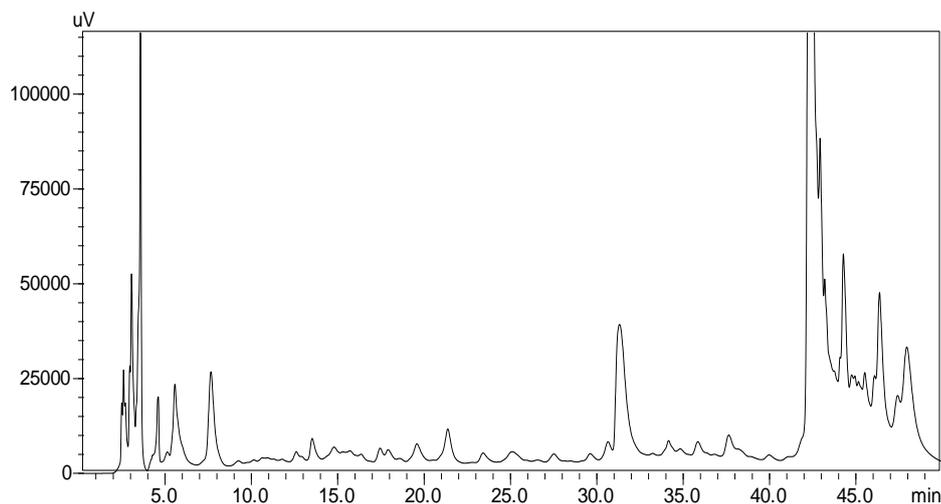


Figure III-35. Profil chromatographique HPLC des Fleurs plante *Silybum marianum* (L.).

III.7.2.4. Chromatogrammes HPLC d'extrait de grains la plante *Silybum marianum* (L.). :

Les résultats de la séparation des différents extraits de grains de la plante *Silybum marianum* (L.) par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectre suivant **Figure III-36** :

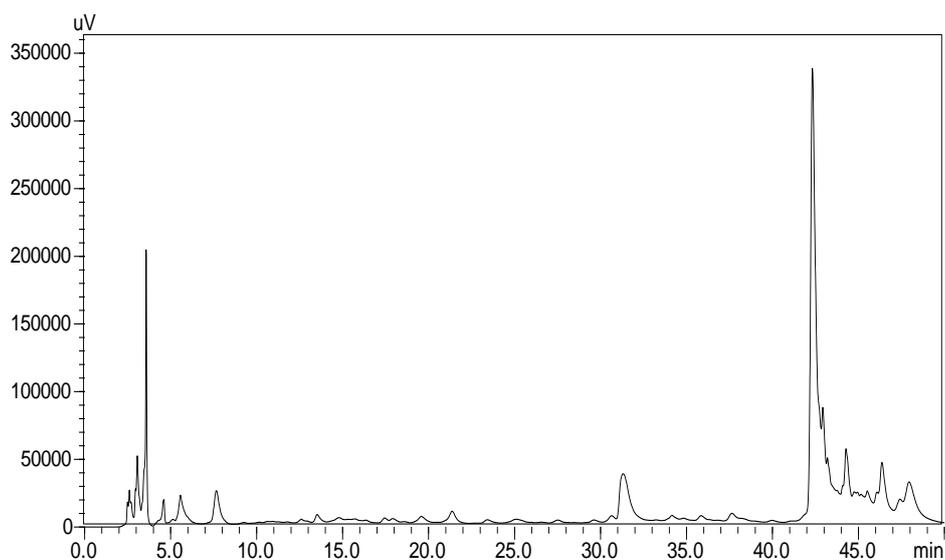


Figure III-36. Profil chromatographique HPLC des grains plante *Silybum marianum* (L.).

III.8. Spectrophotométrie IR :

La spectrophotométrie infrarouge est une technique qui permet d'identifier la nature et les groupes fonctionnels des composés des liquides, des solides, des gaz, des poudres, des fibres, des films ou des surfaces. Elle s'intéresse à la caractérisation des groupements fonctionnels présents dans une molécule. L'analyse du faisceau infrarouge permet de détecter un certain nombre de bandes d'absorption qui correspondent aux modes de vibrations caractéristiques des divers groupements contenus dans les substances analysées. Le spectre infrarouge constitué par l'ensemble de ces bandes représente alors l'empreinte digitale de molécule[44].

III.8.1. Principe de la machine IR

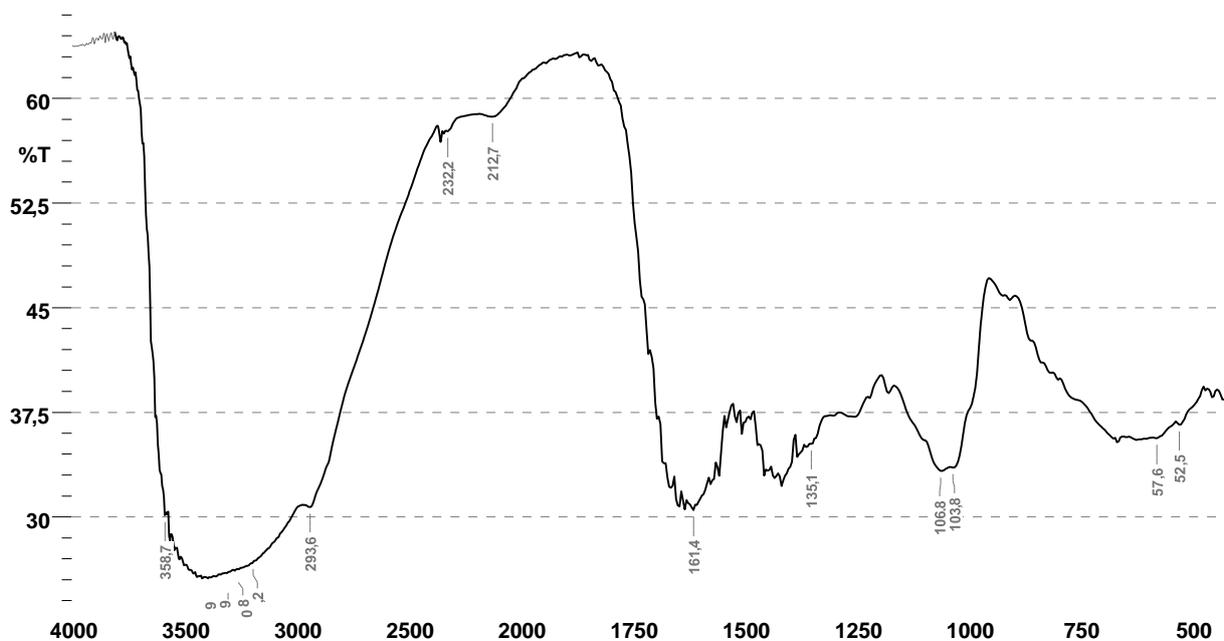
Le principe de cette spectroscopie est l'examen des radiations absorbées par l'échantillon permet d'identifier les transitions entre niveaux d'énergie et d'en déduire des informations sur la structure de la molécule, utilisé pour déterminer la composition d'un échantillon (fonction chimique)[45].

III.8.2 Préparation des échantillons :

Matériel destiné à la confection des échantillons solides. Quelque mg composé à analyser sont mélangés avec plusieurs centaines de mg de KBr transparent en IR.

III.8.3. Analyses structurales des échantillons de Plante de *Silybum marianum* (L.).

III.8.3.1. Analyses structurales des échantillons des feuilles de *Silybum marianum* (L.).



Fuguer III-37. Spectre de FT-IR des feuilles de *Silybum marianum* (L.).

III.8.3.2. Analyses structurales des échantillons des branches de *Silybum marianum* (L.).



Figure III-38. Spectre de FT-IR des branches de *Silybum marianum* (L.).

III.8.3.3. Analyses structurales des échantillons des fleurs de *Silybum marianum* (L.).

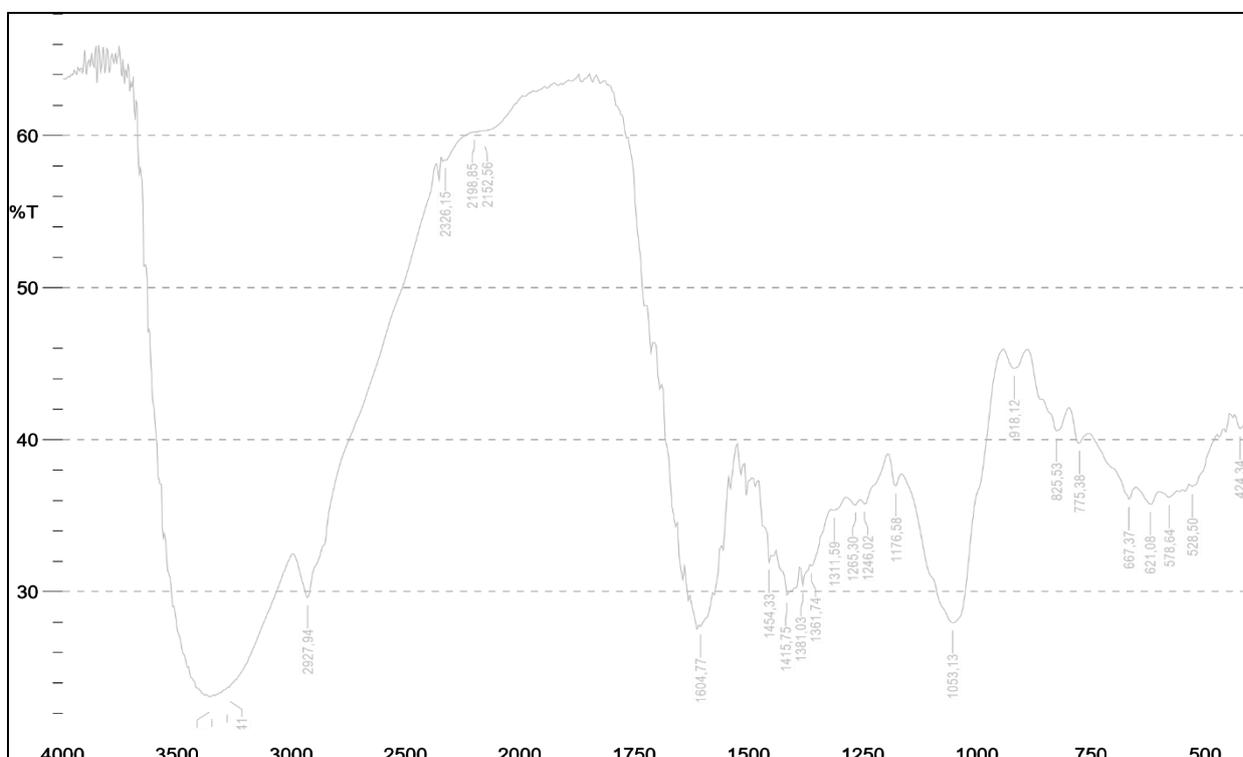


Figure III-39. Spectre de FT-IR des fleurs de *Silybum marianum* (L.).

III.6.3.4. Analyses structurales des échantillons des grains de *Silybum marianum* (L.).

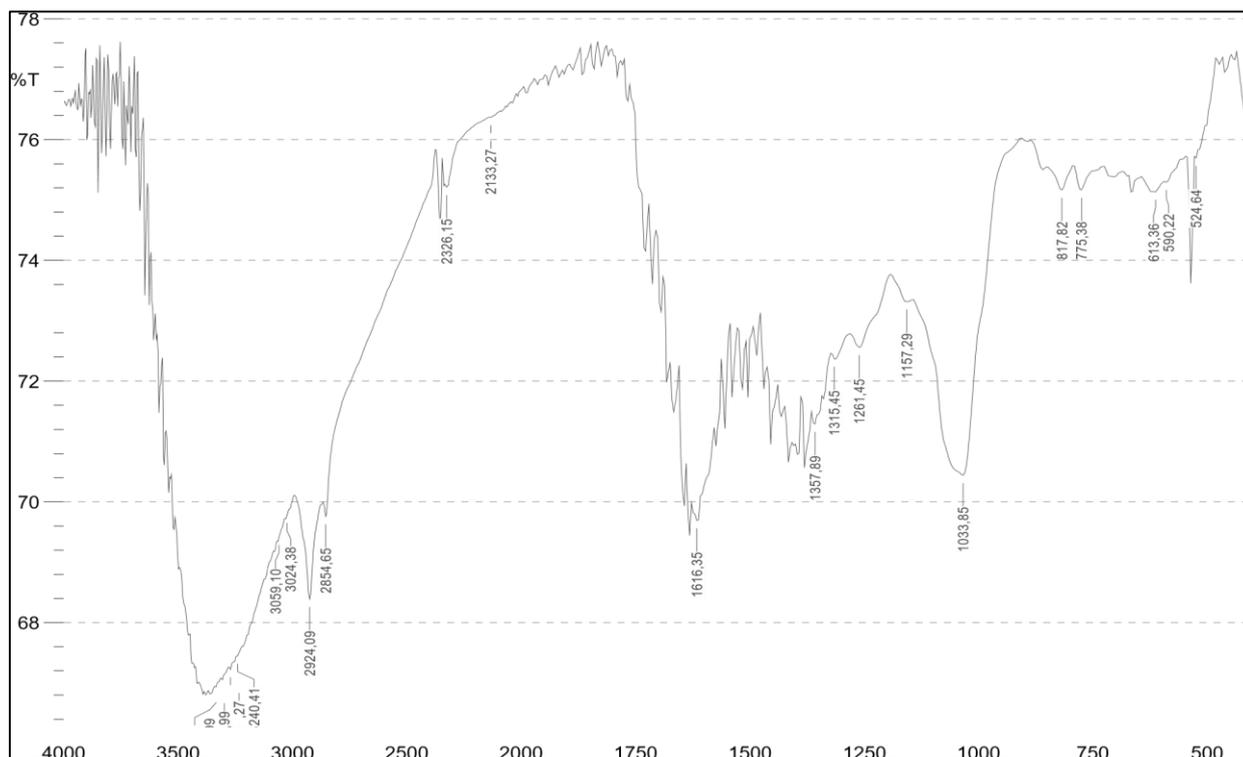


Figure III-40. Spectre de FT-IR des grains de *Silybum marianum* (L.).

III.9. Evaluation de l'activité antibactérienne :

III.9.1. Méthode de diffusion en milieu gélose (méthode des disques) :

➤ Définition :

L'aromatogramme ou méthode par diffusion en gélose ou encore méthode de disques dite méthode de [46] [Vincent] en rapport par [47], est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une substance réputée antibactérienne. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des extraits à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide.

➤ Principe :

Elle consiste de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour d'une source d'antibiotique déposée à la surface de la gélose [48, 49].

➤ Les échantillons :

Dans ce travail, l'éthanol a été utilisé comme solvant d'extraction et de conservation des extraits obtenus. Il a été utilisé, également comme témoin dans les tests antibactériens de ces extraits. Et on utilise trois antibiotiques GEN 10, on prépare cinq concentrations à différentes extrait avec éthanol (5 mg / ml, 10 mg / ml, 30 mg / ml, 50 mg / ml, 100 mg / ml.). Cinq

concentrations des chaque échantillon. Quatre échantillons des feuilles, les branches, les fleurs, les grains de la plante *Silybum marianum* (L.).

III.9.2. Provenance des souches :

- **Bactérie :** Sept souches collection internationale ATCC (American type culture collection) Sont utilisées dans cette étude. Ce sont des souches préservées au niveau du l'institut de Pasteur, qui sont largement rencontrées dans divers pathologies l'homme.

Tableau III-04. Souches bactériennes testées pour l'activité antibactérienne.

N°	Souches	Codes	Abbreviations
B1	Salmonella	ATCC 44300	Sa
B2	Salmonella enterica serovar Typhi	ATCC 14028	Sa.typhi
B3	Escherichia coli	ATCC 25922	E.coli
B4	Candida albicans	ATCC 10231	M ₃
B5	Bacillus subtilis	ATCC 6633	B.s
B6	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	Pa
B7	Liseria monocytogenes	ATCC 13932	Lm

➤ Milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés pour réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits de plante.

➤ Préparation d'inoculum

Cette manipulation comporte les étapes suivantes :

1. – Prélever à l'aide d'une anse de platine une colonie bactérienne bien isolée.
2. – Transvaser le contenu de l'ose dans une boîte de pétri contenant 20 ou 25 ml de milieu nutritif stérile.
3. – Incuber par la suite les boîtes de pétri à essai à 37°C pendant 24 h.

➤ Préparation des disques

1. – Préparer les disques de papier filtre de 6 mm de diamètre (Whatman N° 1).
2. – Stériliser les disques à l'autoclave, à 120°C pendant 60 minutes.

➤ Test d'activité antibactérienne

1. – Couler dans les boîtes de pétri une quantité de gélose nutritive équivalente à 20 ou 25ml.
2. – Laisser les boîtes entrouvertes devant la flamme jusqu'à complète solidification.

3. – Déposer quelques gouttes de la suspension bactérienne (inoculum) sur la surface de la Gélose, puis étaler à l'aide un râteau.
4. – S'assurer que la surface de la gélose est bien séchée.
5. – Déposer à l'aide d'une pince stérile les disques (4 à 5 disques par boîte), imprégnés d'extrait végétal, sur la surface de la gélose.
6. – Placer les boîtes de pétri à basse température (+4°C) pendant 15 à 30 min afin de permettre aux extraits de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier.
7. – Retirer les boîtes du réfrigérateur et les placer à l'étuve, à la température optimale de croissance du germe à étudier (37°C) pendant 24 h. Les boîtes doivent être placées couvercle en bas.

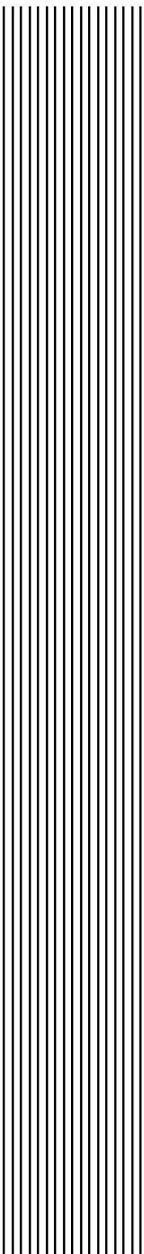
Afin d'évaluer précisément l'activité antibactérienne de ces extraits, procéder un test préliminaire antibactérien de ce solvant vis-à-vis des germes étudiés (mêmes étapes précédentes).

Lecture des résultats

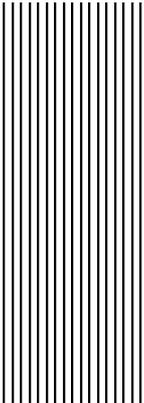
Après 24 heures d'incubation, mesurer à l'aide d'une règle graduée le diamètre d'inhibition des bactéries autour des disques. Le diamètre (mm) de la zone entourant le disque est proportionnel à la sensibilité du germe étudié.

Tous les résultats sont exprimés en termes de zone d'inhibition[50].

- 6 mm inactive.
- 6.6 à 9 mm activités très basses.
- 9 à 12 mm activités basses.
- 12 à 15 mm activités moyennes.
- 12 à 25 mm activités élevées.



Références bibliographiques

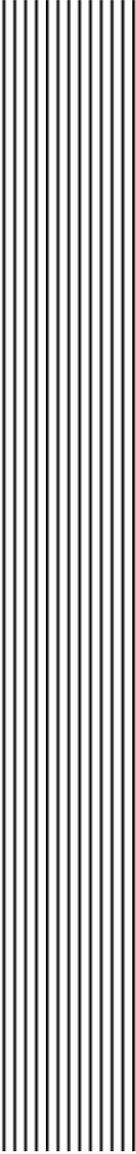


- [1] Y. Chavan, R. S. J. I. f. s. Singhal, and e. technologies, "Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology," vol. 17, pp. 106-113, 2013.
- [2] C. Yogita, R. J. I. F. S. Singhal, and E. Technologies, "Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology," vol. 17, pp. 106-113, 2013.
- [3] V. Vadivel, J. Cheong, and H. J. L. Biesalski, "Antioxidant and type II diabetes related enzyme inhibition properties of methanolic extract of an underutilized food legume, *Canavalia ensiformis* (L.) DC: Effect of traditional processing methods," vol. 47, no. 2, pp. 255-260, 2012.
- [4] V. Vadivel, C. N. Kunyanga, H. K. J. F. Biesalski, and B. Technology, "Antioxidant potential and type II diabetes-related enzyme inhibition of *Cassia obtusifolia* L.: effect of indigenous processing methods," vol. 5, no. 7, pp. 2687-2696, 2012.
- [5] B. Mbaebie, H. Edeoga, and A. J. A. P. J. o. T. B. Afolayan, "Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq," vol. 2, no. 2, pp. 118-124, 2012.
- [6] L. Lagnika, "Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises," Strasbourg 1, 2005.
- [7] A. Aktumsek, G. Zengin, G. O. Guler, Y. S. Cakmak, A. J. F. Duran, and c. toxicology, "Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species," vol. 55, pp. 290-296, 2013.
- [8] A. Kumaran, R. J. J. L.-F. S. Karunakaran, and Technology, "In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India," vol. 40, no. 2, pp. 344-352, 2007.
- [9] S. Agrawal, C. Katare, and G. J. G. J. M. S. Prasad, "Antioxidant activity, total phenolic compound and flavonoid content of vacuum dried extract of *L. siceraria*," vol. 4, pp. 302-8, 2015.
- [10] D. Jaiswal *et al.*, "Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidative stress," vol. 6, no. 6, pp. 426-432, 2013.
- [11] K.-E. Hwang *et al.*, "Effect of gamma-ray, electron-beam, and X-ray irradiation on antioxidant activity of mugwort extracts," vol. 186, p. 109476, 2021.
- [12] N. Jaggi *et al.*, "Impact of an international nosocomial infection control consortium multidimensional approach on central line-associated bloodstream infection rates in adult intensive care units in eight cities in India," vol. 17, no. 12, pp. e1218-e1224, 2013.

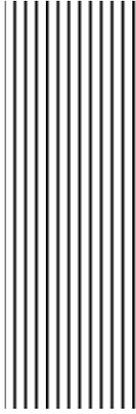
- [13] Y. V. Chavan, R. S. J. J. o. t. S. o. F. Singhal, and Agriculture, "Separation of polyphenols and arecoline from areca nut (*Areca catechu* L.) by solvent extraction, its antioxidant activity, and identification of polyphenols," vol. 93, no. 10, pp. 2580-2589, 2013.
- [14] V. L. Singleton, J. A. J. A. j. o. E. Rossi, and Viticulture, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents," vol. 16, no. 3, pp. 144-158, 1965.
- [15] H. Gardner and S. J. E. p. Moran, "The science of multiple intelligences theory: A response to Lynn Waterhouse," vol. 41, no. 4, pp. 227-232, 2006.
- [16] L. J. E. p. Waterhouse, "Inadequate evidence for multiple intelligences, Mozart effect, and emotional intelligence theories," vol. 41, no. 4, pp. 247-255, 2006.
- [17] C. Cherniss, M. Extein, D. Goleman, and R. P. J. E. p. Weissberg, "Emotional intelligence: what does the research really indicate?," vol. 41, no. 4, pp. 239-245, 2006.
- [18] F. H. Rauscher and S. C. J. E. P. Hinton, "The Mozart effect: Music listening is not music instruction," vol. 41, no. 4, pp. 233-238, 2006.
- [19] B. N. J. a. p. a. Jayawiguna, "A Nonsingular Kerr-Sen Black Hole," 2020.
- [20] B. N. J. a. p. a. Jayawiguna, "Three Dimensional Black Hole in the Low Energy Heterotic String Theory," 2020.
- [21] D. Vaishnav and B. R. Rao, "Comparison of machine learning algorithms and fruit classification using orange data mining tool," in *2018 3rd International Conference on Inventive Computation Technologies (ICICT)*, 2018, pp. 603-607: IEEE.
- [22] M. Záková, V. Podpecan, F. Zelezný, and N. J. P. n. I. W. T. G. D. M. T. S.-O. K. D. Lavrac, "Advancing data mining workflow construction: A framework and cases using the orange toolkit," pp. 39-52, 2009.
- [23] B. Zupan and J. J. C. i. l. m. Demsar, "Open-source tools for data mining," vol. 28, no. 1, pp. 37-54, 2008.
- [24] G. Leban, M. Mramor, B. Zupan, J. Demšar, and I. Bratko, "Finding Patterns in Class-Labeled Data Using Data Visualization," in *Data Mining Patterns: New Methods and Applications*: IGI Global, 2008, pp. 106-123.
- [25] N. J. U. A. B. B.-T. Benhammou, Algérie: Thèse de Doctorat, "Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien," vol. 30, 2012.
- [26] N. Belyagoubi-Benhammou, "Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien," Thèse Doctorat, UNIV, Tlemcen, Algérie, 2012.

- [27] A. Ardestani, R. J. F. Yazdanparast, and c. toxicology, "Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycooxidation," vol. 45, no. 12, pp. 2402-2411, 2007.
- [28] A. Ardestani and R. J. 생. 춘. Yazdanprast, "Others; Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycooxidation," vol. 2007, pp. 438-438, 2007.
- [29] D. Shahwar and M. A. J. A. P. j. o. t. b. Raza, "Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*," vol. 2, no. 7, pp. 547-550, 2012.
- [30] W. Brand-Williams, M.-E. Cuvelier, C. J. L.-F. s. Berset, and Technology, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," vol. 28, no. 1, pp. 25-30, 1995.
- [31] C. J. F. s. Sánchez-Moreno and t. international, "Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems," vol. 8, no. 3, pp. 121-137, 2002.
- [32] C. S.-M. J. F. s. González and t. i. C. y. t. d. a. internacional, "Methods used to evaluate the free radical sacavenging activity in foods and biological systems," vol. 8, no. 3, pp. 121-137, 2002.
- [33] Q.-F. Zhang, Y.-X. Guo, X. Shangguan, G. Zheng, and W.-J. J. F. C. Wang, "Antioxidant and anti-proliferative activity of *Rhizoma Smilacis Chinae* extracts and main constituents," vol. 133, no. 1, pp. 140-145, 2012.
- [34] A. Gepdiremen, "Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F," 2004.
- [35] İ. Gülçin, V. Mshvildadze, A. Gepdiremen, and R. J. P. m. Elias, "Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F," vol. 70, no. 06, pp. 561-563, 2004.
- [36] P. J. S. J. s. t. Molyneux, "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity," vol. 26, no. 2, pp. 211-219, 2004.
- [37] V. Roginsky and E. A. J. F. c. Lissi, "Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food," vol. 92, no. 2, pp. 235-254, 2005.
- [38] S. Dziri *et al.*, "Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*)," vol. 4, no. 2, pp. 423-432, 2012.
- [39] C. Popovici, I. Saykova, and B. Tylkowski, "Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH," 2010.
- [40] D. A. Boutlelis, "Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L," Université Badji Mokhtar de Annaba, Département de Biologie, 2014.

- [41] M. Rivero-Pérez, P. Muniz, M. J. F. González-Sanjosé, and C. Toxicology, "Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine," vol. 46, no. 8, pp. 2815-2822, 2008.
- [42] L. Panaiva, "Techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites," in *Conférence Eurocopter Marseille, France, 2006*, vol. 3.
- [43] W. Ghnimi, "Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase," Université de Lorraine, 2015.
- [44] C. KENOZ, "EXTRACTION ET SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ESPÈCE *CENTAUREA MONTANA*," 2020.
- [45] D. Bertrand and E. Dufour, *La spectroscopie infrarouge*. Lavoisier, 2006.
- [46] H. Ferkous, H. Laredj, R. Mechri, S. Benterki, and A. Chefrou, "Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'armoise rouge: *Artemisia campestris* L., de la région de Tébessa."
- [47] F. Guemari, S. E. Laouini, A. Rebiai, and A. J. A. J. o. R. i. C. Bouafia, "Phytochemical screening and Identification of Polyphenols, Evaluation of Antioxidant activity and study of Biological properties of extract *Silybum marianum* (L.)," vol. 13, no. 3, pp. 190-197, 2020.
- [48] G. Bolou, B. Attioua, A. N'guessan, A. Coulibaly, J. N'guessan, and A. J. B. d. l. s. r. d. s. d. L. Djaman, "Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*," vol. 80, pp. 772-790, 2011.
- [49] S. Benkherara, O. Bordjiba, and A. B. J. P. Djahra, "Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*," vol. 13, no. 1, pp. 14-18, 2015.
- [50] M. Küçük, S. Kolaylı, Ş. Karaoğlu, E. Ulusoy, C. Baltacı, and F. J. F. C. Candan, "Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia," vol. 100, no. 2, pp. 526-534, 2007.



Chapitre IV :
Résultats et discussions



IV.1. Résultats et discussions des PPT, FVT et FLT:

IV.1.1 Résultats et discussions des Polyphénols totaux pour les quatre échantillons :

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits des quatre échantillons de la variété *Silybum marianum* (L.) étudié, sont représentés ci-dessous dans le Tableau : IV-01, et la figure : IV-01.

Tableau IV-01 : Polyphénols totaux dans les quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.).

Extrait	La concertation	Polyphénols 1	Polyphénols 2	Polyphénols 3
Les feuilles	0.5 mg /ml	23.25	22.47	21.05
Les branches	1 mg /ml	9	9.09	9.06
Les fleurs	0.5 mg /ml	40.11	42.31	44.25
Les grains	0.2 mg /ml	127.01	126.20	128.96
Les feuilles		22,25 ± 1,11		
Les branches		9,05 ± 0,04		
Les fleurs		42,22 ± 2,07		
Les grains		127,39 ± 1,41		

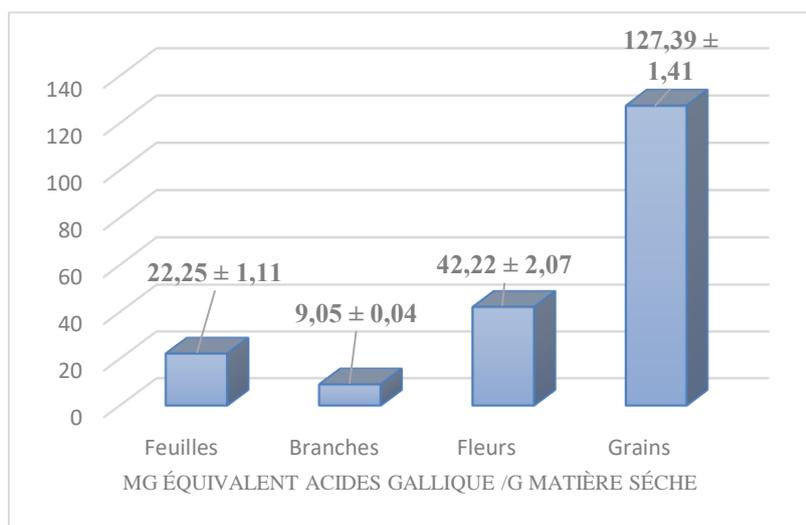


Figure IV-01. Pourcentage des Polyphénols totaux dans les quatre extraits de la plante.

Dans cette composition nous trouvons que l'extrait des grains est quantitativement plus riche en composés phénoliques $127,39 \pm 1,41$ (mg EAG/ g MS), puis l'extrait de fleurs $42,22 \pm 2,07$ (mg EAG/ g MS), puis l'extrait de feuilles $22,25 \pm 1,11$ (mg EAG/ g MS), et en fin l'extrait de branche $9,05 \pm 0,04$ (mg EAG/ g MS) de la plante *Silybum marianum* (L.).

IV.1.2 Résultats et discussions des Flavonoïdes totaux pour les quatre échantillons :

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits des quatre échantillons de la variété *Silybum marianum* (L.) étudié, sont représentés ci-dessous dans le Tableau : IV-02, et la figure : IV-02.

Tableau IV-02 : Flavonoïdes totaux dans les quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.).

Extrait	La concertation	Flavonoïdes 1	Flavonoïdes 2	Flavonoïdes 3
Les feuilles	1 mg /ml	18,98	19,40	19,86
Les branches	3 mg /ml	2,71	2,77	2,74
Les fleurs	1 mg /ml	34,57	33,91	33,70
Les grains	1 mg /ml	17,60	18,41	18,98
Les feuilles			19,41 ± 0,44	
Les branches			2,74 ± 0,03	
Les fleurs			34,06 ± 0,45	
Les grains			18,33 ± 0,70	

Dans cette composition, nous trouvons que l'extrait de fleurs de *Silybum marianum* (L.). Le plus riche en flavonoïdes $34,06 \pm 0,45$ (mg EQE /g Ms), puis l'extrait de feuilles $19,41 \pm 0,44$ (mg EQE /g Ms), puis l'extrait de grains $18,33 \pm 0,70$ (mg EQE /g Ms) et en fin l'extrait des branches $2,74 \pm 0,03$ (mg EQE /g Ms) de *Silybum marianum* (L.).

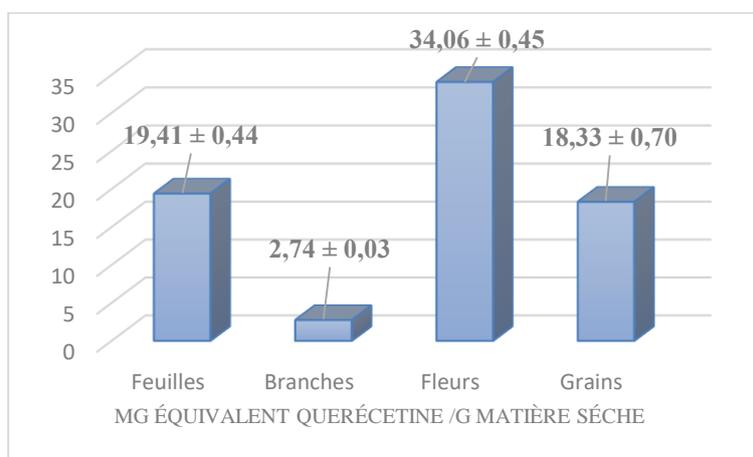


Figure IV-02. Pourcentage des Flavonoïdes totaux dans les quatre extraits de la plante *Silybum marianum* (L.).

IV.1.3 Résultats et discussions des Flavanols totaux pour les quatre échantillons :

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits des quatre échantillons de la variété *Silybum marianum* (L.) étudié, sont représentés ci-dessous dans le Tableau : IV-03, et la figure : IV-03.

Tableau IV-03 : Flavanols totaux dans les quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.).

Extrait	La concertation	Flavanol 1	Flavanol 2	Flavanol 3
Les feuilles	2 mg /ml	17,74	17,99	18,24
Les branches	12 mg /ml	2,60	2,65	2,69
Les fleurs	5 mg /ml	14,34	14,06	14,50
Les grains	5 mg /ml	13,50	13,72	14,06
Les feuilles			17,99 ± 0,25	
Les branches			2,65 ± 0,05	
Les fleurs			14,30 ± 0,22	
Les grains			13,76 ± 0,28	

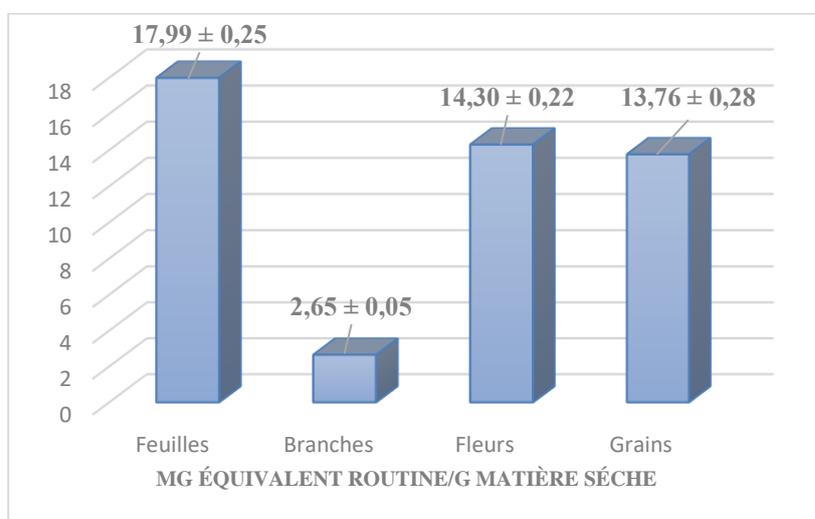


Figure IV-03. Pourcentage des Flavanols totaux dans les quatre extraits de la plante.

Dans cette composition, nous trouvons que l'extrait de feuilles de *Silybum marianum* (L.) le plus riche en flavanol $17,99 \pm 0,25$ (mg ER/g Ms), puis l'extrait de fleurs $14,30 \pm 0,22$ (mg ER/g Ms), puis l'extrait de grains $13,76 \pm 0,28$ (mg ER/g Ms) et en fin l'extrait des branches $2,65 \pm 0,05$ (mg ER/g Ms) de *Silybum marianum* (L.).

IV.2. Résultats et discussions pour ancienne et nouvelle méthode

IV.2.1. Résultats de Test de vérification :

Les résultats obtenus dans le cadre du programme se trouvent dans le tableau IV-4, et les concentrations préparées manuellement et les concentrations calculées dans le cadre du programme sont mentionnées dans le tableau IV-5 suivant :

Tableau IV-4 : Résultats obtenus dans les deux mélanges.

<i>Désignations</i>	<i>Acide Gallique</i>		<i>Quercétine</i>		<i>Rutine</i>	
	216	218	216	218	216	218
λ_{\max} in (nm)						
Mélange	1	2	1	2	1	2
Concentration ⁽²⁾ (mg / ml)	0.0825	0.1067	0.0365	0.0399	0.0540	0.0660
Absorbance (nm)	3.986	3.976	3.986	3.976	3.986	3.976

Concentration ⁽²⁾ : Concentration calculée par un logiciel orange en mg / ml.

Absorbance (nm) : Absorbance des mélanges 1 et 2 en λ_{\max} de GA et Qer et Ru en (nm)

Le tableau IV-6 nous montre la grande convergence des résultats entre les deux mélanges préparés en laboratoire et les résultats calculés par la nouvelle méthode, ce qui signifie le succès du test de vérification de notre nouvelle méthode.

Méthodes ODMT : Ethanol 70 °, Gallique Acid : $R^2 = 0.989$, Quercetin $R^2 = 0.996$, Rutin $R^2 = 0.978$.

IV.2.2. Discussion de Test de vérification :

On remarque que les concentrations obtenues par nouvelles méthodes et presque égale à la concentration préparée manuelle dans les deux mélange préparée. **Tableau IV-5**

Tableau IV-5 : Comparaison des résultats des deux méthodes.

<i>Désignations</i>	<i>Mélange 1 (µg/ml)</i>		<i>Mélange 2 (µg/ml)</i>	
	<i>Méth Manuelle</i>	<i>Méth ODMT</i>	<i>Méth Manuelle</i>	<i>Méth ODMT</i>
<i>Acide Gallique</i>	23.3	20.7	26.6	26.8
<i>Quercétine</i>	6.6	9.1	10	10
<i>Rutine</i>	13.3	13.5	16.6	16.6

À titre d'exemple :

$(0.0825/3.986) \times 1000 = 20.7 \mu\text{g/ml}$ Concentration of Gallique Acid in mélange 1.

$(0.1067/3.976) \times 1000 = 26.83 \mu\text{g/ml}$ Concentration of Gallique Acid in mélange 2.

IV.2.3. Analyse phytochimique quantitative en laboratoire pour ancienne méthode

Les résultats de cette expérience sont répétés un an après la première expérience de la précision de la comparaison.

Les résultats de l'estimation des polyphénols totaux ont montré que le niveau le plus élevé de polyphénols a été enregistré dans l'extrait des fleurs avec une valeur de $31,17 \pm 3,70$ mg GAE / g DW, puis l'extrait des feuilles à $20,14 \pm 2,60$ mg GAE / g DW, puis enfin l'extrait des branches à $8,24 \pm 0,62$ mg GAE / g DW. Les résultats sont présentés dans le tableau IV-06.

Tableau IV-06. Pourcentage d'extraction, contenu en polyphénols des trois échantillons d'une plante *Silybum marianum* (L.).

The samples of the plant	Polyphénol mg GAE/g DW
Feuilles	20.14 ± 2.60
Branches	8.24 ± 0.62
Fleurs	31.17 ± 3.70

IV.2.4. Analyse phytochimique quantitative en laboratoire pour nouvelle méthode

Tableau IV-7. Concentrations obtenues dans le cadre du programme et valeurs d'absorptions maximales pour les trois échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.) (Nouvelle et traditionnelle).

The Feuilles of the plant <i>Silybum marianum</i> (L.)							
Concentration ⁽¹⁾ (mg / ml)	0.025	0.05	0.075	0.1	0.25	0.5	1
Concentration ⁽²⁾ (mg / ml)	0.0022	0.0044	0.0071	0.0089	0.0139	0.0651	0.1471
Absorbance a $\lambda_{\max} = 216$ nm	0.197	0.385	0.586	0.741	1.876	3.795	3.847
The Branches of the plant <i>Silybum marianum</i> (L.)							
Concentration ⁽¹⁾ (mg / ml)	0.025	0.05	0.075	0.1	0.25	1	1.5
Concentration ⁽²⁾ (mg / ml)	0.0007	0.0008	0.0011	0.0018	0.0043	0.0205	0.0434
Absorbance à $\lambda_{\max} = 216$ nm	0.082	0.158	0.238	0.330	0.850	3.857	3.662
The Fleurs of the plant <i>Silybum marianum</i> (L.)							
Concentration ⁽¹⁾ (mg / ml)	0.025	0.05	0.075	0.1	0.2	0.5	0.75
Concentration ⁽²⁾ (mg / ml)	0.0030	0.0064	0.0094	0.0135	0.0203	0.0881	0.1374
Absorbance à $\lambda_{\max} = 216$ nm	0.219	0.411	0.627	0.811	1.606	3.724	4.000

Concentration⁽¹⁾ : Concentration de l'extrait d'échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.) qui en préparation manuelle (mg / ml).

Concentration⁽²⁾ : Concentration de l'extrait d'échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.) qui peut être calculée dans le logiciel ODMT (mg/ml).

Absorbance (nm) : Absorbance de l'extrait des échantillons de Feuilles, Branches, Fleurs, de la plante *Silybum marianum* (L.) en λ_{\max} d'acide gallique en (nm).

IV.2.5. Discussion de Test de vérification :

Afin de calculer la valeur des polyphénols, nous calculons tous les résultats du tableau de la même manière, puis nous calculons la moyenne. Les résultats sont présentés dans le **Tableau IV-8** suivant :

Tableau IV-8. Comparaison de la teneur totale en polyphénols dans les feuilles, les branches et les fleurs par deux méthodes (nouvelle et traditionnelle)

<i>Samples</i>	<i>Polyphénol (mg GAE/g DW)</i>	
	<i>Méthode Réaction</i>	<i>Méthode ODMT</i>
<i>Feuilles</i>	<i>20.14 ± 2.60</i>	<i>15.65 ± 10.34</i>
<i>Branches</i>	<i>8.24 ± 0.62</i>	<i>6.55 ± 2.67</i>
<i>Fleurs</i>	<i>31.17 ± 3.70</i>	<i>20.07 ± 9.27</i>

IV.2.6. Discussion et conclusion de la nouvelle méthode :

Dans ce travail, nous avons pu déterminer la valeur de chacune des concentrations d'acide gallique, de quercétine et de rutine dans deux mélanges différents contenant une quantité estimée en microgrammes de chaque échantillon calculée manuellement, puis entré dans le logiciel Orange pour prédire la concentration car nous n'avons compris que les valeurs obtenues à partir du programme sont presque correctes à 100%. Bien que nous ayons utilisé une très petite quantité, ce qui nous a ouvert la voie pour étudier les trois échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.), qui sont les feuilles, les branches et les fleurs. Dans cette expérience, nous avons voulu estimer le pourcentage de polyphénols dans les trois échantillons de la plante de *Silybum marianum* (L.), car nous n'avons pas incubé aussi bien le rapport de convergence entre les deux résultats. Le premier résultat obtenu par la méthode de réaction chimique Singleton et la méthode Rossi. Le deuxième résultat obtenu par la méthode du programme Orange est la méthode de Fathi et al, telle que présentée dans ce document. Par conséquent, à partir de cette recherche, nous pouvons dire que nous pouvons déterminer la valeur des polyphénols dans n'importe quelle plante que nous voulons étudier, et comme nous l'avons dit dans l'introduction, nous pouvons déterminer la valeur des polyphénols. Avec une très petite quantité de l'échantillon, comme nous n'avons pas besoin de plus d'un milligramme de chaque échantillon et un seul milligramme

d'acide vous dira et une seule fois. Et donc nous pouvons Nous devrions étudier le plus grand nombre possible de plantes parce que nous n'avons besoin que d'un gramme de chaque échantillon sec, et donc le processus de séchage, le trempage, et la filtration, sont beaucoup plus rapides qu'auparavant. Et à partir de cette recherche, le champ s'est ouvert aux chercheurs à d'autres études telles que la détermination de la proportion de Flavonoïdes, de Flavanol, de dragon et chaque substance est liée aux plantes, et nous pouvons donc déterminer la valeur oxydative des plantes.

IV.3. Résultats et discussions de la Capacité antioxydante

IV.3.1. Résultats et discussions de la Capacité antioxydante totale (CAT) :

IV.3.1.1. Résultats de la Capacité antioxydante totale (CAT) :

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits des quatre échantillons de la variété *Silybum marianum* (L.), étudiées sont représentés ci-dessous dans le Tableau : IV-9, et la Figure : IV-04.

Tableau IV-9. Capacité antioxydante total des quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.).

Extrait	La concertation	Capacité 1	Capacité 2	Capacité 3
Les feuilles	1 mg /ml	69.03	75.96	69.25
Les branches	1 mg /ml	109.53	98.34	111.77
Les fleurs	1 mg /ml	73.73	73.50	67.91
Les grains	1 mg /ml	153.40	127.43	114.45
Les feuilles			71.41 ± 3.94	
Les branches			106.54 ± 7.20	
Les fleurs			71.71 ± 3.30	
Les grains			131.76 ± 19.83	

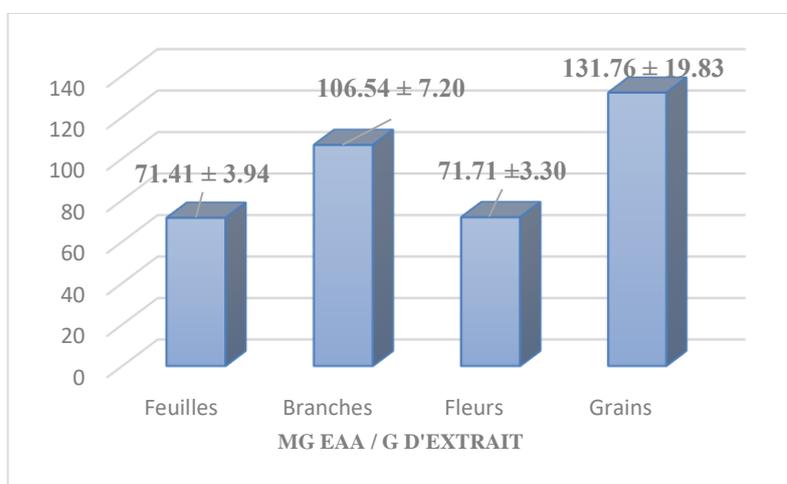


Figure IV-04. Capacité antioxydante totale des extraits des quatre échantillons.

IV.3.1.2. Discussion de la Capacité antioxydante totale (CAT) :

Le meilleur résultat de capacité antioxydante totale dans l'extrait des grains de la variété *Silybum marianum* (L.) 131.76 ± 19.83 (mg AA/g Ms). En deuxième lieu, les branches de la plante *Silybum marianum* (L.) avec capacité antioxydante totale 106.54 ± 7.20 (mg AA/g Ms). En troisième lieu, les fleurs avec capacité antioxydante totale de 71.71 ± 3.30 (mg AA/g Ms). En quatrième lieu, les feuilles avec capacité antioxydante totale de 71.41 ± 3.94 (mg AA/g Ms).

IV.3.2. Résultats et discussions d'activité antioxydante DPPH

IV.3.2.2. Résultats d'activité antioxydante DPPH

L'activité de piégeage de radical DPPH de d'extrait éthanoïque des quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.) est présentée dans les Figure IV-05. Pour l'extrait des grains, on obtient la valeur de concentration le plus moins $IC_{50} = 0.549$ mg / ml, puis l'extrait feuilles $IC_{50} = 0.768$ mg / ml, puis l'extrait des fleurs $IC_{50} = 1.055$ mg / ml, et la valeur le plus grande l'extrait des branches dans la variété de la plante de *Silybum marianum* (L.) $IC_{50} = 1.059$ mg / ml.

IV.3.2.1. discussions d'activité antioxydant DPPH

Le meilleur résultat obtenu dans les grains de la plante *Silybum marianum* (L.) par ce qu'en utilisée moins concentration pour dégradée 50 % de DPPH cette concentration est égale $C=0.549$ mg / ml. Deuxièmement, les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.) La concentration $C=0.768$ mg / ml. Troisièmement, l'extrait des fleurs $C=1.055$ mg / ml. Quatrièmement, l'extrait des branches dans la variété de la plante de. $C=1.059$ mg / ml. Figure: IV-05.

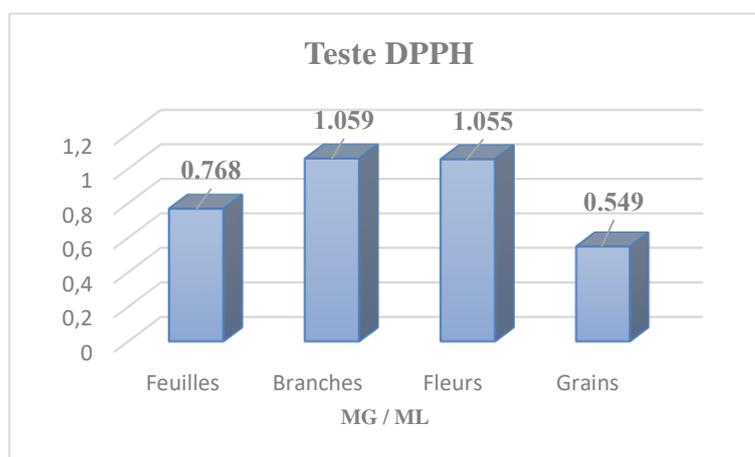


Figure IV-05. Valeurs des résultats d'activités antioxydante DPPH des extraits des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

IV.3.3. Résultats et discussions d'activités antioxydante FRAP:

IV.3.3.1. Résultats d'activités antioxydante FRAP:

Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits des quatre échantillons de la variété *Silybum marianum* (L.) étudié, sont représentés ci-dessous dans le Tableau : IV-10, et la Figure : IV-06.

Tableau IV-10 : Résultats d'activité antioxydante FRAP des quatre échantillons.

Extrait	La concertation	Activités 1	Activités 2	Activités 3
Les feuilles	1 mg /ml	102.80	97.40	101.55
Les branches	3 mg /ml	46.62	46.90	46.20
Les fleurs	3 mg /ml	67.58	69.24	69.94
Les grains	0.5 mg /ml	260.57	243.09	238.92
Les feuilles			100.58 ± 2.82	
Les branches			46.57 ± 0.35	
Les fleurs			68.92 ± 1.21	
Les grains			247.52 ± 11.48	

IV.3.3.2. Discussions d'activités antioxydante FRAP:

Le meilleur Résultats d'activités antioxydante FRAP dans l'extrait des grains de la variété *Silybum marianum* (L.) 247.52 ± 11.48 (Mg E FeSO₄/g MS), en deuxième lieu, les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.) 100.58 ± 2.82 (Mg E FeSO₄/g MS), en troisième lieu, les fleurs de 68.92 ± 1.21 (MgFeSO₄/g MS), en quatrième lieu, les branches avec de 46.57 ± 0.35 (Mg E FeSO₄/g MS).

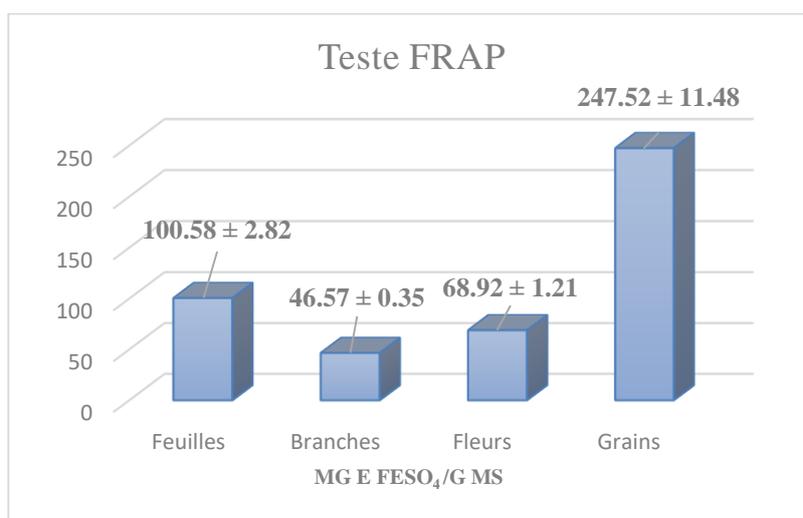


Figure IV-06. Valeurs des resultants d'activités antioxydante FRAP des extraits des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

IV.4. Résultats et discussions de la Profile chromatographique HPLC des extraits:**IV.4.1. Résultats et discussions de la Profil chromatographique HPLC des extraits des feuilles :**

Le profil chromatographique d'extrait des feuilles de *Silybum marianum* (L.) au niveau de (Figure IV-07) tandis que le résultat des analyses quantitatives sont donnés dans le tableau (IV-11), tableau (IV-15).

L'analyse de ces résultats montre que dans d'extrait des feuilles de *Silybum marianum* (L.). Rutine (17,765 μg / Ms). Et la Naringin 12215,656 μg / g Ms). On a remarqué que la Naringin représente le compose majoritaire.

Tableau IV-11. Concentration des polyphenols des extraits de feuilles de *Silybum marianum* (L.).

Composés	La Concentration (μg / g Ms)
Rutine	17,765
Naringin	12215,656

IV.4.2. Résultats et discussions de la Profil chromatographique HPLC des branches :

Le profil chromatographique d'extrait des branches de *Silybum marianum* (L.) au niveau de (Figure IV-07) tandis que le résultat des analyses quantitatives sont donnés dans le tableau (IV-12), tableau (IV-15).

L'analyse de ces résultats montre que dans d'extrait des branches de *Silybum marianum* (L.), Gallique Acid (1461,575 μg /g Ms), Et la Vanilic Acid 275,433 μg / mg Ms). Et la p-Coumaric Acid 11553,163 μg / g Ms). Et le Naringin 2801,775 μg / g Ms). On a remarqué que la p-Coumaric Acid représente le compose majoritaire.

Tableau IV-12. Concentration des polyphénols des extraits de branches de *Silybum marianum* (L.).

Composés	La Concentration (μg / g Ms)
Gallique Acid	1461,575
Vanilic Acid	275,433
p-Coumaric Acid	11553,163
Naringin	2801,775

IV.4.3. Résultats et discussions de la Profil chromatographique HPLC des Fleurs :

Le profil chromatographique d'extrait des branches de *Silybum marianum* L au niveau de (Figure IV-07) tandis que le résultat des analyses quantitatives sont donnés dans le tableau (IV-13) , tableau (IV-15).

L'analyse de ces résultats montre que dans d'extrait des Fleurs de *Silybum marianum* (L.), Gallique Acid (573,285 µg/g Ms), Et le Naringin 1804,169 µg/ g Ms). On a remarqué que la Naringin représente le compose majoritaire.

Tableau IV-13. Concentration des polyphénols des extraits de Fleurs de *Silybum marianum* (L.).

Composés	La Concentration (µg/ g Ms)
Gallique Acid	573,285
Naringin	1804,169

IV.4.4. Résultats et discussion de la Profil chromatographique HPLC des grains :

Le profil chromatographique d'extrait des grains de la plante *Silybum marianum* (L.), au niveau de (Figure IV-07) tandis que le résultat des analyses quantitatives sont donnés dans le tableau (IV-14) , tableau (IV-15).

L'analyse de ces résultats montre que dans d'extrait des grains la plante *Silybum marianum* (L.), Caffiec Acid (378,340 µg/g Ms), Et la Vanilin 1446,875 µg/ g Ms). Et la rutine 321,468 µg/ g Ms). Et la Naringin 1885,948 µg/ g Ms). Et la Quercetin 2537,101 µg/ g Ms). On a remarqué que la Quercetin représente le compose majoritaire.

Tableau IV-14. Concentration des polyphénols des grains de variété *Silybum marianum* (L.).

Composés	La Concentration (µg/ g Ms)
Caffiec Acid	378,340
Vanilin	1446,875
Rutin	321,468
Naringin	1885,948
Quercetin	2537,101

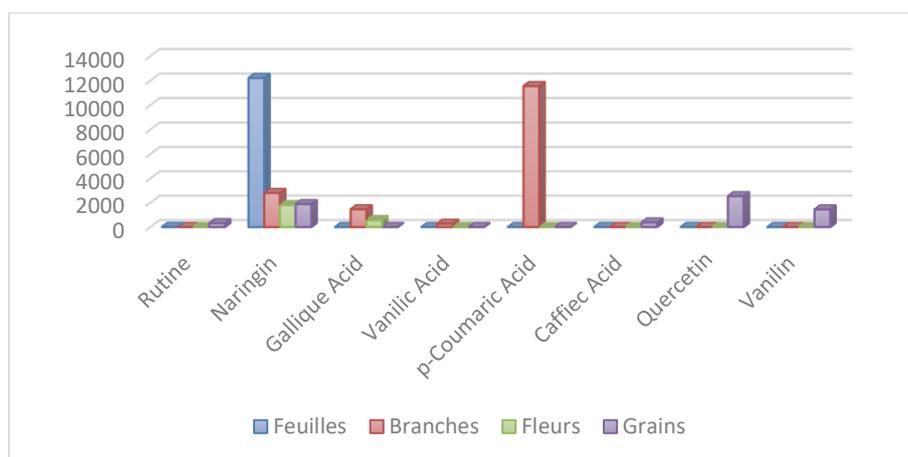


Figure IV-07. Valeurs des resultants des Concentrations des polyphénols des extraits des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

The samples of the plant	Feuilles	Branches	Roses	Grains
Rutine (µg / g MS)	17,765	-----	-----	321,468
Naringin (µg / g MS)	12215,656	2801,775	1804,169	1885,948
Gallique Acid (µg / g MS)	-----	1461,575	573,285	-----
Vanilic Acid (µg / g MS)	-----	275,433	-----	-----
p-Coumaric Acid (µg / g MS)	-----	11553,163	-----	-----
Caffiec Acid (µg / g MS)	-----	-----	-----	378,34
Quercetin (µg / g MS)	-----	-----	-----	2537,101
Vanilin (µg / g MS)	-----	-----	-----	1446,875

Tableau IV-15. Polyphénols des extraits des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

IV.5. Résultats et discussions de la d’analyse structurales pour les échantillons *Silybum marianum* (L.). Par FT-IR :

IV.5.1. Discussion d’analyses structurales pour les feuilles de variétés dès la plante *Silybum marianum* (L.). Par FT-IR :

➤ Les groupements OH alcool libres sont responsables d’une bande d’absorption aux environs de 3580-3650 cm^{-1} . Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente environ 3583.74 cm^{-1} dans le spectre dès les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.). cette bande est intense et très fine.

➤ Les groupements OH libres (de carboxyle ou phénol) sont responsables d’une bande d’absorption aux environs de 3200-3600 cm^{-1} . Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente environ 3332.99 cm^{-1} , 3305.99 cm^{-1} , 3255.84, cm^{-1} dans le spectre dès les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.). cette bande est intense et très large.

- Les groupements (C-H) ou des cycles aromatiques sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 2800 cm^{-1} - 3200 cm^{-1} ont une absorption 2935.66 cm^{-1} et 3190.26 cm^{-1} dans le spectre dès les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande d'absorption due aux groupements (aliphatiques et aromatiques), se trouve entre 2100 et 2300 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 2121.70 cm^{-1} et 2322.29 cm^{-1} dans le spectre des feuilles de variété *Silybum marianum* (L.).
- Une bande les doubles liaisons ou des cycles aromatiques (C=C) ont une absorption entre 1450 et 1690 cm^{-1} . Nous obtenons cette fonction aux environs de 1612.49 cm^{-1} dans le spectre dès les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Les groupements OH phénoliques ont une absorption importante aux environs de 1260 - 1410 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 1350.17 cm^{-1} . dans le spectre dès les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande d'absorption due aux groupements C-OH (Alcool secondaire) aux groupements C-C, se trouve entre 1010 et 1200 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 1033.85 cm^{-1} . Et une autre bande environ 1060.85 cm^{-1} . dans le spectre dès les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons aromatiques (C_{tel}-Br) a une absorption entre 500 et 600 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 528.50 cm^{-1} . Et une autre bande environ 578.64 cm^{-1} . Dans le spectre dès les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons (C_{tel}-I) à une absorption inférieure 500 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 416.62 cm^{-1} . Dans le spectre dès les feuilles de la plante *Silybum marianum* (L.).

IV.5.2. Discussion d'analyses structurales pour les branches de la plante par FT-IR :

- Les groupements OH alcool libres sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 3580 - 3650 cm^{-1} . Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente environ 3583.74 cm^{-1} dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.). cette bande est intense et très fine.
- Les groupements OH libres (de carboxyle ou phénol) sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 3200 - 3600 cm^{-1} . Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente environ 3240.41 cm^{-1} , 3305.99 cm^{-1} , 3360 cm^{-1} , dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.). cette bande est intense et très large.
- Les groupements (C-H) ou des cycles aromatiques sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 2800 cm^{-1} - 3200 cm^{-1} ont une absorption 2931.80 cm^{-1} et 3194.12 cm^{-1} dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.).

- Une bande d'absorption due aux groupements (aliphatiques et aromatiques), se trouve entre 2100 et 2300 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 2121.70 cm^{-1} dans le spectre des branches de variété *Silybum marianum* (L.).
- Une bande les doubles liaisons ou des cycles aromatiques (C=C) ont une absorption entre 1450 et 1690 cm^{-1} . Nous obtenons cette fonction aux environs de 1612.49 cm^{-1} dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Les groupements OH phénoliques ont une absorption importante aux environs de 1260-1410 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 1257.59 cm^{-1} Et une autre bande environ 1315.45 cm^{-1} . dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande d'absorption due aux groupements C-OH (Alcool secondaire) aux groupements C-C, se trouve entre 1010 et 1200 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 1029.99 cm^{-1} . dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande d'absorption due aux groupements C_{tri}-H (aromatique), se trouve entre 680 et 900 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 702.09 cm^{-1} , 779.24 cm^{-1} , 817.82, 864.11 cm^{-1} , 921.97 cm^{-1} , dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons aromatiques (C_{tel}-Cl) a une absorption entre 600 et 800 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 617.22 cm^{-1} . Dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons aromatiques (C_{tel}-Br) a une absorption entre 500 et 600 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 516.92 cm^{-1} . Et une autre bande environ 578.64 cm^{-1} . Dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons (C_{tel}-I) à une absorption inférieure 500 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 416.62 cm^{-1} . Dans le spectre dès les branches de la plante *Silybum marianum* L.

IV.5.3. Discussion d'analyses structurales pour les fleurs de *Silybum marianum* (L.). Par FT-IR

- Les groupements OH libres (de carboxyle ou phénol) sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 3200-3600 cm^{-1} . Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente environ 3267.41 cm^{-1} , 3302.13 cm^{-1} , 3332.99 cm^{-1} , 3360 cm^{-1} , dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.). cette bande est intense et très large.
- Les groupements (C-H) ou des cycles aromatiques sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 2800 cm^{-1} -3200 cm^{-1} ont une absorption 2927.94 cm^{-1} dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.).

- Une bande d'absorption due aux groupements (aliphatiques et aromatiques), se trouve entre 2100 et 2300 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 2152.56 cm^{-1} , 2198.85 cm^{-1} , 2326.15 cm^{-1} , dans le spectre des fleurs de variété *Silybum marianum* (L.).
- Une bande les doubles liaisons ou des cycles aromatiques (C=C) ont une absorption entre 1450 et 1690 cm^{-1} . Nous obtenons cette fonction aux environs de 1454.33 cm^{-1} , 1604.77 cm^{-1} , dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Les groupements OH phénoliques ont une absorption importante aux environs de 1260-1410 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 1246.02 cm^{-1} , 1265.30 cm^{-1} , 1311.59 cm^{-1} , 1361.74 cm^{-1} , 1381.03 cm^{-1} , 1415.75 cm^{-1} , dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* L.
- Une bande d'absorption due aux groupements C-OH (Alcool secondaire) aux groupements C-C, se trouve entre 1010 et 1200 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 1053.13 cm^{-1} , 1176.58 cm^{-1} , dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande d'absorption due aux groupements C_{tri}-H (aromatique), se trouve entre 680 et 900 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 775.38, 825.53 cm^{-1} , 918.12 cm^{-1} , dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons aromatiques (C_{tel}-Cl) a une absorption entre 600 et 800 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 621.08 cm^{-1} , 667.37 cm^{-1} , Dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons aromatiques (C_{tel}-Br) a une absorption entre 500 et 600 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 528.50 cm^{-1} . Et une autre bande environ 578.64 cm^{-1} . Dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons (C_{tel}-I) à une absorption inférieure 500 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 424.34 cm^{-1} . Dans le spectre dès les fleurs de la plante *Silybum marianum* (L.).

IV.5.4. Discussion d'analyses structurales pour les grains de *Silybum marianum* (L.). Par FT-IR

- Les groupements OH libres (de carboxyle ou phénol) sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 3200-3600 cm^{-1} . Cela nous laisse conclure que cette fonction est présente environ 3240.41 cm^{-1} , 3271.27 cm^{-1} , 3305.99 cm^{-1} , 3332.99 cm^{-1} , 3360 cm^{-1} , dans le spectre dès les grains de la plante *Silybum marianum* (L.). cette bande est intense et très large.
- Les groupements (C-H) ou des cycles aromatiques sont responsables d'une bande d'absorption aux environs de 2800 cm^{-1} -3200 cm^{-1} ont une absorption 2854.65 cm^{-1} , 2924.09 cm^{-1} , 3024.38 cm^{-1} , 3059.10 cm^{-1} , dans le spectre dès les grains de la plante *Silybum marianum* L.

- Une bande d'absorption due aux groupements (aliphatiques et aromatiques), se trouve entre 2100 et 2300 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 2133.27 cm^{-1} , 2326.15 cm^{-1} , dans le spectre des grains de variété *Silybum marianum* (L.).
- Une bande les doubles liaisons ou des cycles aromatiques (C=C) ont une absorption entre 1450 et 1690 cm^{-1} . Nous obtenons cette fonction aux environs de 1616.35 cm^{-1} , dans le spectre dès les grains de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Les groupements OH phénoliques ont une absorption importante aux environs de 1260-1410 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 1261.45 cm^{-1} , 1315.45 cm^{-1} , 1357.89 cm^{-1} , dans le spectre dès les grains de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande d'absorption due aux groupements C-OH (Alcool secondaire) aux groupements C-C, se trouve entre 1010 et 1200 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 1033.85 cm^{-1} , 1157.29 cm^{-1} , dans le spectre dès les grains de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande d'absorption due aux groupements C_{tri}-H (aromatique), se trouve entre 680 et 900 cm^{-1} . Cette fonction apparait environ 775.38 cm^{-1} , 817.82 cm^{-1} , le spectre dès les grains de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons aromatiques (C_{tel}-Cl) a une absorption entre 600 et 800 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 613.36 cm^{-1} , Dans le spectre dès les grains de la plante *Silybum marianum* (L.).
- Une bande liaisons aromatiques (C_{tel}-Br) a une absorption entre 500 et 600 cm^{-1} Nous obtenons cette fonction aux environs de 524.64 cm^{-1} . Et une autre bande environ 590.22 cm^{-1} . Dans le spectre dès les grains de la plante *Silybum marianum* (L.).

IV.6. Résultats et Discussions d'antibactérienne des quatre échantillons de la plante :

IV.6.1. Résultats d'antibactérienne des quatre échantillons de la plante :

Les résultats que nous avons obtenue dans les quatre échantillons à différence concentration a sept souches bactérie déférentes positif dans les quatre échantillons étudier et dans les sept souches bactérie.

IV.6.2. Discussions d'antibactérienne des quatre échantillons de la plante :

Après les résultats que nous avons obtenu les tests des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.). Des deux concentrations 100 mg/ml, 50 mg/ml, à sept souches bactéries différentes c'est-à-dire que la plante a un effet sur sept souche bactéries aux concentrations 100 mg/ml, et un effet sur la souche Escherichia coli à la concentration 50 mg/ml sur l'échantillon des fleurs mais, on choisie deux photos plus bon (Figure IV-08), (Figure IV-09), on représente les résultats de quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.). De concentration 100 mg/ml étude dans le tableau suivant : Tableau IV-16.

Tableau IV-16. Résultats d'antibactérienne des quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.).

Désignations	E C	P A	S L	M 3	L M	S A	B S
Les feuilles	00	00	07	11	08	08	00
Les branches	13	00	07	07	00	07	00
Les fleurs	15	08	07	13	13	09	07
Les grains	10	07	08	10	12	08	07

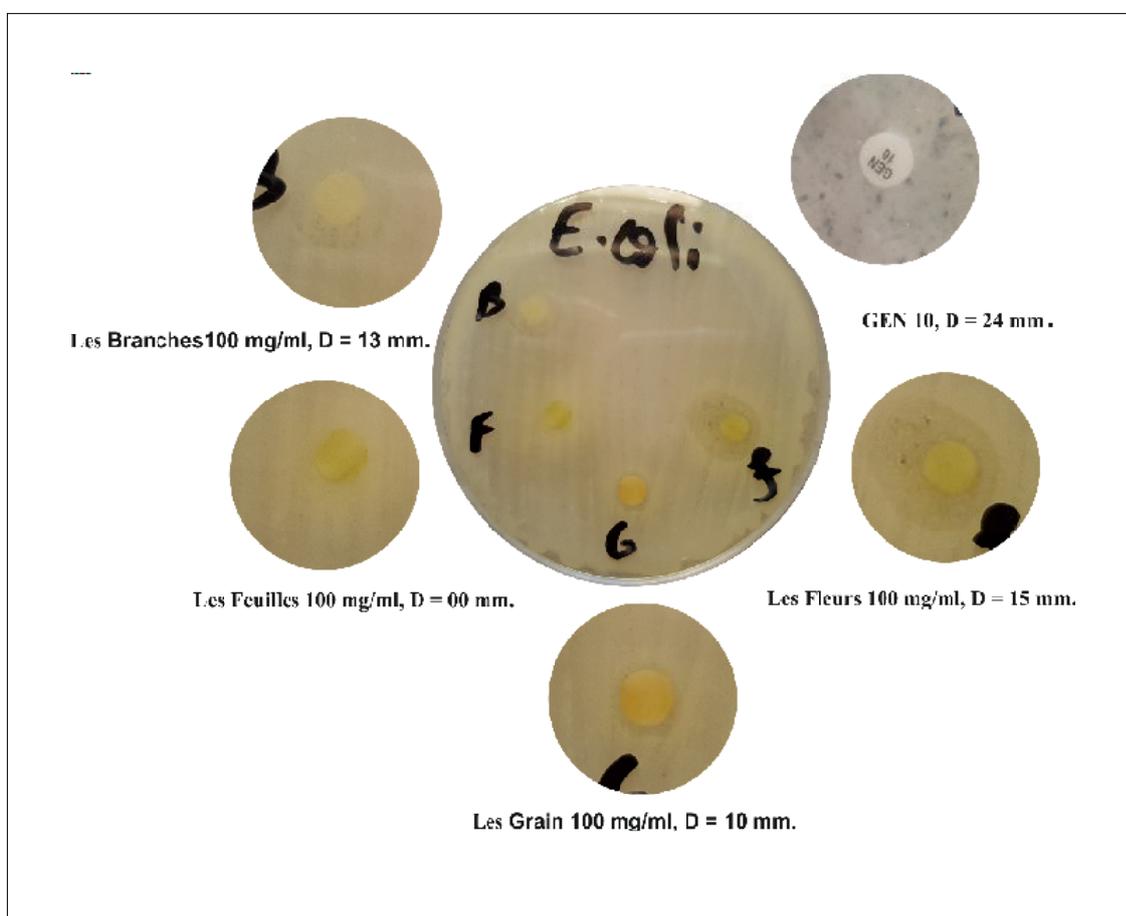


Figure IV-08. Test antibactérien de concentration 100 mg/ml bactérie EC.

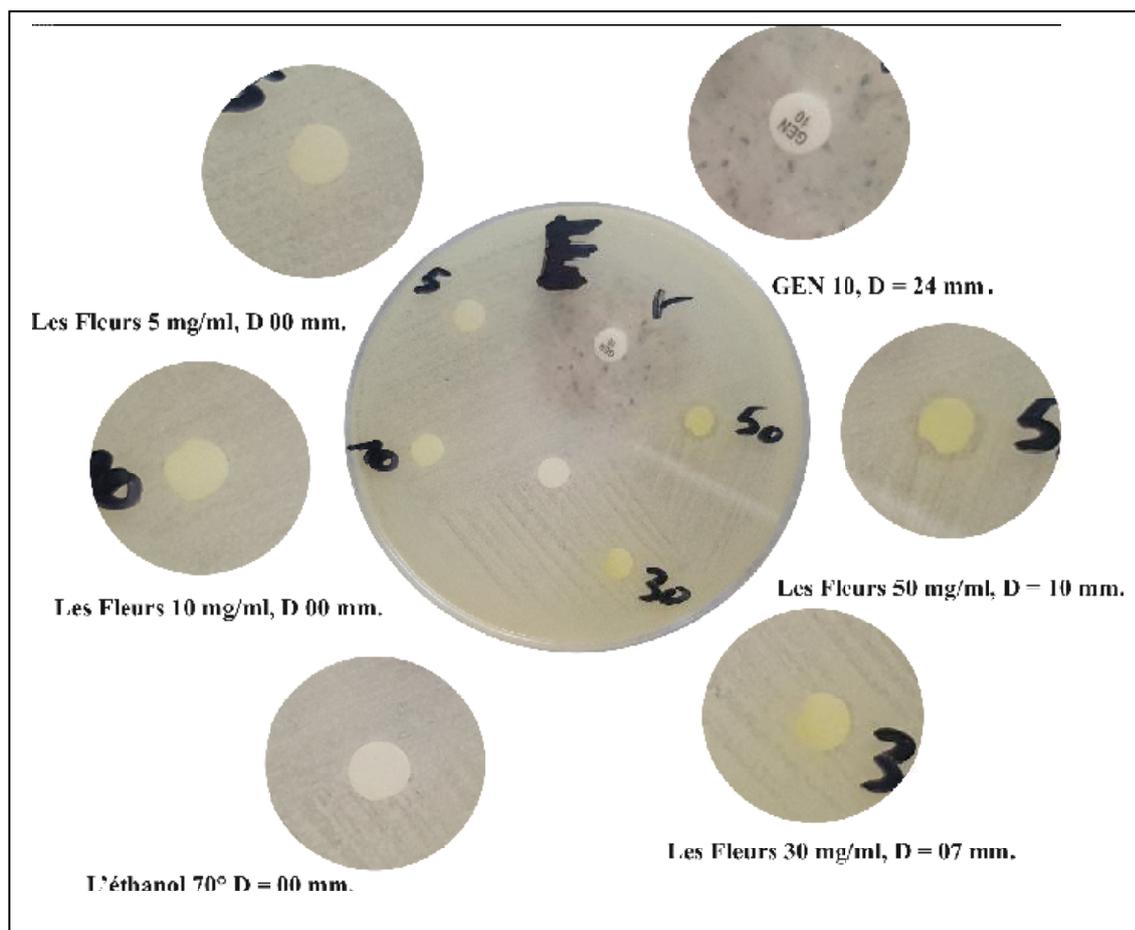


Figure IV-09. Test antibactérien des fleurs de concentration 50 mg/ml bacteria EC.

Conclusion Générale



CONCLUSION GENERALE

Ce travail a pour but de caractériser la composition photochimique des extraits des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.), et l'analyse quantitative de variété de la plante par HPLC, et d'évaluer l'activité antioxydante et l'activités antibactérienne de ces extraits de la plante *Silybum marianum* (L.).

Nous avons déterminé quantitativement dans une première analyse, la teneur en eau dans les quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.). La teneur en eau de l'ordre de 70 % à 80 % des quatre échantillons la plante *Silybum marianum* (L.).

Pour le plan phytochimique, nous caractérisons et quantifions des polyphénols, de nos extraits, on conclure que l'extrait de grains représente les meilleur résultat par rapport les autres extraits de la plante *Silybum marianum* (L.) de l'ordre de $127,39 \pm 1,41$ (mg EAG/ g MS). Nous trouvons que l'extrait de fleurs de *Silybum marianum* (L) le plus riche en flavonoïdes $34,06 \pm 0,45$ (mg EQE /g Ms), et que l'extrait de feuilles de *Silybum marianum* (L.) le plus riche en flavanol $17,99 \pm 0,25$ (mg ER/g Ms).

Dans ce travail, nous avons pu déterminer la valeur de chacune des concentrations d'acide gallique, de quercétine et de rutine dans deux mélanges différents contenant une quantité estimée en microgrammes de chaque échantillon calculée manuellement, puis entrer dans le logiciel Orange pour prédire la concentration car nous n'avons compris que les valeurs obtenues à partir du programme sont presque correctes à 100%.

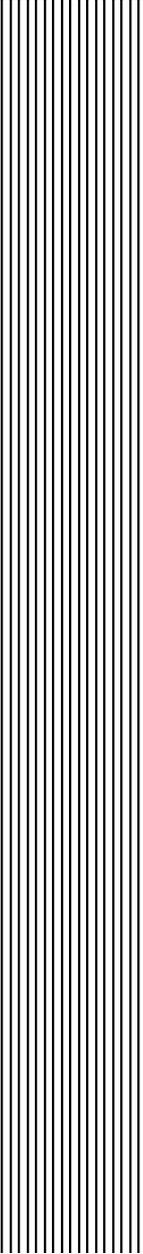
Nous avons aussi pu déterminer la valeur des trois échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.), qui sont les feuilles, les branches et les fleurs. . Dans cette expérience, nous avons voulu estimer le pourcentage de polyphénols dans les trois échantillons de la plante de *Silybum marianum* (L.), car nous n'avons pas incubé aussi bien le rapport de convergence entre les deux résultats. Le premier résultat obtenu par la méthode de réaction chimique Singleton et la méthode Rossi. Le deuxième résultat obtenu par la méthode du programme Orange est la méthode de Fathi et al.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante on conclure que l'extrait de grains représente les meilleurs résultats par rapport les autres extraits de la plante *Silybum marianum* (L.). Dans les trois méthodes utilisées dans ce travail. Capacité antioxydante totale 131.76 ± 19.83 (mg AA/g Ms), activités antioxydante DPPH $IC_{50} = 0.549$ mg / ml, activités antioxydantes FRAP 247.52 ± 11.48 (Mg E FeSO₄/g MS).

L'analyse quantitative par HPLC montre la présence de plusieurs des composés phénoliques, Rutine, Naringin, l'acide gallique, Vanilic Acid, p-Coumaric Acid, Caffiec Acid, Quercetin Vanilin, , dans les quatres échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.).

Après les résultats que nous avons obtenu dans les test des quatre échantillons de la plante *Silybum marianum* (L.). Des deux concentrations 100 mg/ml, 50 mg/ml, à sept souches bactéries différentes c'est-à-dire que la plante a un effet sur sept souche bactéries à la concentration 100 mg/ml, et un effet sur la souche Escherichia coli à la concentration 50 mg/ml sur l'échantillon les fleurs.

Notons enfin que ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans les zones arides, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et l'évaluation de leurs activités biologiques.



Annexe

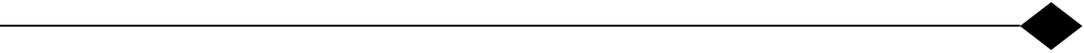
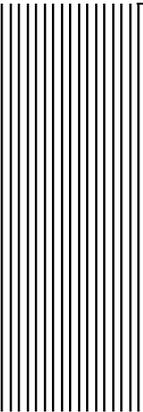


Tableau III-01. Cinétique de séchage de l'échantillon des feuilles *Silybum marianum* (L.).

Temps	0 H	1 H	2 H	4 H	5 H	6 H	9 H
Feuilles	20 g	19.13 g	18.40 g	17.12 g	16.46 g	15.87 g	14.04 g
Temps	25 H	26 H	27 H	29 H	30 H	47 H	48 H
Feuilles	6.30 g	5.94 g	5.58 g	4.92 g	4.61 g	2.52 g	2.52 g
Temps	49 H	50 H	53 H	54 H	55 H		
Feuilles	2.52 g	2.52 g	2.52 g	2.52 g	2.52 g		

Tableau III-02 : Cinétique de séchage de l'échantillon des branches *Silybum marianum* (L.).

Temps	0 H	1 H	2 H	4 H	5 H	6 H	9 H
Branches	20 g	19.18 g	18.40 g	17.10 g	16.77 g	16.10 g	14.40 g
Temps	25 H	26 H	27 H	29 H	30 H	47 H	48 H
Branches	7.15 g	6.80 g	6.41 g	5.84 g	5.51 g	2.80 g	2.75 g
Temps	49 H	50 H	53 H	54 H	55 H		
Branches	2.68 g	2.60 g	2.53 g	2.53 g	2.53 g		

Tableau III-03 : Cinétique de séchage de l'échantillon des Fleurs *Silybum marianum* (L.).

Temps	0 H	1 H	2 H	4 H	5 H	6 H	9 H
Fleurs	20 g	19.67 g	19.33 g	18.50 g	17.73 g	17.56 g	16.40 g
Temps	25 H	26 H	27 H	29 H	30 H	47 H	48 H
Fleurs	10.11 g	9.77 g	9.43 g	8.72 g	8.36 g	4.21 g	4.04 g
Temps	49 H	50 H	51 H	52 H	53 H	54 H	55 H
Fleurs	3.87 g	3.70 g	3.53 g	3.36 g	3.19 g	3.12 g	3.07 g
Temps	56 H	57 H	58 H	59 H	60 H		
Fleurs	3.03 g	3 g	3 g	3 g	3 g		

Tableau III-04 : Cinétique de séchage de l'échantillon des Grains *Silybum marianum* (L.).

Temps	0 H	1 H	2 H	4 H	5 H	6 H	9 H
Fleurs	20 g	19.73 g	19.45 g	18.76 g	18.12 g	17.99 g	17.03 g
Temps	25 H	26 H	27 H	29 H	30 H	47 H	48 H
Fleurs	11.85 g	11.57 g	11.29 g	10.70 g	10.41 g	6.99 g	6.85 g
Temps	49 H	50 H	51 H	52 H	53 H	54 H	55 H
Fleurs	6.71 g	6.57 g	6.43 g	6.29 g	6.15 g	6.09 g	6.05 g
Temps	56 H	57 H	58 H	59 H	60 H		
Fleurs	6.02 g	6 g	6 g	6 g	6 g		

Tableau III-05 : Absorption de l'acide gallique à l'éthanol à différente concentration.

Concentrations	0,007	0,008	0,009	0,01	0,015	0,02
Absorbances	0,2	0,228	0,253	0,283	0,448	0,587
Concentrations	0,025	0,03	0,035	0,040		
Absorbances	0,754	0,902	1,071	1,206		

Tableau III-06 : Absorption de quercitrine à l'éthanol à différente concentration.

Concentrations	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	0,035
Absorbances	0,342	0,490	0,648	0,817	0,972	1,141

Concentrations	0,04	0,045	0,050	0,055
Absorbances	1,300	1,430	1,608	1,780

Tableau III-07 : Absorption Quercétine à l'éthanol à différente concentration.

Concentrations	0,02	0,03	0,05	0,07	0,09	0,01
Absorbances	0,127	0,183	0,346	0,460	0,614	0,797

Tableau III-08 : Absorption de l'acide ascorbique à l'éthanol à différente concentration.

Concentrations	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
Absorbances	0,117	0,166	0,210	0,232	0,291	0,322

Concentrations	0,09	0,1
Absorbances	0,401	0,429

Tableau III-09 : Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition des Fleurs.

Con	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2	3
Abs1	1,12	1,08	1,03	0,90	0,83	0,79	0,72	0,71	0,64	0,57	0,21	0,09
Abs2	1,20	1,14	1,06	1,02	0,95	0,94	0,85	0,82	0,73	0,70	0,20	0,14
Abs3	1,25	1,1	1,11	1,05	0,99	0,95	0,89	0,86	0,78	0,76	0,23	0,08
% IP	11,1	14,5	18,5	28,7	33,8	37,2	42,9	43,6	49,2	54,8	83,6	92,9
% IP	5,28	9,62	15,6	19,2	24,8	25,3	32,7	34,7	41,9	44,6	84,1	88,9
% IP	1,10	7,10	12,2	16,6	21,6	24,7	29,5	31,7	38,0	39,9	82	93,7

Tableau III-10: Equation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des Fleurs.

L'équation	R ²	IC ₅₀
$y = -8,8461x^2 + 57,801x - 2,555$	0,9893	1,091
$y = -7,1415x^2 + 54,882x - 4,8055$	0,9934	1,179
$y = -10,235x^2 + 60,211x + 4,2848$	0,9960	0,896
Moyenne	1.055 ± 0.144 mg/ml	

Tableau III-11: Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition des branches.

Con	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2	3
Abs1	1,11	1,11	1,05	1,02	0,93	0,88	0,79	0,72	0,66	0,55	0,09	0,01
Abs2	1,23	1,18	1,13	1,08	1,02	0,97	0,90	0,82	0,74	0,69	0,14	0,09
Abs3	1,24	1,22	1,16	1,11	1,06	1,02	0,95	0,87	0,81	0,73	0,13	0,03
% IP	12,1	11,9	17,2	19,6	26,6	30,7	37,7	43,2	48,1	56,5	92,9	99,2
% IP	2,68	7,09	10,7	14,7	19,2	22,9	29,1	34,9	41,2	45,7	88,5	92,9
% IP	1,89	3,54	8,03	12,3	16,3	19,5	25,1	31,4	36,3	42,4	89,2	97,6

Tableau III-12: Equation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des branches.

L'équation	R ²	IC ₅₀
$y = -10,353x^2 + 65,265x - 1,3299$	0,9871	0,921
$y = -9,8197x^2 + 64,138x - 8,2625$	0,9866	1,090
$y = -7,857x^2 + 60,661x - 10,165$	0,9835	1,168
Moyenne	1.059 ± 0.126 mg/ml	

Tableau III-13: Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition des feuilles.

Con	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2
Abs1	1,16	1,07	0,96	0,85	0,81	0,72	0,62	0,50	0,45	0,38	0,02
Abs2	1,18	1,12	1,02	0,94	0,88	0,79	0,68	0,66	0,58	0,50	0,05
Abs3	1,18	1,11	1,05	0,98	0,88	0,79	0,71	0,68	0,58	0,48	0,03
% IP	8,1	15,8	24,4	33,0	36,1	43,4	51,2	60,5	64,6	69,9	98,42
% IP	6,5	12,2	19,8	25,5	30,4	37,2	46,1	48,1	53,7	60,3	96,06
% IP	7,0	12,3	16,6	22,8	30,6	37,4	44,0	46,5	54,1	62,1	97,63

Tableau III-14: Equation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des feuilles.

L'équation	R ²	IC ₅₀
$y = -20,56x^2 + 91,255x - 1,576$	0,9967	0,664
$y = -11,942x^2 + 72,66x - 1,3858$	0,998	0,816
$y = -11,302x^2 + 72,826x - 2,3929$	0,9959	0,825
Moyenne	0.768 ± 0.090 mg/ml	

Tableau III-15: Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition des grains.

Con	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2
Abs1	0,99	0,87	0,79	0,73	0,60	0,51	0,44	0,36	0,28	0,22	0,01
Abs2	1,06	0,96	0,88	0,78	0,67	0,62	0,54	0,43	0,38	0,33	0,02
Abs3	1,14	0,98	0,91	0,79	0,74	0,67	0,59	0,48	0,43	0,37	0,03
% IP	21,81	31,10	37,32	42,44	52,44	59,76	65,12	71,42	78,03	82,76	99,21
% IP	16,14	24,09	30,87	38,50	46,69	50,71	57,64	65,75	70,00	73,62	98,42
% IP	9,92	22,52	28,03	37,64	41,81	47,01	53,23	61,81	65,67	70,47	97,63

Tableau III-16: Equation des graphes, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition des grains.

L'équation	R ²	IC ₅₀
$y = -26,008x^2 + 96,174x + 11,232$	0,9968	0,460
$y = -21,368x^2 + 88,581x + 6,8174$	0,9985	0,564
$y = -19,956x^2 + 86,884x + 3,6254$	0,9963	0,623
Moyenne	0.549 ± 0.082 mg/ml	

Tableau III-17: Concentration et absorption et pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.

Con	0,002	0,003	0,004	0,006	0,007	0,008
Abs	1,406	1,358	1,187	1,178	1,131	1,043
% IP	0,99	4,37	16,41	17,04	20,35	26,55
0,009	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	0,035
1,020	0,908	0,690	0,396	0,231	0,058	0,058
28,17	36,06	51,41	72,11	83,73	95,92	95,92

Tableau III-18: Equation de graphe, coefficient des déterminations, pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.

L'équation	R ²	IC ₅₀
$y = -61432x^2 + 5323,4x - 11,997$	0,9958	0,014
Moyenne	0.014 ± 0.02 mg/ml	

Tableau III-19 : Absorption de FeSO₄ à H₂SO₄ à différente concentration.

Concentrations	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35
Absorbances	0,206	0,322	0,480	0,597	0,656	0,795

Concentrations	0,4	0,45	0,5	0,60	0,65
Absorbances	0,922	1,071	1,137	1,403	1,558

Tableau IV-01 : Absorption des quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.). Pour calculer les Polyphénols.

Extrait	La concertation	L'absorbance 1	L'absorbance 2	L'absorbance 3
Les feuilles	0.5 mg /ml	0.338	0.326	0.304
Les branches	1 mg /ml	0.257	0.260	0.259
Les fleurs	0.5 mg /ml	0.598	0.632	0.662
Les Grains	0.2 mg /ml	0.763	0.758	0.775

Tableau IV-02 : Absorption des quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.) Pour calculer les Flavonoïdes.

Extrait	La concertation	L'absorbance 1	L'absorbance 2	L'absorbance 3
Les feuilles	1 mg /ml	0.622	0.635	0.650
Les branches	3 mg /ml	0.276	0.282	0.279
Les fleurs	1 mg /ml	1.119	1.098	1.091
grainsLes	1 mg /ml	0.578	0.604	0.622

Tableau IV-03 : Absorption des quatre échantillons de *Silybum marianum* (L.). Pour calculer les Flavanol.

Extrait	La concertation	L'absorbance 1	L'absorbance 2	L'absorbance 3
Les feuilles	5 mg /ml	0.612	0.621	0.630
Les branches	12 mg /ml	0.200	0.204	0.208
Les fleurs	5 mg /ml	0.490	0.480	0.496
grainsLes	5 mg /ml	0.460	0.468	0.480

Tableau IV-04 : Absorption des quatre extraits de *Silybum marianum* (L.) Pour la capacité antioxydante totale.

Extrait	La concertation	L'absorbance 1	L'absorbance 2	L'absorbance 3
Les feuilles	1 mg /ml	0.289	0.320	0.290
Les branches	1 mg /ml	0.470	0.420	0.480
Les fleurs	1 mg /ml	0.310	0.309	0.284
grainsLes	1 mg /ml	0.666	0.550	0.492

Tableau IV-05 : Absorption des quatre extraits de *Silybum marianum* (L.) pour l'activité antioxydante FRAP.

Extrait	La concertation	L'absorbance 1	L'absorbance 2	L'absorbance 3
Les feuilles	1 mg /ml	0.216	0.203	0.213
Les branches	3 mg /ml	0.305	0.307	0.302
Les fleurs	3 mg /ml	0.456	0.468	0.473
grainsLes	0.5 mg /ml	0.282	0.261	0.256

Tableau IV-06 : Temps des retentions des standards des composés phénoliques.

Réf	Composant	Temps de rétentions
01	Acide gallique	5,29
02	Acide Chlorogénique	13,392
03	Acide Vanilique	15,531
04	Acide Caféique	16,277
05	Vanilique	21,46
06	Acide p-Coumarique	23,817
07	Rutine	28,37
08	Naringin	34,788
09	Quercétine	45,047

Tableau IV-07 : Equation des standards des composés phénoliques.

Réf	Composant	L'équation	R ²
01	Acide gallique	$y = 54681x$	$R^2 = 99,56$
02	Acide Chlorogénique	$y = 21665x$	$R^2 = 98,53$
03	Acide Vanilique	$y = 65077x$	$R^2 = 99,21$
04	Acide Caféique	$y = 84066x$	$R^2 = 99,74$
05	Vanilique	$y = 58930x$	$R^2 = 99,66$
06	Acide p-Coumarique	$y = 49495x$	$R^2 = 99,61$
07	Rutine	$y = 28144x$	$R^2 = 98,69$
08	Naringin	$y = 19379x$	$R^2 = 99,68$
09	Quercétine	$y = 45378x$	$R^2 = 99,62$

L'anda = 268 nm

ISSN 0974-4169(Print)
0974-4150(Online)

www.ajronline.org



RESEARCH ARTICLE

Phytochemical screening and Identification of Polyphenols, Evaluation of Antioxidant activity and study of Biological properties of extract *Silybum marianum* (L.)

Fathi Guemari, Salah Eddine Laouini, Abdelkrim Rebiai, Abderrhmane Bouafia

University of Echahid Hamma Lakhdar, El Oued 39000, Algeria

*Corresponding Author E-mail: abdelrahmanebouafia@gmail.com

ABSTRACT:

In this study, we were devoted to study this plant *Silybum marianum* (L.) we divided it into four parts of leaves, twigs, flowers, and grains. Among the criteria that led to the selection of this plant, is the geographical origin and traditional use of this plant, which affects the natural composition of the plant, our research focuses on the identification of phenolic compounds (polyphenols, flavonoids, and flavanol), evaluation of antioxidant and activity antimicrobial For the four samples of plant *Silybum marianum* (L.) .The determination of the total polyphenols (TPC) by the method of Singleton and Ross using the Folin-Ciocalteu reagent, total flavonoid (TFC) by the method aluminum chloride method Ordonnez, and The estimation of the total flavanol content in the various extracts is carried out contained is carried out by the method of Mbaebie et al, The total antioxidant capacity (CAT) of the extracts is evaluated by the phosphomolybdenum method, DPPH test We use (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), The determination of antioxidant capacity by the FRAP method is carried out as follows The FRAP method is based on the present ferric iron (Fe³⁺) reduction reaction in the K₃Fe (CN)₆ ferrous iron (Fe²⁺) complex by an antioxidant, The results of the separation by high performance liquid chromatography HPLC. Phenol content and flavonoid content and flavanol content of the four plant samples varied and phenol content showed More effective for antioxidant activity and flavonoid content showed More effective for antimicrobial.

KEYWORDS: *Silybum marianum* (L.), Extraction, Bioactive compound, Polyphenols, Antioxidant, Antibacterial.

INTRODUCTION:

Plants medicinal are the natural resources of potential biodynamic compounds which can be used for majority drug development¹. Were the secondary metabolites, flavonoids, phenols, and flavanol derived from medicinal plants are used worldwide for the treatment of several diseases.

Depend therapeutic Effectiveness and quality of medicinal and aromatic plants their secondary metabolites, which in turn on the environmental factors Which Surrounding It out². And so did you the interest in natural antioxidants has increased in recent years, with regard to their therapeutic properties, significantly. Scientific research has been developed in various scientific disciplines to extract, identify and measure these compounds from many natural materials and agricultural food products³. It is considered *Silybum marianum* (L.) Fig.1, medicinal plant, and its fruits have been used for more than 20 century as a treatment for several diseases, especially liver disease, and bile ducts. The from medicinal plant *Silybum marianum* (L.)

Received on 15.01.2020

Modified on 17.02.2020

Accepted on 13.03.2020

©AJRC All right reserved

Asian J. Research Chem. 2020; 13(3):190-197.

DOI: 10.5958/0974-4150.2020.00037.1

extract, Silymarin, stimulates the liver regeneration, and its constituents act as antioxidant, anti-inflammatory and hep-atoprotective agents, and therefore are effective in the treatment of mushroom (*Amanita* sp) poisoning, cirrhosis and fibro-sis of the liver. In addition, milk thistle fruit extracts have antiviral⁴, and antitumor⁵ It is available in the United States as a dietary supplement⁶. The extracts of this plant do not cause any serious side effects when used as a chemotherapy except mild gastrointestinal and allergic reactions⁷. It is found in Europe, It can also be found in the United States, North and South America, Southern Russia, And Asia Minor, And North Africa. According to Belouahem (2009)⁸, the plant that we are studying is from the Bin Hamdah Farm, Shakshak District, Bani Qasha Wilayat of Oued Souf in Country Algeria Municipality, The coordinates of the northeast of Algeria (N 34 21 12.9, E 007 10 28.6).

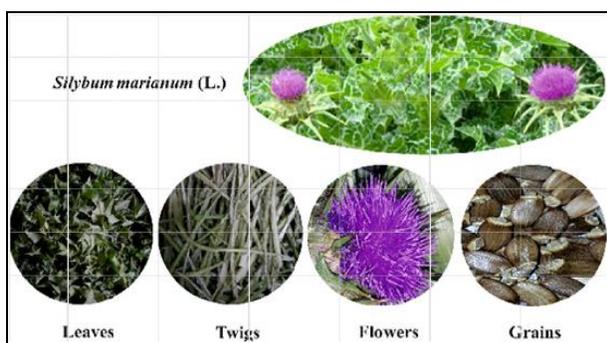


Fig. 1. Image of the four samples of a plant *Silybum marianum* (L.).

MATERIAL AND METHOD:

Plant material:

Plant of *Silybum marianum* it has been harvested. During March 2019 after completing their natural growth and opening of their flowers. Where they were washed with distilled water and then divided the plant into four parts leaves the branches of grain flowers, then dried them naturally first and then we completed drying with a machine belonging to the laboratory at a temperature of 55° to study the Drying for time Fig.2.

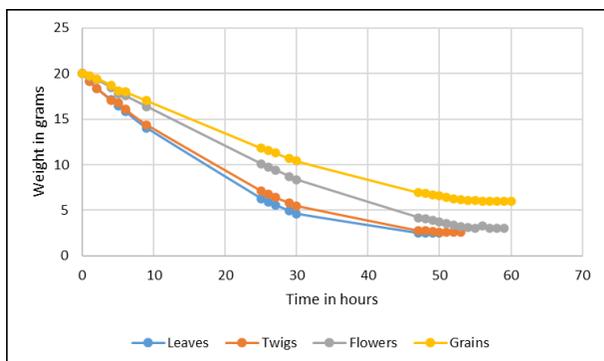


Fig. 2: Kinetics of drying of the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.).

Chemicals and instruments:

All the chemicals used and solvents used are of analytical quality. Sigma Aldrich (France), Alpha Asear (France), provided chemical reagents.

Extraction methods:

After full verification of the dryness of the four plant samples and after measuring the net weight of the samples, we received the percentage of the extract samples studied. Then we crushed the four parts of the plant and soaked the hexane chickens for 24 hours to remove the oils^{9, 10}. Then soak the ethanol at 70 degrees for 24 hours and repeat the process three times. At the end, we separated the solvents from the extract, calculated the mass of the extract and this yield, and obtained the results listed in Fig.3.

Le rendement : (The mass of the extract / the mass of plant matter) *100.

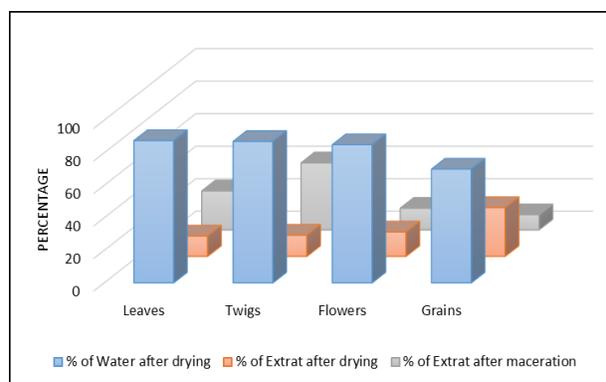


Fig. 3:Quantity of water, dry matter, end extract for the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.).

Estimation of Phenolic, Flavonoid and Flavanol content:

Determination of Total Polyphenol Content:

The determination of the total polyphenols (TPC) in the various extracts is carried out by the method of Singleton and Ross using the Folin-Ciocalteu reagent¹¹. A volume of 1000 μ l at different concentrations of in the various extracts is carried out was added to 200 μ l of Na_2CO_3 (10%). 1000 μ l of the Folin-Ciocalteu Diluted ten times reagent were added to the reaction medium. after 40 min of incubation at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 700 nm A calibration curve is established using gallic acid at various concentrations (7 to 40 μ g / ml) as standard¹². Thus, the results were expressed in milligram gallic acid equivalent per gram of dry weight (mg GAE/ g DW).

Determination of Total flavonoid Content:

The determination of the total flavonoid (TFC) in the various extracts is carried out by the method aluminum chloride method Ordonnez¹³. The yellowish coloration

given at this is method is due to the formation of a complex between oxygen atoms present on the carbons 4 and 5 of the flavonoids and the aluminum chloride ¹⁴.

Take a volume of 1 ml (AlCl₃, 2%); add 1 ml at different concentrations of in the various extracts is carried out was, The samples are then left for 15 minutes and the absorption is read by UV-visible spectrophotometer at 410 nm. A calibration curve is established using quercétine at various concentrations (10 to 55 µg / ml) as standard. Thus, the results were expressed in milligram quercétine equivalent per gram of dry weight (mg EQ/ g DW).

Estimation of Total flavanol Content:

The estimation of the total flavanol content in the various extracts is carried out contained is carried out by the method of Mbaebie et al ^{15, 16}.

Take a volume of 400µl volume of in the various extracts is carried out was, was added to 400µl AlCl₃ (2%) in absolut ethanol. The above reaction is mixed with 600 µL of sodium acetate (50 g / l) and incubated for 150 min at 20 ° C. Absorbance is measured at 440 nm. A calibration curve is established using routine at various concentrations (20 to 100 µg / ml) as standard. The total content of flavonols expressed in milligram routine equivalent per gram of dry weight (mg ER/ g DW).

Test antioxidant For the four samples:

Antioxidant Total capacity (TAC):

Estimation of The total antioxidant capacity (CAT) of the for the four sample extracts is evaluated by the phosphomolybdenum method. This technique is based on the reduction of molybdenum Mo (VI) present in the form of molybdate MoO₄²⁻ to molybdenum Mo (V) MoO₂⁺ ions in the presence of the extract to form a green phosphate / Mo (V) complex at pH acidic ¹⁷. A volume of 100 µl of each extract at different concentrations is mixed with 1000 µl of the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The tubes are screwed and incubated at 95 ° C for An hour and a half. The absorbance of the solutions is measured the volues at 695 nm After cooling. The capacity antioxidant total is expressed in milligram equivalents of ascorbic acid per gram of the dry matter (mg EAA / g MS)¹⁸.

The DPPH test:

The DPPH test (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) is a method widely used in the analysis of antioxidant activity. Originally, DPPH• is a stable free radical ¹⁹. This stability is due to the delocalization of free electrons within the molecule DPPH•. The presence of these DPPH• radicals gives rise to a dark violet coloring

of the solution, which absorbs around 517 nm. The reduction of the DPPH• radicals by an antioxidant causes discoloration of the test solution ²⁰⁻²⁴.

The evaluation of the antioxidant capacity is carried out as follows, 0.5 ml of an ethanoic solution of DPPH• (7.8 mg DPPH• in 100 ml ethanol) was mixed with 0.3 ml of the extract of the samples. The resulting mixture is then kept away from light at room temperature for 30 minutes. The absorbance is measured at 517 nm against a witness which contains pure ethanol. Control is the DPPH• solution with the solvent (ethanol)²⁵.

The preparation of the samples and the control is carried out under the same operating conditions. The decrease in absorbance is measured spectrophotometrically of the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.). And the% IC (percent inhibition) is calculated according to the formula next.

$$\% \text{ IP} = [(\text{At}_0 - \text{At}_{30}) / \text{At}_0 \times 100]$$

At₀ : absorbance of the control (containing no antioxidant) after 30 minutes

At₃₀ : absorbance of extracts measured after 30 minutes.

The anti-radical activity expressed in IC₅₀ (µg / ml), the anti-radical dose necessary to cause 50% inhibition. All the results presented are averages (± SEM) and analyzed with three repetitions.

The FRAP test:

The FRAP method is based on the present ferric iron (Fe³⁺) reduction reaction in the K₃Fe (CN)₆ ferrous iron (Fe²⁺) complex by an antioxidant, the reaction is revealed by the transfer of the yellow color of ferric iron (Fe³⁺) to the blue-green color of ferrous iron (Fe²⁺).

The determination of antioxidant capacity by the FRAP method is carried out as follows : The FRAP reagent was freshly prepared by mixing 25mL of a solution buffer of acetate buffer (3 mM, pH 3.6), 2.5 mL of TPTZ (10mM), 2.5 mL of chloride ferric (20mM) and 3 mL of distilled water. 30 µL of the four the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.). Were added to 970 µL of the reagent FRAP. Absorbance was read at 593 nm after 30 minutes incubation at room temperature against à virgin ²⁶. The results obtained are expressed in mg equivalent of FeSO₄ per 100 mg of dry matter (mg EFeSO₄ / 100 mg MS).

High-performance liquid chromatography HPLC:

High performance liquid chromatography is centered around the exploitation of dissolved reactions For the studied samples at two phases, one fixed and the other

mobile under very high pressure. The latter solutes are separated according to several criteria such as the dissolved convergence of the polar or polar material or the electric charge. After separation, the solute is then determined and calibrated using a reagent coupled to the chromatographic column. HPLC operation mode is widely described. Therefore, at a given moment, the mixture to be separated is injected at the entrance to the column, and is trained by the mobile phase. The components of the mixture are then collected and determined according to the rates of adsorption and absorption. Chromatography produces a representative plot of the component (peak) as a function of its retention time when leaving the column: it is a chromatogram²⁷⁻³⁴.

Antimicrobial activity:

The susceptibility of *Salmonella* (ATCC 44300), *Salmonella enterica* serovar Typhi (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), the four samples of a plant *Silybum marianum* (L.) was studied by using the method [Vincent] is reported by [Kar and Jain (1971).^{24, 35, 36}. It is a qualitative technology to determine the sensitivity of microorganisms vis-à-vis a reputed antibacterial substance. This method is based on the migratory power of the extracts inside a petri dish, in a solid nutrient medium. It consists of measuring the diameter of the zone of inhibition of microbial growth around a source of antibiotic deposited on the surface of the agar. In this work, ethanol was used as a solvent for extracting and preserving the extracts obtained. It has also been used as a control in the antibacterial tests of these extracts. In addition, in antibiotic use GEN 10. In addition, in prepared two concentrations deferentes extracted with ethanol (5 mg / ml, 10 mg / ml, 30 mg / ml, 50 mg / ml, 100 mg / ml.). Five concentrations of each sample of the plant *Silybum marianum* (L.).

Quantitative phytochemical analysis:

Total phenolic content:

The results of the determination of total polyphenols reveal that the highest level of polyphenols was recorded in the grain extract with a value of $127,39 \pm 1,41$ mg GAE /g DW, then flowers at $42,22 \pm 2,07$ mg GAE /g DW, then leaves at $22,25 \pm 1,11$ mg GAE /g DW, and twigs at $9,05 \pm 0,04$ mg GAE /g DW, which is the lowest. Fig (4), Tab (1).

Total flavonoid content:

The experiment recorded that the highest percentage of flavonoid in the Roses sample, then grain, then leaves and twigs respectively. $34,06 \pm 0,45$ mg EQ/g DW,

Then $19,41 \pm 0,44$ EQ/g DW, Then $18,33 \pm 0,70$ EQ/g DW, then $2,74 \pm 0,03$ EQ/g DW. Fig.4, Table 1.

Total flavanol content:

As for flavanol, the highest value was recorded in the leaves $17,99 \pm 0,25$ mg ER/g DW, then roses $14,30 \pm 0,22$ mg ER/g DW, then grains $13,76 \pm 0,28$ mg ER/g DW, and twigs $2,65 \pm 0,05$ mg ER/g DW. Fig.4, Tab (1).

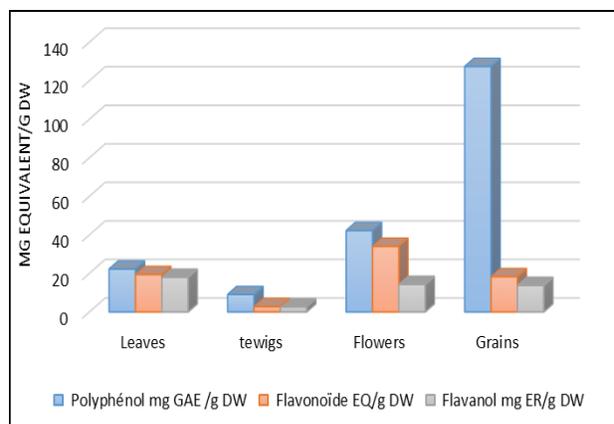


Fig. 4: The contents of polyphenols, flavonoids and flavanol total of the four samples of a plant.

Table 1: The percentage of Extraction, the contents of polyphenols, flavonoids and flavanol the four samples of a plant *Silybum marianum* (L.).

The samples of the plant	% of Extract % of DW	Polyphénol mg GAE/g DW	Flavonoïde mg EQ/g DW	Flavanol mg ER/g DW
Leaves	23.93 %	22.25 ± 1.11	19.41 ± 0.44	17.99 ± 0.25
Tewigs	41.18 %	9.05 ± 0.04	2.74 ± 0.03	2.65 ± 0.05
Flowers	13.28 %	42.22 ± 2.07	34.06 ± 0.45	14.30 ± 0.22
Grains	9.3 %	127.39 ± 1.41	18.33 ± 0.70	13.76 ± 0.28

Results of activite antioxidant:

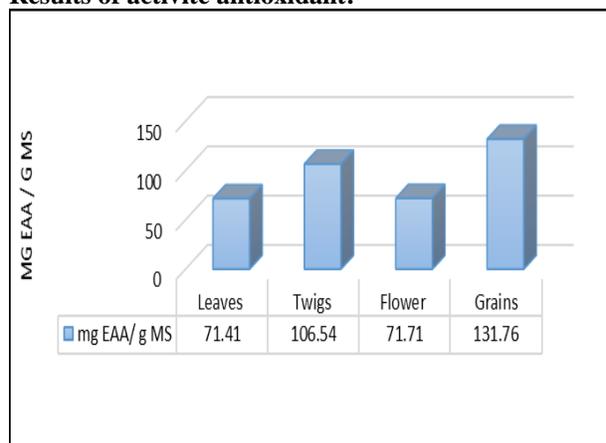


Fig. 5: Results activité antioxydant totale (CAT) for the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.).

Result activity antioxidant total (CAT):

The results of this activity Fig.5, Table 2. The best results obtained in the grains of the plant *Silybum marianum* (L.) of 131.76 ± 19.83 (mg EAA / g MS), then Twigs 106.54 ± 7.20 (mg EAA / g MS), then Flowers 71.71 ± 3.30 (mg EAA MS g), Leaves 71.41 ± 3.94 (mg EAA / g MS).

DPPH radical scavenging activity:

Grains extracts by maceration of *Silybum marianum* ethanol 70° showed significant DPPH inhibition Concentrated values $0,549 \pm 0,082$ mg/ml, then leaves $0,768 \pm 0,090$ mg/ml, Then Flower $1,055 \pm 0,144$ mg/ml, Then twigs $1,059 \pm 0,126$ mg/ml. DPPH inhibition rates recorded for the standard substance (ascorbic acid) were higher than those of the various extracts of the Grains with a value of 0.014 ± 0.02 mg/ml. From the Fig.6, Table 2.

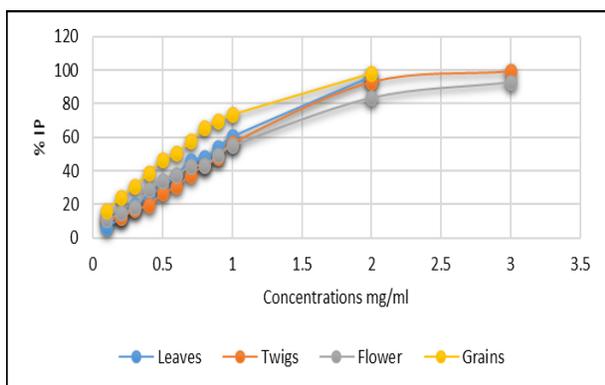


Fig. 6: Inhibition of the percentage of DPPH radical for the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.).

Result activity FRAP:

The best results obtained of this activity in the grains of the plant *Silybum marianum* (L.) Equal 247.52 ± 11.48 (Mg EFeSO₄/mg MS), Then leaves Equal 100.58 ± 2.82 (Mg EFeSO₄/mg MS), Then Flower Equal 68.92 ± 1.21 (Mg EFeSO₄/mg MS), Then Twigs Equal 46.57 ± 0.35 (Mg EFeSO₄/mg MS) Fig.7, Table 2.

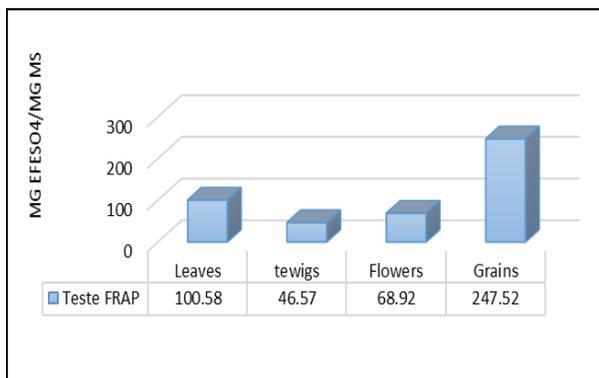


Fig. 7: Result activity FRAP for the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.).

Table 2: The results of Teste DPPH, Antioxidant Totale (CAT), and Teste FRAP the four samples of a plant *Silybum marianum* (L.).

The samples of the plant	Teste DPPH (mg MS / ml Ethanol 70°)	Antioxidant Totale (CAT) (mg EAA / g MS)	Teste FRAP (mg EFeSO ₄ /mg MS)
Leaves	0.768 ± 0.090	71.41 ± 3.94	100.58 ± 2.82
tewigs	1.059 ± 0.126	106.54 ± 7.20	46.57 ± 0.35
Flowers	1.055 ± 0.144	71.71 ± 3.30	68.92 ± 1.21
Grains	0.549 ± 0.082	131.76 ± 19.83	247.52 ± 11.48

Estimation of Compounds phenolic using HPTLC

The results of the separation of the different extracts of the four plant sample *Silybum marianum* (L.) by high performance liquid chromatography HPLC are illustrated in the Fig.8 , Table 3.

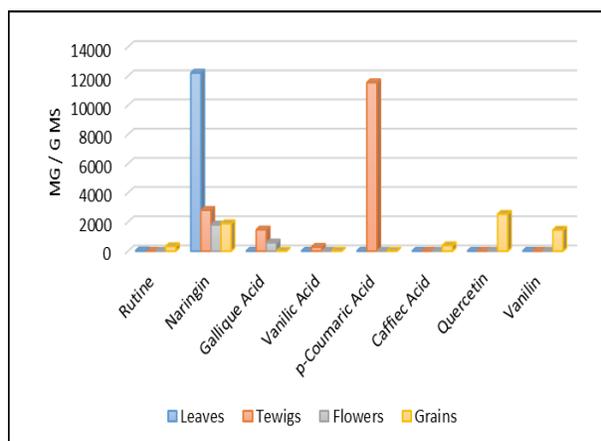


Fig. 8: The results of Compounds phenolic using HPTLC of the different extracts of the four plant sample *Silybum marianum* (L.).

Table 3: The results of Compounds phenolic using HPTLC of the different extracts of the four plant sample *Silybum marianum* (L.).

The samples of the plant	Leaves	Tewigs	Flowers	Grains
Rutine (µg / g MS)	17.765	-----	-----	321.468
Naringin (µg / g MS)	12215.656	2801.775	1804.169	1885.948
Gallique Acid (µg / g MS)	-----	1461.575	573.285	-----
Vanilic Acid (µg / g MS)	-----	275.433	-----	-----
p-Coumaric Acid (µg / g MS)	-----	11553.163	-----	-----
Caffiec Acid (µg / g MS)	-----	-----	-----	378.34
Quercetin (µg / g MS)	-----	-----	-----	2537.101
Vanilin (µg / g MS)	-----	-----	-----	1446.875

Antibacterial results of the four extracts:

Where the extract of roses and twigs and then grains showed great effectiveness on the bacteria *Escherichia coli* diameter of 15 mm, 13 mm, and 10 mm, respectively for the concentration of 100 mg/ml. Effective, the extract of roses showed great effectiveness on the bacteria *Escherichia coli* diameter of 10 mm, and 7 mm, respectively for the concentration of 50 mg/ml, and 30 mg/ml. the extract of roses, grains twigs, and

leaves then showed great effectiveness on the bacteria *Salmonella* diameter of 9 mm, 8 mm, 8 mm, and 7 mm, respectively for the concentration of 100 mg/ml, and the extract of roses, grains, leaves, and twigs then showed great effectiveness on the bacteria *Candida albicans* diameter of 13 mm, 10 mm, 11 mm, and 8 mm, respectively for the concentration of 100 mg/ml, As for the rest of the bacteria, the effect is weak, which we did not consider Fig .9, Table 4.

Table 4: Evaluation of antibacterial activity of the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.)

The samples of the plant	Leaves	Tewigs	Flowers	Grains
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) (mm)	0	13	15	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) (mm)	0	0	8	7
<i>Salmonella</i> (ATCC 44300) (mm)	7	7	7	8
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) (mm)	11	7	13	10
<i>Liseria monocytogenes</i> (ATCC 13932) (mm)	8	00	13	12
<i>Salmonella enterica serovar Typhi</i> (ATCC 14028) (mm)	8	7	9	8
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) (mm)	00	00	7	7

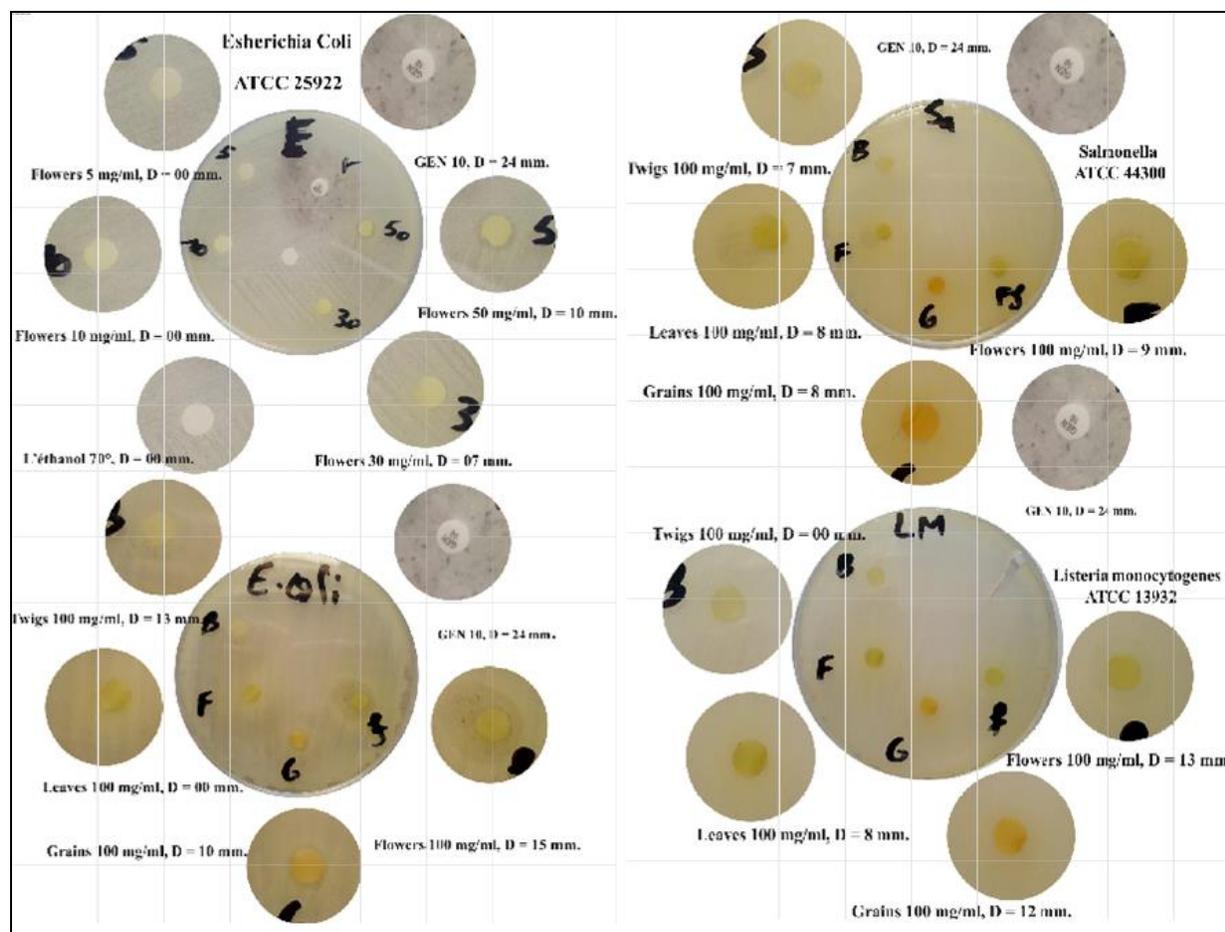


Fig. 9: Evaluation of antibacterial activity of the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.) on the bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Candida albicans*.

DISCUSSION:

The results showed that the extracts of the grains by maceration have contained the highest content in the polyphenols 127.39 ± 1.41 mg GAE /g DW, The highest content of flavonoids had been recorded for the extract of the roses sample $34.06 \pm 0,45$ mg EQ/g DW, The leaves had the highest content of in the flavanol 17.99 ± 0.25 mg ER/g DW. The extract of the grains obtained by maceration have the best antioxidant capacity 131.76 ± 19.83 (mg EAA / g MS), Grains extracts by maceration of *Silybum marianum* ethanol 70° showed significant DPPH inhibition Concentrated values 0.549 ± 0.082 mg/ml, The best results obtained of this activity in the grains of the plant *Silybum marianum* (L.) Equal 247.52 ± 11.48 (Mg EFeSO₄/mg MS), The results showed that the extracts of the grains have contained the highest content Naringin Estimation of Compounds phenolic using HPTLC $12215.656 \mu\text{g} / \text{g Ms}$, Where the extract of roses and twigs and then grains showed great effectiveness on the bacteria *Escherichia coli* diameter of 15 mm, 13 mm, and 10 mm, respectively for the concentration of 100 mg/ml Effective, the extract of roses showed great effectiveness on the bacteria *Escherichia coli* diameter of 10 mm, and 7 mm, respectively for the concentration of 50 mg/ml, and 30 mg/ml. the extract of roses, grains twigs, and leaves then showed great effectiveness on the bacteria *Salmonella* diameter of 9 mm, 8 mm, 8 mm, and 7 mm, respectively for the concentration of 100 mg/ml, and the extract of roses, grains, leaves, and twigs then showed great effectiveness on the bacteria *Candida albicans* diameter of 13 mm, 10 mm, 11 mm, and 8 mm, respectively for the concentration of 100 mg/ml.

CONCLUSION:

The current study has established certain facts firstly, from our results; we find that of the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.). Contain variable contents in phenolic compounds secondly, The results showed that the extracts of the grains by maceration have contained the highest content in the polyphenols, and, has effective antioxidant properties, thirdly the extracts of the flower by maceration have contained the highest in the flavonoids, and, has effective antimicrobial properties, Fourthly We noticed that the percentage of flavanols is high in relation to flavonoids and polyphenols, and this is what gave a characteristic activity antioxidant and activity antibacterial of the four samples of the plant *Silybum marianum* (L.) on the bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Candida albicans*. Finally, and from the results obtained, we can put these plant extracts as a treatment.

CONFLICT OF INTEREST:

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES :

1. Belouahem-Abed D, Belouahem F, Bélaïr G. Biodiversité floristique et vulnérabilité des aulnaies glutineuses de la Numidie algérienne (NE Algérie). *European Journal of Scientific Research*. 2009 ;32(3) :329-61.
2. Gairola S, Shariff NM, Bhatt A. Influence of climate change on production of secondary chemicals in high altitude medicinal plants : issues needs immediate attention. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010 ;4(18):1825-9.
3. Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. 2010.
4. Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, Pal S, Lee DY, Liu Y, et al. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2010 ;107(13):5995-9.
5. Scambia G, De Vincenzo R, Ranelletti P, Panici PB, Ferrandina G, D'Agostino G, et al. Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies : synergism with cisplatin and doxorubicin. *European Journal of Cancer*. 1996 ;32(5) :877-82.
6. Jakkula M, Boucher TA, Beyendorff U, Conn SM, Johnson JE, Nolan CJ, et al. A randomized trial of Chinese herbal medicines for the treatment of symptomatic hepatitis C. *Archives of internal medicine*. 2004 ;164(12) :1341-6.
7. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*. 2001 ;61(14):2035-63.
8. Gangwar K, Deepali GR, Gangwar R. Ethnomedicinal plant diversity in Kumaun himalaya of Uttarakhand, India. *Nature and Science*. 2010 ;8(5) :66-78.
9. Bouafia A, Laouini SE, Ouahrani MR. A Review on Green Synthesis of CuO Nanoparticles using Plant Extract and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2020 ;13(1) :65-70.
10. Bouafia A, Laouini SE. Green synthesis of iron oxide nanoparticles by aqueous leaves extract of *Mentha Pulegium* L.: Effect of ferric chloride concentration on the type of product. *Materials Letters*. 2020 ;265 :127364.
11. Chavan Y, Singhal RS. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative food science & emerging technologies*. 2013 ;17 :106-13.
12. Waterhouse A. Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. *American Journal of Enology and viticulture*. 1999 ;28 :1-3.
13. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food and Chemical Toxicology*. 2013 ;55:290-6.
14. Lagnika L. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises: Strasbourg 1; 2005.
15. Mbaebie B, Edeoga H, Afolayan A. Phytochemical analysis and antioxidant activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(2):118-24.
16. Anita A, Retna A, Joseph J. Phytochemical screening and column chromatography studies of *Aerva lanata*. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2018;11(1):84-90.
17. Benhammou N. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérie 2012.
18. Shahwar D, Raza MA. Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2012;2(7):547-50.
19. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*. 1995;28(1):25-30.
20. Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*. 2002;8(3):121-37.

21. Gülçin İ, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta medica*. 2004;70(06):561-3.
22. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın J Sci Technol*. 2004 ;26(2):211-9.
23. Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. 2005 ;92(2):235-54.
24. Raj AJ, Dorairaj S. Phytochemical Screening and In-vitro Antioxidant Activity of *Cissus quadrangularis*. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2010 ;3(4) :876-8.
25. Boutlelis DA, Bordjiba O. Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. [ressource textuelle, sauf manuscrits]. 2014.
26. Rivero-Pérez M, Muniz P, González-Sanjósé M. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*. 2008 ;46(8):2815-22.
27. Panaiva L, editor *Techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites*. Conférence Eurocopter Marseille, France; 2006.
28. Ushasri S, Nagaraju K, Prasanthi D, Ramadevi K, Bhargavi C. In Vitro Antihelminthic Activity and Preliminary Phytochemical Screening of Whole Plant of *Vernonia cinerea*. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2013;6(1):68-70.
29. Nikhat F, Satynarayana D, Joshia AB. Phytochemical and pharmacological investigation of roots of *Syzygium cumini* (L) skeel. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2008;1(1):22-5.
30. Rub RA, Mukadam A, Pinjari J, Nathani A, Sagri A. Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of *Quirivelia frutescens* (Apocynaceae). *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2009 ;2(4):509-12.
31. Nagarajan M, Christina A, Devi P, Meera R. HPTLC analysis and Phytochemical Investigation of Leaves of *Euphoria longan*. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2010 ;3(1):31-5.
32. Majaz Q, Nazim S, Siraj S, Zameeruddin M, Khan R. Phytochemical Analysis of Methanolic Extract of Roots of *Kalanchoe pinnata* by HPLC and GCMS. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2011 ;4(4) :655-8.
33. Kumar G, Divya R, Pratyusha V, Monica G. Phytochemical Investigations on Bark and In vitro Microbial Assay of *Zanthoxylum armatum* DC. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2012 ;5(6):730-2.
34. Nikhat F, Satyanarayana D, Shastri C, Rajni S, Sheikh A. The Phytochemicals explored from the roots of *Syzygium cumini* (L) skeel assessed for Anti-hyperglycemic activity. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2013 ;6(10):920-5.
35. Jain S, Kar A. The antibacterial activity of some essential oils and their combinations. *Planta Medica*. 1971 ;20(04):118-23.
36. Shaikh T, Mujum A, Wasimuzzama K, Rub RA. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical Screening of *Cichorium intybus* Linn Seed. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2010 ;3(4): 977-80.