

République Algérienne démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement supérieur et de recherche Scientifique

جامعة احمد بوقرة بومرداس

Université M'Hamed Bougara de Boumerdes



Faculté des Sciences

Département de biologie

MEMOIRE

Présenté En vue de l'obtention du Diplôme de Master II

Domaine : science de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologique

Spécialité : Biologie des populations et des organismes

Thème :

L'effet antilithiasique de l'extrait aqueux des racines de
Silybum marianum (chardon Marie)

Réalisé par :

- Bellounis Amira
- Cherbi Samira

Membre du jury :

- | | | |
|------------------------|-------------------|------------|
| ➤ Mme Chebouti Nadjiba | Professeur (UMBB) | Présidente |
| ➤ Mr ARAB Karim | Professeur (UMBB) | Examineur |
| ➤ Mme LAOUFI Razika | MCB (UMBB) | Promotrice |

Année universitaire 2019/2020

Résumé

La lithiase urinaire est une pathologie fréquente dans tous les pays du monde. Elle se caractérise par la formation de concrétions cristallines qui se développent dans les voies urinaires. Le traitement de cette maladie par les plantes médicinales est une alternative au traitement par les moyens médicamenteux ou chirurgicaux coûteux et ayant des effets secondaires. Dans ce contexte, le chardon Marie ou *Silybum marianum* une plante spontanée de la famille des *Astéracées*, connue par sa valeur estimable en thérapeutique a fait l'objet d'une étude phytochimique de l'extrait de ses racines, de son pouvoir antilithiasique et antioxydant. Le screening phytochimique réalisé par les précédentes études a révélé la richesse de la plante en molécules bioactives, notamment en flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, stéroïdes, triterpènes, et en glucosides cardiotoniques. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu, un taux très important des polyphénols dans l'extrait des graines de chardon Marie a été enregistré dans des précédents travaux. L'évaluation de l'activité antioxydante par DPPH a révélé que l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante est doté d'un potentiel antioxydant très intéressant. Le chardon Marie exerce un effet thérapeutique notamment antioxydant dû aux métabolites secondaires contenus dans les feuilles reconnus comme agents actifs sur le stress oxydatif.

Mots clés : *Silybum marianum*, racine, polyphénols, activité antioxydante, activité antilithiasique.

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remercions ALLAH qui nous a aidé et nous a donné la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont

Contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif du département de biologie.

Nous tenons à remercier sincèrement Madame LAOUFI RAZIKA S'est montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle est bien voulu nous consacrer.

Nous tenons à remercier également madame CHEBOUTI NADJIBA de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.

Nous tenons à remercier également Monsieur ARAB KARIM d'avoir gentiment accepté d'examiner et de juger notre mémoire.

On n'oublie pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire

Dédicaces

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu
réaliser ce travail que je dédie*

*A ceux qui m'ont donnée la vie, la lumière de mes yeux mes chers parents
A mon cher papa qui souffert avec moi tout au long de mes études, que
dieu te garde pour nous*

*A ma chère maman que j'aime infiniment, merci d'être une
source de tendresse et d'amour*

A mon très cher frère Hocin

A mes très chères sœurs Chaima , Ikhlal

A mon professeur du primaire Farida Mibarki

*A toutes mes amies et plus particulièrement à Maria, Latifa,
Wissam, Malia*

*Je dédie également toute la promotion de BPO 2019/2020
et a tous mes enseignants*

*Je donne mes remerciements à mon cher binôme Samira pour sa
patience dans les moments les plus difficiles, ainsi que toutes sa
famille*

AMIRA

Déïcaces

*Je dédie ce modeste travail à ma très chère maman qui m'a encouragé, guidé
et soutenu durant toute ma vie*

*À mon précieux père qui était mon meilleur supporteur tout le long de mes
études*

À mes très chers frères Hamza, Khaled et Oussama

À mes très chères sœurs Imane, Asma et Maria

À mes très chères amies Cherifa, Sarah et Célia

À ma binôme Amira et sa famille

À toute la promotion BPO 2019/2020

À tous mes enseignants

Et à tous ceux qui aiment Samira

SAMIRA

Abréviation	Signification
pH	Potentiel hydrogène
FeCl ₃	Chlorure de fer
HCl	Acide chlorohydrique
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
KOH	Hydroxyde de potassium
MS	Matière sèche
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DO	Densité optique
mg EAG/g	Milligramme équivalent acide gallique par gramme
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
UV	Ultra-Violet

Numéro	Titre	Page
1	Racines de chardon Marie	4
2	Tiges du chardon Marie	5
3	Feuilles du chardon Marie	5
4	Fleur du chardon Marie	6
5	Akènes de chardon Marie avec leur aigrette	6
6	Structure des lignines	10
7	Structure des lignanes	10
8	Structure des flavonoïdes	11
9	Structure des tannins hydrolysables et des tannins condensés	11
10	Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols	13
11	Interaction entre les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques de susceptibilité	14
12	Principales étapes de la lithogénèse	17
13	Image représente les calculs whewellite A : type Ia. B : type IIa	18
14	Image représente les calculs weddellite. A: type Ic. B : type IIb	19
15	Différents types des calculs A : calcul de phosphate de calcium ; B : calcul de struvite ; C : calcul d'acide urique ; D : calcul de cystine	21
16	Schéma récapitulatif des différentes étapes du travail	24
17	Forme réduite du radical DPPH	29

Numéro	Titre	Page
1	Classification de <i>Silybum marianum</i>	3
2	Structure de quelques hydroxybenzoïques	9
3	Composés hydroxycinnamiques	9
4	Principaux types des coumarines	12
5	Prévalence de la maladie lithiasique dans différents pays du monde	15
6	Tableau comparatif des études réalisées sur le pouvoir antioxydant de <i>Silybum marianum</i>	34
7	Tableau comparatif des études réalisées sur l'effet de l' <i>Urtica dioica</i> et l' <i>Herniaria hirsuta</i> sur la cristallisation oxalocalcique	35

Introduction.....	01
-------------------	----

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur chardon Marie.....	03
I.1.1. Présentation du chardon Marie (<i>Silybum marianum</i>)	03
I.1.2. Classification de chardon Marie.....	03
I.1.3. Noms vernaculaires de la plante	03
I.1.4. Origine	04
I.1.5. Description botanique	04
I.1.6. Intérêt médicinal et pharmaceutique du chardon Marie.....	07
I.1.7. Composition chimique de chardon Marie.....	07
I.2. Polyphénols.....	08
I.2.1. Classificatuion des polyphénols.....	08
I.2.1.1. Acides phénoliques.....	08
I.2.1.2. Lignines.....	10
I.2.1.3. Lignanes.....	10
I.2.1.4. Flavonoïdes.....	11
I.2.1.5. Tanins.....	11
I.2.1.6. Stilbènes.....	12
I.2.1.7. coumarines.....	12
I.2.2. Biosynthèse de polyphénols.....	12
I.2.2.1. Voie de l'acide shikimique.....	12
I.2.2.2. Voie de l'acétate / malonate	13
I.3. Lithiase urinaire	14
I.3.1. Définition	14
I.3.2. Epidémiologie	14
I.3.3. Lithogenèse urinaire	15
I.3.4. Etapes de lithogenèse.....	15
I.3.4.1. Cristallogenèse.....	15
I.3.4.1.1. Sursaturation des urines	16
I.3.4.1.2. Germination cristalline (nucléation)	16
I.3.4.1.3. Croissance cristalline	16
I.3.4.1.4. Agrégation des cristaux	16
I.3.4.1.5. Agglomération cristalline	16

I.3.4.2. Calculogénèse	16
I.3.4.2.1. Rétention des particules cristallines	16
I.3.4.2.2. Croissance de calcul	17
I.3.5. Différents types de calculs	18
I.3.5.1. Calculs minéraux	18
I.3.5.1.1. Oxalate de calcium	18
I.3.5.1.2. Phosphates de calcium	19
I.3.5.1.3. Phosphate ammoniaco-magnésien ou struvite	19
I.3.5.2. Calculs organiques	20
I.3.5.2.1. Acide urique	20
I.3.5.2.2. Cystine	20
I.3.5.3. Calculs médicamenteux	20
I.3.6. Méthodes d'analyses des calculs urinaires	21
I.3.6.1. Méthodes chimiques	21
I.3.6.2. Méthodes chromatographiques	22
I.3.6.3. Méthodes cristallographiques	22
I.3.6.4. Méthodes spectroscopiques (Spectroscopie UV-Visible)	22

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel.....	23
II.1.1. Matériel biologique	23
II.1.2. Matériel végétal	23
II.1.3. Matériel non biologique	23
II.2. Méthodes	23
II.2.1. Séchage, broyage et conservation	23
II.2.2. Screening phytochimique	25
II.2.3. Extraction des polyphénols	27
II.2.4. Dosage des polyphénols totaux	28
II.2.5. Tests des activités biologiques	29
II.2.5.1. Activité antioxydante	29
II.2.5.1.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH	29
II.2.5.2. Activité antilithiasique	30
II.2.5.2.1. Mode opératoire	30

II.2.5.2.2. Observation au MEB	31
II.2.6. Analyses statistiques	31

Chapitre III : Discussion des résultats

III.1. screening phytochimique	32
III.2. Dosage des polyphénols	33
III.3. Evaluation de l'activité antioxydante	33
III.4. Evaluation de l'activité antilithiasique	34
Conclusion et perspectives.....	37
Références bibliographiques	38



Introduction

Le monde végétal de par sa richesse en végétaux représente une source inépuisable de composés actifs capables de synthétiser par voie métabolique des molécules bioactives afin de faire face aux stress biotiques et abiotiques. Ces molécules grâce à leurs activités biologiques sont une réponse concrète à plusieurs maladies qui touchent l'humanité. Ces maladies mettent en exergue le rôle néfaste des processus oxydatifs de type radicalaire dans la genèse et le suivi d'un nombre de plus en plus croissant de maladies mortelles.

La lithiase urinaire est une pathologie fréquente qui se caractérise par la formation de concrétions cristallines se développant dans le bassinet et/ou les calices d'un rein et provoquant une obstruction partielle ou totale à l'écoulement normal de l'urine, elle affecte 4 à 18 % de la population. En progression dans tous les pays industrialisés depuis la seconde guerre mondiale, c'est aussi une pathologie qui se transforme avec le temps selon l'évolution du niveau socio-économique des populations (**Daudon, 2006**). Elle est devenue un problème de santé publique majeur dans tous les pays du monde, du fait qu'elle conduit à une immobilisation prolongée et une perte de la fonction rénale dans certains cas.

De nombreux patients lithiasiques ont donc recours à la chirurgie ou à la lithotritie pour éliminer les calculs urinaires. Cependant, ces moyens sont très coûteux et sont souvent associés à des effets secondaires non négligeables. Malgré le progrès considérable noté dans le domaine de la thérapie médicale, il y a peu des médicaments satisfaisants pour traiter la lithiase urinaire. C'est pour cela, depuis quelques années, qu'il y a un regain d'intérêt pour la phytothérapie (**Benhelima, 2017**). En effet, certains des extraits de plantes utilisés couramment exercent leurs effets antilithogènes, en changeant la composition ionique de l'urine comme les ions calcium et les ions magnésium. Beaucoup d'extraits de plantes sont riches en saponines qui peuvent perturber les suspensions de mucoprotéines favorisant ainsi la cristallisation (**Grases et Costa-Bauza, 1990**). C'est le cas du chardon Marie ou *Silybum marianum* de la famille des *astéracées*, connue pour ses vertus thérapeutiques. Elle présente un intérêt médicinal et pharmaceutique important grâce à sa richesse en substances bioactives. Le *Silybum marianum* est utilisé en médecine traditionnelle comme aide digestif, anti-inflammatoire, diurétique (**Flachowsky et al., 1998**). Au dix-neuvième siècle, il a été employé pour des problèmes du foie, du rein, de la rate, de calculs biliaires, des problèmes de grossesse et de menstruation. Dans les années cinquante les composants du fruit du chardon Marie ont été isolés et toutes les recherches se sont concentrées sur ces composants qui représentent exactement 4 à 6% du fruit sec de la plante. Ces composés ont été distribués dans

des capsules normalisées avec une teneur de 70-80% (**Flachowsky *et al.*, 1998**). En effet des épreuves cliniques réalisées sur divers désordres hépatiques comprenant l'hépatite virale, la cirrhose suggèrent que le chardon Marie diminue l'activité de l'aminotransférase et améliore certains paramètres cliniques (**Amrani, 2006**). Il a été qualifié de cytoprotecteur pour ses capacités à réduire les dommages du foie lors de l'empoisonnement par l'amanite phalloïde (**Anderson *et al.*, 2000**). Par conséquent, compte tenu de l'absence de travaux approfondis et d'études scientifiques portant sur le potentiel médicinal et l'effet réel des racines du chardon Marie dans le traitement naturel de la lithiase urinaire, en particulier dans la prévention des calculs d'oxalate de calcium, nous nous sommes proposés de déterminer l'effet de cette plante sur la sursaturation urinaire de type oxalocalcique.

L'objectif principal de cette étude, est de déterminer si une cure à base des racines du chardon Marie prévient le risque de cristallisation de l'oxalate de calcium dans l'urine, en testant l'infusion de la plante afin de se rapprocher au mieux de la procédure utilisée par le malade lithiasique.

Notre présente étude s'inscrit dans cet objectif et elle a porté sur :

- Une étude phytochimique qui a permis d'identifier certains groupes chimiques bioactifs contenus dans l'extrait aqueux de racines de la plante étudiée ;
- Une étude de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de la racine du chardon Marie figure dans l'un des principaux objectifs des travaux menés afin d'évaluer les principes actifs en terme de valeur thérapeutique potentiellement utilisable en pharmacie ;
- Une évaluation de l'activité antilithiasique de l'extrait aqueux des racines du chardon Marie.

Cette étude sera subdivisée en deux parties :

- Une revue bibliographique où nous apportons des données générales sur l'espèce étudiée et la lithiase.
- Une seconde partie dans laquelle nous rapportons les méthodes utilisées, une synthèse bibliographique des résultats obtenus par les travaux réalisés suivi des discussions et nous finirons par une conclusion. Vu la période de la crise sanitaire du COVID-19 cette présente étude n'a pas été réalisée.



Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur chardon Marie

I.1.1. Présentation du chardon Marie (*Silybum marianum*)

Chardon Marie est une plante spontanée ou encore mauvaise herbe identifiée depuis deux mille ans par sa valeur estimable en thérapeutique (**Ben rahal, 2012**). C'est une plante annuelle à bisannuelle appartenant à la famille des *Astéracées*. Son nom latin *Silybum* signifie chardon, *marianum* fait référence à la vierge Marie. Dans la légende, lors de son voyage en Egypte, elle aurait caché son fils Jésus sous un buisson de chardons où elle lui donna le sein. Les nervures blanches caractéristiques des feuilles de cette espèce servaient le vestige des gouttes de lait de la vierge d'où le terme de « Milk » en anglais (**Mouille-Richard, 2014**).

I.1.2. Classification de chardon Marie

Selon la classification de **Deysson (1979)** et **Spichiger et al. (2000)** (Tab.1), le chardon Marie appartient au :

Tableau 1 : classification de *Silybum marianum* (Deysson, 1979 ; Spichiger et al., 2000)

Règne	Plante
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	<i>Asteraceae</i>
Sous-famille	Tubuliflores
Genre	<i>Silybum</i>
Espèce	<i>Silybum marianum</i> (L)

I.1.3. Noms vernaculaires de la plante

Nom vernaculaire français : Chardon argenté, chardon notre-dame, Chardon Marie, chardon marbré, épine blanche, lait de notre dame, Silybe de Marie (**Amrani, 2006**).

Nom vernaculaire anglais: Milk thistle, Holy thistle, Lady's thistle, Marian thistle, Mediterranean milk thistle (**Benchachoua, 2019**).

Nom vernaculaire arabe: Chouk el djemel, Bou-zeroual, Ousûk ez-zerwal, Chouq boutli, Hacoub et Lichilich, Qortom, Harshaf barri, Shouk el-nasara (**Benchaachoua, 2019**).

I.1.4. Origine

Le chardon Marie est une plante spontanée originaire du bassin méditerranéen (**Bezanger et al., 1980**), il s'étend de la mer à 700-1000 m d'altitude sur les terrains incultes, secs et rocaillieux de l'Europe occidentale et méridional (**Bayer et Buller, 1990**), il est ainsi cultivé en Afrique du nord comme plante ornementale (**Roche, 1991**). Cette plante cosmopolite affectionne les endroits incultes, chauds et ensoleillés et particulièrement les sols acides, secs et caillouteux. On la trouve sur les bords des champs et des chemins et sur les décombres (**Morazzoni et Bombardelli, 1995**).

En Algérie, d'après **Belouahem (2009)**, le chardon Marie est particulièrement répandu dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux humides.

I.1.5. Description botanique

Les chardons Marie (*Silybum marianum*) se reconnaissent à leurs belles têtes violacée qu'entourent les collerettes un peu défraîchies de leurs longues bractées épineuses (**Beniston, 1984**) ne dégagent pas d'odeur particulière et se distinguent par une saveur d'artichaut (**Charrié et al., 2017**). Chardon Marie est caractérisé par une forte, longue, épaisse et fibreuse racine (**Sindel, 1991**) (Fig.1).



Figure 1 : racine du chardon Marie (Amrani, 2006)

Par une rameuse, robuste, dressée, tige atteignant 30cm à 1,5m de hauteur, elle porte peu de feuilles sur la partie supérieure (**Ditomaso, 2007**) (Fig.2).



Figure 2 : tiges du chardon Marie (Ben rahal, 2012)

Feuilles : sont oblongues, pennatilobées, caractérisées par une marge ondulée à bord épineux et une couleur verte pale luisant, ponctué de marbrures blanches le long des nervures. Les feuilles supérieures sont engainantes (**Charrié et al., 2017**) (Fig.3).

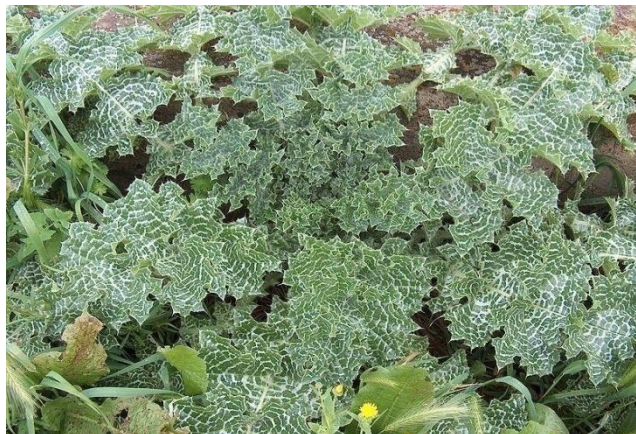


Figure 3 : feuilles du chardon Marie (Ben rahal, 2012)

Fleurs : sont toutes tubuleuses réunies en capitules terminaux, solitaires, dépassant souvent 6cm de diamètre, sont pourvues d'une forte épine atteignant jusqu'à 5cm et se réfléchissent vers l'arrière. Corolle dentée de couleur pourprée. 5 étamines formant un tube autour du style (**Beniston, 1984**) (Fig.4).



Figure 4 : fleur du chardon Marie (Benchachoua, 2019)

Fruits : sont des akènes luisants, de 6 à 7 mm, plats, lisses et brillants et de couleur s'étend du marron noir au marbré de jaune, surmontés d'une longue aigrette blanche denticulée en anneau à sa base (**Sindel, 1991 ; Charrié, 2017**) (Fig.5).



Figure 5 : akènes de chardon Marie avec leurs aigrette (Mouillé-Richard, 2014)

I.1.6. Intérêt médicinal et pharmaceutique du chardon Marie

Le chardon Marie est une plante médicinale antique employée pour épurer et protéger le foie, elle est maintenue dans les hôpitaux allemands pour le traitement de secours des intoxications (**Turner et Szczawinski, 1991**). En Europe, on trouve de nos jours le chardon Marie dans plusieurs préparations pharmaceutiques destinées au traitement de divers troubles hépatiques et biliaires (**Morazzoni et Bombardelli, 1995**).

Les allemands ont isolé un principe actif des fruits du chardon, la silymarine, qui est contenu dans les fruits dans les concentrations s'échelonnant de 1 à 4%. Ce substrat a un pouvoir hépatoprotecteur (**Talaj et al., 1989 ; Foster, 1995 et Ody, 2002**).

Les mécanismes d'action du chardon Marie ne sont pas encore élucidés. On lui reconnaît un effet antioxydant, anti-inflammatoire et anti-prolifératif, anticancéreux, l'action hépatoprotectrice (**Jiang et al., 2000 ; Bhatia et Agarwal, 2001**).

D'après **Compos (1989)**, **Schandalik et Perucca (1994)**, **Venkataraman et al. (2000)** et **Anderson et al. (2000)**, le chardon Marie est utilisé dans les applications suivantes : hépatites et hépatopathies latentes, stéatoses, cirrhoses, meilleurs effets de l'administration prophylactique, protection de la cellule hépatique lors des chimiothérapies anticancéreuses, dépression nerveuse, stimulation de la lactation ... etc.

I.1.7. Composition chimique de chardon Marie

Le *Silybum marianum* est un végétal riche en composés actifs de point de vue médicinal, ses propriétés sont dues à la présence de la silymarine. La graine de *Silybum marianum* contient un taux élevé de silymarine d'où l'intérêt porté à cette partie de la plante (**Karkanis et al., 2011**).

Le fruit du chardon Marie contient entre 1 à 3% de silymarine, un mélange de différents flavonolignanes issus de la taxifoline et de l'alcool coniférylique (**Saller, 1995**). Il s'agit notamment de la silybine (silybine A, silybine B), la silychristine, la silydianine et l'isosilybine (isosilybine A et isosilybine B), ce sont les principaux composés responsables de l'action thérapeutique de la plante. Le fruit contient également d'autres flavonolignanes en plus faible quantité (déhydrosilibinine, 3-desoxysilichristine, silymonine, siliandrine, silybinom, silyhermine et neosilyhermine) (**Halbach et Gorler, 1971**), des flavonoïdes (quercétine, taxifoline, kampferol, apigénine) mais aussi 25-30% de protéines, ainsi que 20-30% de lipides (avec prédominance d'acide linoléique 60%, d'acide oléique 30% et acide palmitique 9%) et des stérols 0,63% (cholestérol, camestrol, stigmastérol et sitostérol)

(Meyer et Buchtela, 1999). La silymarine a été isolée pour la première fois en 1968, elle a comme formule moléculaire $C_{12}H_{22}O_{10}$ et son poids moléculaire est de 482,45 (Saller, 1995). Le chardon Marie présente des teneurs élevées en calcium dans tous les organes du végétal (feuilles, graines, tige, racines) ce qui donne à cette plante une valeur alimentaire très importante (Amrani, 2006). Le phosphore reste le minéral qui distingue les graines de chardon Marie avec une teneur de 0,6 g.kg MS plus élevée que celle des feuilles et de la tige respectivement 0,2 et 0,15 g.kg MS. Les feuilles se distinguent par des teneurs importantes en sodium, en magnésium et en calcium alors que la tige est riche en potassium (Amrani, 2006).

I.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvé dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside. Ils sont aussi communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarine, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins (Boubekri, 2014).

I.2.1. Classification des composés phénoliques

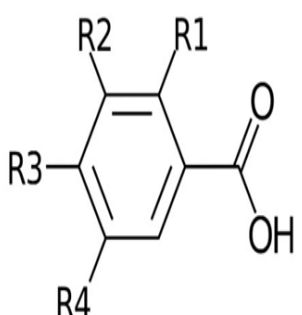
I.2.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques ou encore acides-phénols, présents dans tous les fruits et légumes, sont les principaux polyphénols retrouvés dans l'alimentation. On distingue deux classes d'acides phénoliques : les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (El Gharra, 2009).

- **Acides hydroxybenzoïques**

Sont des dérivés de l'acide benzoïque de structure C_6-C_1 possédant au moins une fonction carboxyle et un hydroxyle phénolique. Ces composés sont très communs sous forme libre et sous forme conjuguée d'ester ou d'hétéroside. Les principaux acides phénoliques benzoïques sont l'acide p-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, vanillique, gallique, salicylique et gentisique (Bruneton, 2009 ; Crozier *et al.*, 2006) (Tab.2).

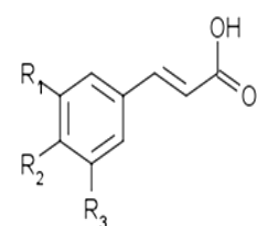
Tableau 2 : structure de quelques hydroxybenzoïques (Macheix *et al.*, 2005)

Acides hydroxybenzoïques					
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Formule
Acide parahydroxybenzoïque	H	H	OH	H	
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H	
Acide vanillique	H	OCH ₃	OH	H	
Acide gallique	H	OH	OH	OH	
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	
Acide salicylique	OH	H	H	H	
Acide gentisique	OH	H	H	OH	

• Acides hydroxycinnamiques

Sont des dérivés de l'acide cinnamique aussi connus sous le nom de phénylpropanoïdes. Leur structure en C₆-C₃ est caractérisée par un squelette de base constitué d'un noyau benzénique et d'une chaîne aliphatique à 3 carbones avec un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les principaux acides hydroxycinnamiques sont l'acide férulique, p- coumarique, caféique et sinapique (Matou, 2019) (Tab.3).

Tableau 3 : composés hydroxycinnamiques (Macheix *et al.*, 2005)

Acides hydroxycinnamiques				
	R ₁	R ₂	R ₃	Formule
Acide paracoumarique	H	OH	H	
Acide caféique	OH	OH	H	
Acide férulique	OCH ₃	OH	H	
Acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃	
E-anéthole	H	OCH ₃	H	
Acide 3,4-diméthoxycinnamique	OCH ₃	OCH ₃	H	

I.2.1.2. Lignines

Ces composés de haut poids moléculaires contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation de trois alcools phénylpropéniques, possédant une structure de type $(C_6-C_3)_n$ (Nkhili, 2009) (Fig.6).

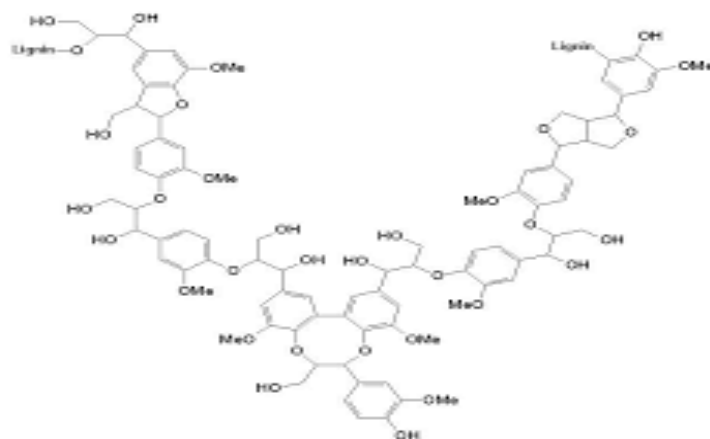


Figure 6 : structure des lignines (Manchadon, 2006)

I.2.1.3. Lignanes

Les lignanes sont principalement localisées dans les tissus lignifiés notamment les écorces, les tiges, les racines et les graines. Ce sont des phytonutriments largement distribués dans le règne végétal possédant une structure de type $(C_6-C_3)_2$, composés dimères formés par le couplage de deux fragments monolignos (C_6-C_3) dérivés de la voie des phénylpropanoïdes (El Gharras, 2009) (Fig.7).

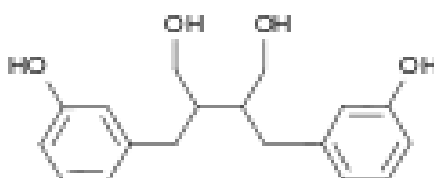


Figure 7 : structure des lignanes (Manchadon, 2006)

I.2.1.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure $C_6-C_3-C_6$. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes. Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruit, thé et vin...). Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavonones et les anthocyanidines (Achat, 2013) (Fig.8).

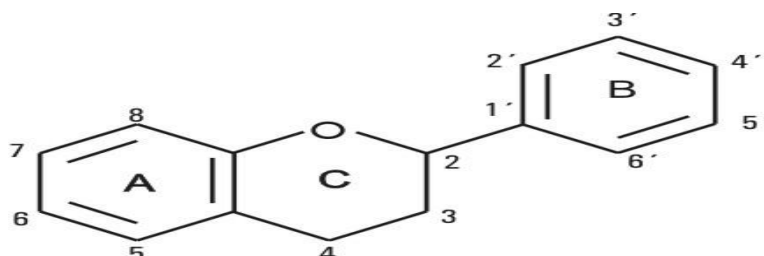
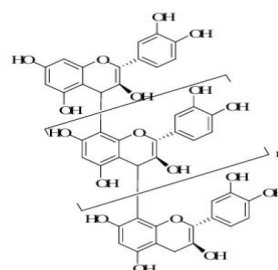
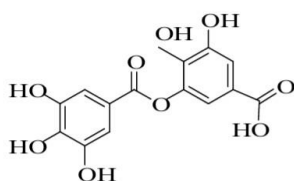


Figure 8 : structure des flavonoïdes (Ghedira, 2005)

I.2.1.5. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da, capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Il existe deux grands groupes qui diffèrent à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 2009 ; Medjdoub, 2013 ; Legrand, 2015) (Fig.9).



A : Structure des tannins hydrolysables

B : Structure des tannins condensés

Figure 9 : structure des tannins hydrolysables et des tannins condensés (Talbi, 2015)

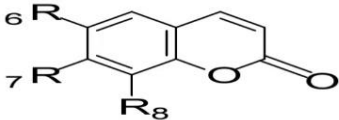
I.2.1.6. Stilbènes

Les stilbènes ont une structure en $C_6-C_2-C_6$: deux cycles benzéniques sont reliés par deux carbones, eux- même unis par une double liaison. Ils existent généralement sous la forme (trans-1,2-diphényléthylène E-Stilbène). Ils peuvent être libres ou hétérosidiques, parfois polymériques. Ils sont présents dans de nombreuses familles de végétaux supérieurs (la vigne, l'arachide...). Les bis (bibenzyls), rares chez les végétaux, sont caractéristiques des hépatiques (Sahli, 2017).

I.2.1.7. coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C_6-C_3 , appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Belyagoubi, 2012) (Tab.4).

Tableau 4 : principaux types des coumarines (Macheix et al., 2005)

Principaux types des coumarines				
	R ₆	R ₇	R ₈	formule
Umbelliférol	H	OH	H	
Aescultol	OH	OH	H	
Scopolétole	OCH ₃	OH	H	
Fraxétole	OCH ₃	OH	OH	
Daphnétole	H	OH	OH	

I.2.2. Biosynthèse de polyphénols

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies métaboliques, la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate.

I.2.2.1. Voie de l'acide shikimique

La voie de l'acide shikimique est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques. Ce sont des métabolites primaires qui servent de précurseurs pour de nombreux

produits naturels tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, et les alcaloïdes (**Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011**).

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont respectivement produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques. Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. Ce sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique (**Chaouche, 2014**).

I.2.2.2. Voie de l'acétate / malonate

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Chaouche, 2014**).

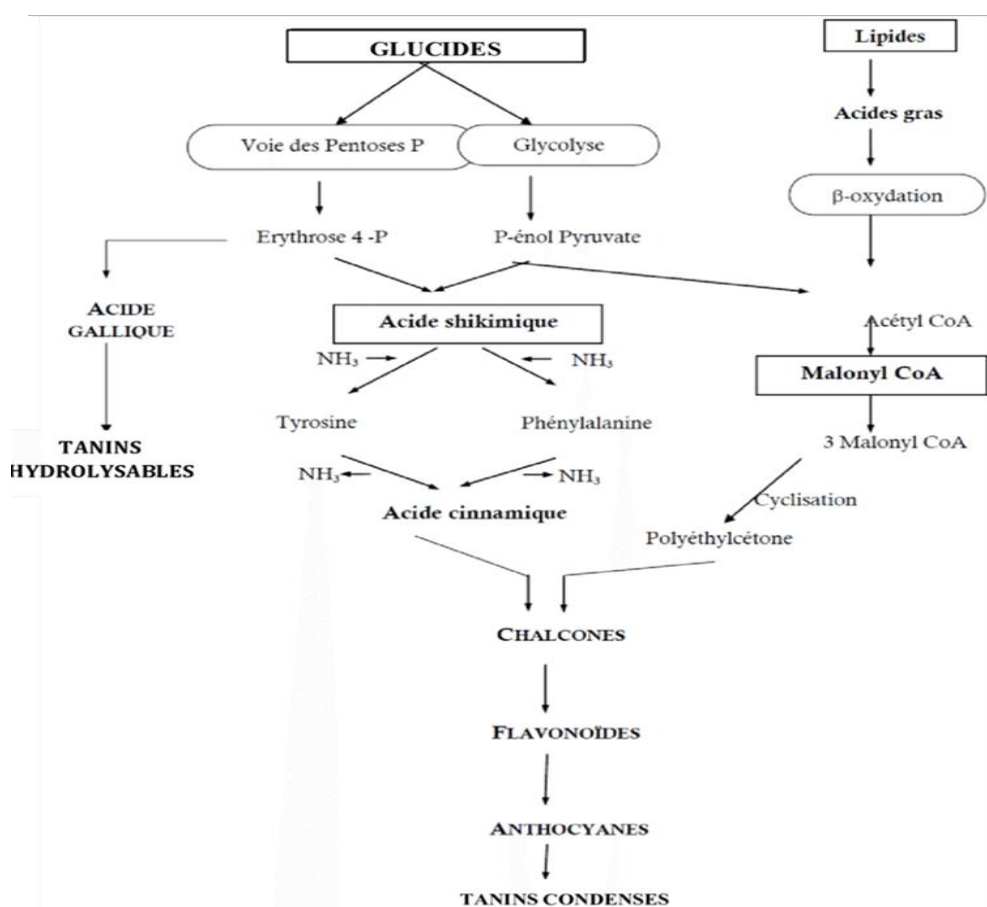


Figure 10 : représentation des voies de biosynthèse des composés phénoliques (Chaouche, 2014)

I.3. Lithiase urinaire

La lithiase urinaire ou formation des calculs dans les voies urinaires, est une pathologie fréquente dans la plupart des pays développés (**Khitri et al., 2016**). Elle a un impact économique et sanitaire négatif sur la population car elle affecte préférentiellement une population active (**Sadki et Atmani, 2017**). La majorité des calculs relève de mauvaises habitudes alimentaires mais certains sont la conséquence des maladies métaboliques génétiques ou acquises (**Cotton et al., 2014**).

I.3.1. Définition

Le terme de lithiase anciennement appelé « maladie de la pierre » désigne la maladie résultant de la formation de calculs dans les reins ou les voies urinaire. Le mot lithiase vient du grec *lithos* (pierre) et celui de calcul du latin *calculus* (**Daudon et al., 2012**).

I.3.2. Epidémiologie

La lithiase urinaire est considérée comme une maladie multifactorielle fréquente, qui résulte de l'interaction entre les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques de susceptibilité (Fig.11). Les études épidémiologiques ont identifié divers facteurs de risque, qui incluent la race, le sexe, l'indice de masse corporelle, l'alimentation, le volume de boisson, certains médicaments, la localisation géographique et les changements climatiques (**Knoll, 2010 ; Hess, 2011 ; Curhan, 2011**).

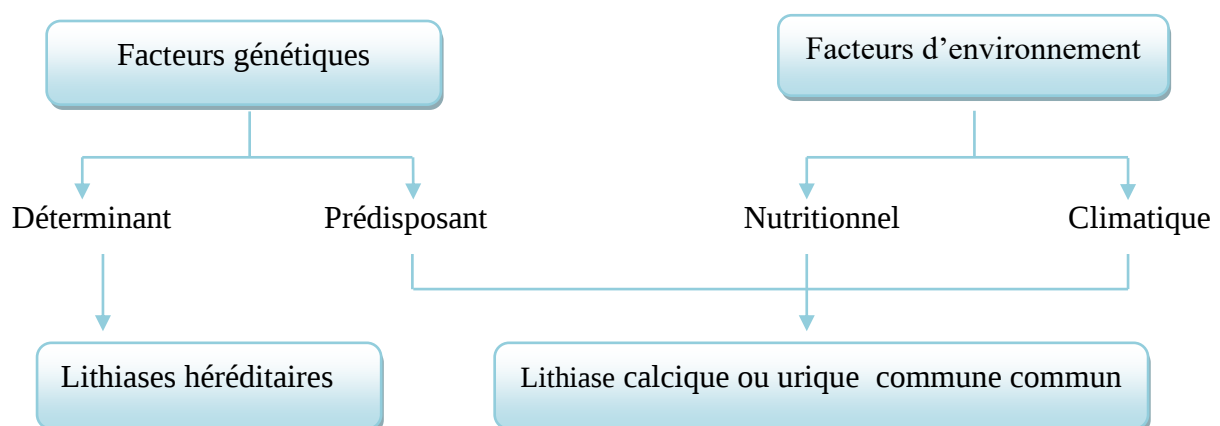


Figure 11 : interaction entre les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques de susceptibilité (**Abbassene, 2019**)

L'incidence qui désigne le nombre total de cas présents à un moment donné dans une population, très souvent, ne représente que l'incidence hospitalière et n'incluse pas la fréquence des cas qui ne font pas recours à l'hospitalisation surtout à la première manifestation clinique. Même remarque a été faite pour la prévalence qui évalue le nombre de nouveaux cas découverts chaque année dans la même population. Des études de prévalence fondées sur des enquêtes de population ont été entreprises en de nombreux endroits du monde (Tab.5) (**Besancenot, 1992 ; El Kabbaj *et al.*, 2000 ; Oussama *et al.*, 2000 ; Brikowski *et al.*, 2008**).

**Tableau 5 : prévalence de la maladie lithiasique dans différents pays du monde
(Besancenot, 1992 ; Tosukhowong *et al.*, 2007)**

Pays	Etats-Unis	Grande-Bretagne	Suède	Allemagne	Taiwan	France
%	8.90	9.10	6.20	9.80	9.75	9.90

I.3.3. Lithogénèse urinaire

Le terme de lithogénèse regroupe l'ensemble des processus qui conduisent à la formation d'un calcul dans les voies urinaires. Le calcul est une agglomération de cristaux liés par une matrice organique (**Khan et Hackett, 1993 ; Ryall *et al.*, 2005**).

I.3.4. Etapes de lithogénèse

La lithogénèse comporte plusieurs phases qui s'expriment successivement ou simultanément (Fig.12).

On peut distinguer deux grandes étapes : La cristallogénèse et la calculogénèse (**Ghazal, 2016**). La cristallogénèse correspond à la formation des cristaux à partir des substances initialement dissoutes dans les urines et ne constitue pas en soi un processus pathologique (**Ryall *et al.*, 2005**). La calculogénèse proprement dite se définit généralement par la rétention de la croissance des cristaux et agrégats cristallins à un niveau quelconque de l'appareil urinaire (**Daudon *et al.*, 2008**).

I.3.4.1. Cristallogenèse

I.3.4.1.1. Sursaturation des urines

Elle est définie par un excès de concentration d'une substance dissoute dans l'urine par rapport aux capacités solvants de celle-ci. Dans des conditions physicochimiques définies (température, pression, pH...) (**Daudon et al., 2008**).

I.2.4.1.2. Germination cristalline (nucléation)

Lorsque le niveau de sursaturation est suffisant, les molécules dissoutes se rassemblent pour constituer des germes cristallins, premier stade des particules solides conduisant à la formation de calculs (**Daudon et al., 2008**).

I.3.4.1.3. Croissance cristalline

Les cristaux grossissent par captation de nouvelles molécules ou de nouveaux ions de la substance en sursaturation pour former des particules dont la taille varie du micromètre au dixième de millimètre (**Dalibon, 2015**).

I.3.4.1.4. Agrégation des cristaux

C'est un processus rapide, elle peut de ce fait, engendrer des particules volumineuses dans un délai très court. Les agrégats formés par leur forme irrégulière sont retenus plus facilement dans les voies urinaires (**Daudon et al., 2008**).

I.3.4.1.5. Agglomération cristalline

L'agglomération des cristaux implique des macromolécules urinaires protéiques chargées négativement, pouvant se fixer à la surface des cristaux et servant de point d'ancrage à de nouveaux cristaux (**Dalibon, 2015**).

I.3.4.2. Calculogenèse

I.3.4.2.1. Rétention des particules cristallines

Des particules cristallines formées au cours des différentes phases de la cristallogenèse vont être retenues dans le rein ou les voies urinaires et vont croître pour former un calcul (**Daudon et al., 2008**).

I.3.4.2.2. Croissance de calcul

Lorsque la sursaturation est liée à une anomalie métabolique de forte amplitude, le calcul qui en résulte est généralement pur. Dans le cas contraire, il peut fixer des composants divers au gré des sursaturations urinaires, ce qui explique le fait que la plupart des calculs urinaires renferment plusieurs espèces cristallines (Daudon *et al.*, 2008).

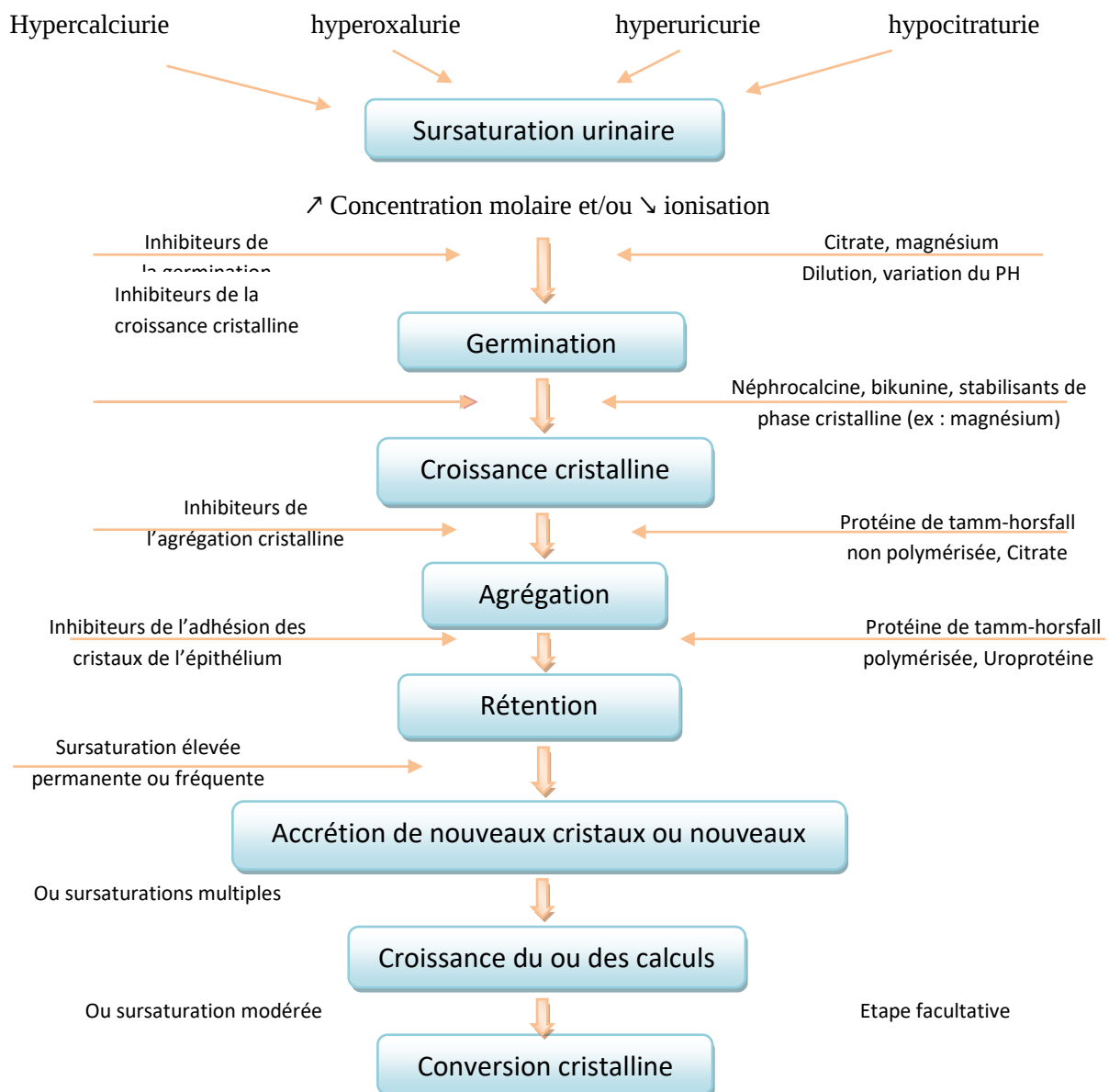


Figure 12 : principales étapes de la lithogénèse (Hannache, 2014)

I.3.5. Différents types de calculs

La classification des calculs est en fonction de leur nature chimique, admise par les différentes sociétés savantes d'urologie. Environ 10% des calculs sont constitués d'un seul composant chimique (**Daudon et al., 2004**).

Les principaux types de calculs sont les suivants :

I.3.5.1. Calculs minéraux

I.3.5.1.1. Oxalate de calcium

C'est le composant prédominant de la plupart des calculs (80% des calculs) (**Rathod et al., 2014**), généralement de petite taille, irréguliers, très durs spéculés ou muriformes, ils sont radio-opaques (**Hannache, 2014**).

Trois espèces cristallines distinctes de l'oxalate de calcium peuvent être observées dans les urines humaines, qui sont, par ordre de fréquence :

➤ Forme monohydratée ou whewellite

Stable thermodynamiquement (**Basavaraj et al., 2007**), oxalo-dépendante, se formant dans des urines hyperoxaluriques (**Graf et Féraïlle, 2000**) ces calculs sont hexagonaux ou présentent une forme de dendrite, et sont plus denses et plus lisses que ceux d'oxalate de calcium dihydraté (**Debré et al., 2004**) (Fig.13).



A : calculs de whewellite type Ia

B : calculs de whewellite type IIa

Figure 13 : image représente les calculs whewellite A : type Ia. B : type IIa
(**Daudon, 2004**)

➤ **Forme dihydratée ou weddellite**

Cette forme est fréquente dans les urines hypercalciuriques, elle se cristallise typiquement avec une forme tétragonale bipyramidique (**Graf et Féraïlle, 2000**) (Fig.14).



A : calculs weddellite type Ic

B : calculs de weddellit type IIb

Figure 14 : image représente les calculs weddellite. A: type Ic. B: type IIb (**Daudon, 2004 ; Oulghoul, 2015**)

➤ **Forme trihydratée**

Elle présente une forme triclinique ou forme des aiguilles (**Bimbenet et al., 2002**).

I.3.5.1.2. Phosphates de calcium

Ces calculs sont radio-opaque et les plus rare, jaunes ou bruns généralement durs, de taille variable en radiographie, ils sont disposés en couches concentriques lamellaires (**Debré et al., 2004**) (Fig.15.A).

Ils se forment lorsque le pH est alcalin, supérieur à 7 (**Beygrine, 2011**). La lithiase phosphocalcique se présente principalement sous la forme de deux espèces moléculaires, la carbapatite et la brushite. Dans la majorité des cas, la carbapatite (phosphate de calcium carbonaté) est associée à l'oxalate de calcium dihydraté, et signe une hypercalciurie. Lorsqu'elle est associée à la struvite (phosphate ammoniacomagnésien), elle indique une infection urinaire (**Graf et Féraïlle, 2000**).

I.3.5.1.3. Phosphate ammoniaco-magnésien ou struvite

Ces calculs sont jaunes, friables, souvent coralliformes (Fig.15. B). Ils se développent en milieu alcalin infecté par des germes types *Protéus*, *klebsiella*, *Pseudomonas* et *Enterobacter*,

ces derniers produisent l'uréase en milieu alcalin et sont radio opaques. Ces cristaux s'observent à pH 6,6-9,2 et ont des formes très diverses. Le sédiment est souvent abondant et blanchâtre (**Daudon, 1995**).

I.3.5.2. Calculs organiques

I.3.5.2.1. Acide urique

Ces calculs sont arrondis, lisses, verts foncé ou rouges brun, très durs, souvent multiples et de taille variable (Fig.15.C). Ils sont radio-transparent quand ils sont purs, sauf l'urographie intraveineuse permet de le mettre en évidence (**Debré et al., 2004**).

Ces calculs se développent à cause d'une l'hyperacidité urinaire pH < 5,5 (**Hambuer et al., 1980**), souvent accompagnée d'une diurèse insuffisante (**Graf et Féraïlle, 2000**).

L'éthologie principale de la formation de ces calculs est l'hyperuricurie, souvent secondaire à une uricémie, une autre cause plus rare, est la cytolyse à une chimiothérapie.

I.3.5.2.2. Cystine

Très rares, ils sont dus à une cystinurie excessive, ils sont récidivants dans la majorité des cas (**Debré et al., 2004**).

Ces calculs sont arrondis, lisses, durs, jaune clair d'apparence cireuse. Multiples ou coralliformes bilatéraux et faiblement radio-opaques, d'aspect homogène (Fig.15.D) (**Oulghoul, 2015**).

I.3.5.3. Calculs médicamenteux

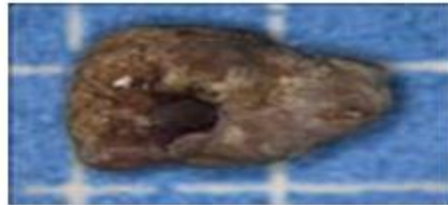
Certains médicaments sont susceptibles de cristalliser dans les tubules rénaux, et de provoquer une insuffisance rénale ou une lithiase. L'analyse du calcul permet alors d'identifier le médicament responsable et/ou ses métabolites, associés parfois à d'autres composants de l'urine. Actuellement, l'indinavir est l'une des substances les plus fréquemment impliquées dans les lithiases médicamenteuses, alors que des antibactériens (sulfadiazine, amoxicilline, etc.) sont trouvés occasionnellement (**Graf et Féraïlle, 2000**).



A : calcul de phosphate de calcium



B : calcul de struvite



C : calcul d'acide urique



D : calcul de cystine

Figure 15 : différents types des calculs A : calcul de phosphate de calcium ;
B : calcul de struvite ; C : calcul d'acide urique ; D : calcul de cystine (Sekkoum, 2011)

I.3.6. Méthodes d'analyses des calculs urinaires

L'analyse du calcul urinaire est l'étape primordiale de l'enquête étiologique chez un patient lithiasique. Elle est indispensable, car permet au clinicien de poser le bon diagnostic et donc de mettre en route un traitement thérapeutique adéquat (Abbassene, 2019).

I.3.6.1. Méthodes chimiques

Ces techniques classiques conventionnelles présentent plusieurs inconvénients dans l'analyse des calculs urinaires (Nayer, 2002) :

- ❖ Ne permettent pas d'analyser les petits calculs à cause de la quantité de prise d'échantillon nécessaire à cette technique (Herring, 1962) ;
- ❖ Ne donnent aucune information sur le système cristallin (Daudon, 2000) ;
- ❖ Ne différencie pas entre les zones de nucléations ;
- ❖ Les réactifs utilisés ne supportent pas une longue durée de conservation ;
- ❖ Le pourcentage d'erreur est important dans ces techniques (Nayer, 2002).

I.3.6.2. Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une technique basée sur les différences dans les rapports de distribution des composants d'un mélange entre une phase stationnaire (solide) et une phase mobile (non miscible). Cette technique peut être appliquée dans l'analyse des calculs organiques (Acide urique, Xantine, ...), elle présente quelques inconvénients comme l'inadéquation à l'analyse des calculs minéraux, l'appareillage coûteux et un protocole analytique long et délicat mais elle peut être utilisée comme méthode complémentaire de l'analyse (**Ochmanski *et al.*, 1999**).

I.3.6.3. Méthodes cristallographiques

Avec un microscope optique à polarisation, il est possible d'établir la présence du matériel cristallin et d'obtenir les constantes optiques qui sont utiles dans son identification, le microscope à polarisation peut également être le seul moyen disponible pour observer et identifier des cristaux. Quelques propriétés optiques qui peuvent être déterminées sont le système cristallin, le signe optique, l'indice de réfraction, l'angle de l'extinction, et la présence de la biréfringence (**Rosenfeld, 2001 ; Kaloustian *et al.*, 2002**).

Ces propriétés peuvent être comparées aux données connues, ainsi l'utilisation appropriée du microscope à polarisation exige beaucoup de compétence, de patience et d'expérience. La microscopie à polarisation n'est pas applicable à l'analyse des calculs qui contiennent seulement les composés amorphes, tels que les phosphates amorphes de calcium et les protéines, ce qui limite la validité de cette méthode (**Kaloustian *et al.*, 2003**).

I.3.6.4. Méthodes spectroscopiques (Spectroscopie UV-Visible)

La spectrophotométrie UV-Visible est une méthode spécifique et avantageuse pour la détermination des médicaments et/ou des métabolites des médicaments dans les calculs urinaires. Leur intérêt se voit dans sa capacité de détecter et identifier les composants du calcul qui sont solubles dans l'eau, des alcools, des acides minéraux dilués et d'autres solvants. Les composés solubilisés peuvent être détecté et identifier avec des concentrations aussi faibles que des microgrammes par millilitre, lui faisant une des plus sensibles de toutes les méthodes spectroscopiques pour l'analyse des calculs urinaires (**Houlgatte et Fournier, 2004**).



Chapitre II
Matériel et méthodes

Notre étude s'inscrit dans l'objectif de la caractérisation phytochimique de l'extrait végétal des racines de *Silybum marianum*, et de l'évaluation de son pouvoir antioxydant et antilithiasique. Elle englobe deux aspects :

- Le premier est d'ordre phytochimique, comporte d'un côté une extraction et une mise en évidence et d'un autre côté une quantification des composés phénoliques ;
- Le second aspect est consacré à une évaluation de deux activités biologiques, l'activité antioxydante et l'activité antilithiasique.

Ces deux parties sont élaborées au niveau du laboratoire de Biologie des Populations de la Faculté des sciences de l'Université M'hamed Bougara de Boumerdès et le Centre de Recherche et de Développement (CRD).

Vu la période de la crise sanitaire du COVID-19 cette présente étude n'a pas été réalisée.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

- Les racines de chardon Marie ;
- Les urines humaines.

II.1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des racines de l'espèce *Silybum marianum*, la cueillette d'échantillon a été faite avant la période de floraison au mois de Février 2020 dans la région d'EL-karma, située à 2.5 Km à l'est de la wilaya de Boumerdes.

II.1.3. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé est composé de verrerie, d'équipements et d'appareil. Il comprend aussi un ensemble de réactifs et de produits chimiques.

II.2. Méthodes

II.2.1. Séchage, broyage et conservation

Après récupération de la plante, les racines ont été bien nettoyées et séchées naturellement à l'ombre dans un endroit sec et aéré durant 15 jours. Après séchage, le matériel végétal a été finement broyé jusqu'à l'obtention d'une poudre afin de procéder à l'extraction. Par la suite, la poudre obtenue a été conservée dans des flacons fermés, à l'abri de l'humidité et de la

lumière jusqu'au moment d'utilisation. Les différentes étapes du travail sont résumées dans la figure 11.

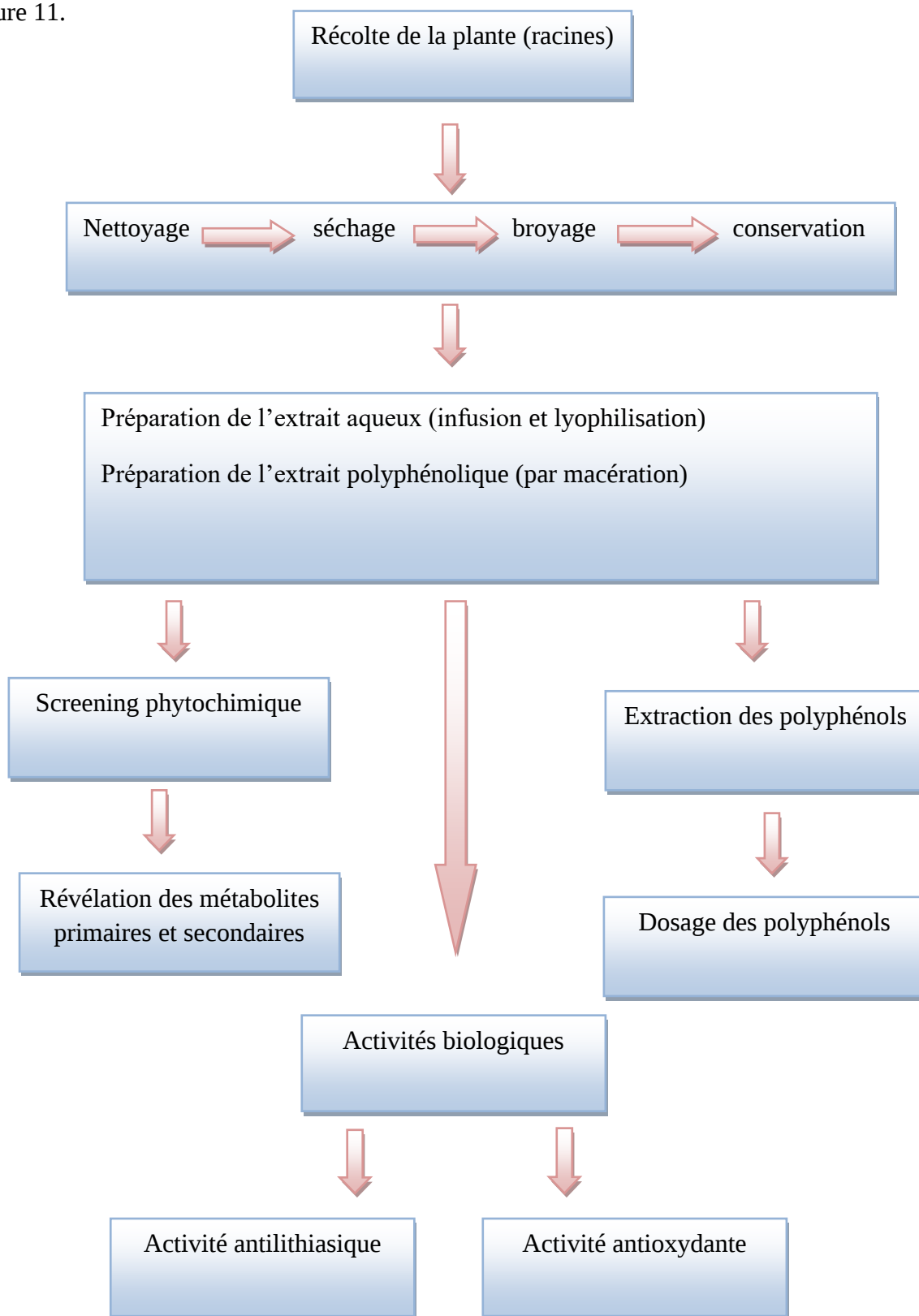


Figure 16 : schéma récapitulatif des différentes étapes du travail

II.2.2. Screening phytochimique

Le test phytochimique réalisé sur la plante de chardon Marie est un test qualitatif qui permet de mettre en évidence les substances bioactives (les métabolites primaire et secondaire) de cette plante basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. Ces tests s'effectuent soit sur la poudre de la plante soit sur son infusé à 5%. Les méthodes d'identification utilisées dérivent de celle décrites par **Paris et Nothis (1978)**.

- **Préparation de l'infusé à 5%**

5g de poudre végétale ont été mélangés avec 100 ml d'eau distillée bouillante. Le mélange est filtré après 15 à 20 min. puis on ajuste à 100 ml d'eau distillée pour préparer l'infusé à 5 % des racines de chardon Marie.

- **Identification des tanins totaux**

A 5 ml d'infusé, on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3) à 5%. La réaction positive donne une couleur bleu-noir en présence de tanins.

- **Identification des tanins galliques**

A 5 ml d'infusé, on ajoute 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 . La coloration bleue foncé indiqué la présence des tanins galliques.

- **Identification des tanins catéchiqiques**

Pour 15 ml de l'infusé, on ajoute 7 ml de réactif de Stiansy. La réaction positive donne une coloration rouge.

- **Identification des glucosides**

On ajoute quelque goutte de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 2g de la poudre végétale. La présence des glucosides se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge brique.

- **Identification des coumarines**

2g de poudre végétale et 20 ml d'alcool éthylique sont laissés bouillir à reflux pendant 15 min puis filtrer. On ajoute 5 gouttes d'hydroxyde de potassium (KOH) 10% et quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) 10% au filtrat obtenue. La présence des coumarines donne la formation des troubles.

- **Identification des sénosides**

On introduit respectivement 2,5g de poudre végétale, 50 ml d'eau distillée et 2 ml d'HCl concentré. Le mélange obtenu est chauffé au bain Marie pendant 15 min. Après refroidissement le mélange est agité avec 40 ml d'éther qui sera par la suite séparé, séché avec le sulfate de sodium anhydre et évaporé à siccité. Au résidu refroidi sont ajoutés 5 ml d'ammoniaque 50% générant une coloration jaune ou orange. L'apparition d'une couleur violette indique la présence des sénosides après chauffage de la solution au bain Marie pendant 2 min.

- **Identification anthocyanes**

Quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) à 1 ml d'infusé, une coloration rouge indique la présence d'anthocyane.

- **Identification alcaloïdes**

5 g de poudre végétale sont humecté avec l'ammoniaque 50% ensuite pendant 24 heures macérés dans 50 ml du mélange éther/chloroforme (3 volumes/1 volumes). Le filtrat récupéré est épuisé par HCl 2N, et enfin on ajoute quelques gouttes de réactif de Dragendroff. La présence d'alcaloïdes se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge.

- **Identification des flavonoïdes**

On mélange 5 ml d'infusé, 5 ml d'HCl, 1 ml d'alcool iso-amylque et un coupon de zinc. La coloration rouge orangée indique la présence des flavonoïdes.

- **Identification du mucilage**

1 ml d'infusé est ajouté à 5 ml d'éthanol absolu, le mélange est laissé 10 min. L'apparition d'un précipité floconneux indique la présence du mucilage.

- **Identification de l'amidon**

Dans un bain Marie, chauffé 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à l'ébullition. Puis on ajouter la solution d'amidon. La présence d'amidon se manifeste par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

- **Identification des quinones libres**

2g de poudre sont humectés par 2 ml d'HCl et 20 ml de chloroforme. Après 3 heures, le mélange est filtré puis agité en présence de 5 ml d'ammoniaque 50%. La présence des quinones libres donne une coloration rouge.

- **Identification des iridoïdes**

2 ml d'infusé sont chauffés en présence de quelques gouttes d'HCl concentré. La présence des iridoïdes donne une coloration bleue.

- **Identification des saponosides**

Quelques gouttes d'acétate de plomb sont ajoutées à 2 ml d'infusé. La présence des saponosides se lit sur la formation d'un précipité blanc.

II.2.3. Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols a été effectuée en utilisant la méthode décrite par **Laoufi et al. (2020)** légèrement modifiée.

La plante est lavée plusieurs fois à l'eau distillée pour la débarrasser de la poussière et des résidus de terre. Ensuite, une solution mère de la plante, à 40 g/l dans l'eau distillée bouillante, a été préparée. Après infusion durant dix minutes, la solution est filtrée sous vide et sur membrane 0,2 µm. Des solutions filles dans l'eau distillée à différentes concentrations (0,0625–1 g/l) ont été préparées.

- **Calcul du rendement de l'extraction**

Le rendement d'extraction est calculé en pourcentage du rapport de la masse de l'extrait obtenu sur la masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction selon la formule suivante :

$$R\% = (m - m_0) \times 100/m_T$$

Avec :

m : La masse du ballon après extraction ;

m₀ : La masse du ballon vide (avant l'extraction) ;

(m-m₀) : La masse de l'extrait sec ;

m_T : La masse totale de poudre végétale utilisée dans l'extraction.

II.2.4. Dosage des polyphénols totaux

- **Détermination de la teneur en polyphénols**

La quantification des polyphénols totaux est effectuée par un spectrophotomètre « Optizen 2120/U », en utilisant le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par **Wong et al. (2006)**.

- **Principe**

Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, dans une solution alcaline. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (**Charpentier et Boizot, 2006**).

- **Mode opératoire**

Une quantité de 0.5ml de chaque échantillon est prélevée dans des tubes à essai, 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) est ajouté, après 3 à 5 min d'incubation, 1ml de carbonate de sodium à 20% est additionné. L'ensemble est bien mélangé et incubé pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance de l'extrait est mesurée à 760 nm contre un blanc. Le blanc est représenté par 0,5 ml d'éthanol additionné à 1 ml du Folin-Ciocalteu et 1ml de bicarbonate de sodium 20%.

- **Expression des résultats**

Le taux de polyphénols totaux a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire établie avec des concentrations précises de l'extrait d'étalon « acide gallique », dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique par 100g de poudre végétale.

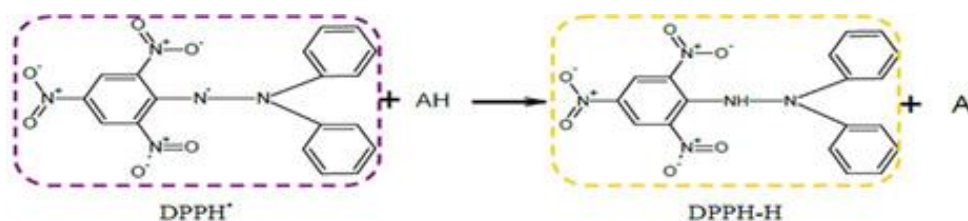
II.2.5. Tests des activités biologiques

II.2.5.1. Activité antioxydante

II.2.5.1.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

- Principe

Le 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. Le test consiste à mettre le radical DPPH de couleur violette en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical (Fig.12). La forme réduite de couleur jaune n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde (**Haddouchi et al., 2016**).



Ou AH est un composé antioxydant capable de céder un H^+ au radical DPPH.

Figure 17 : forme réduite du radical DPPH (Haddouchi et al., 2016)

- Mode opératoire

Le protocole expérimental suivi est celui de **Sanchez-Moreno et al. (1998)**. 1ml de chaque solution éthanolique des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 2 ml de la solution éthanolique du DPPH (1mM).

- Expression des résultats

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à une température ambiante.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'antioxydant, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule accordée à **Yen et Duth (1994) ; Ben rahal (2012)** :

$$I\% = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

Avec :

A_0 : Absorbance moyenne du radical seul ;

A_i : Absorbance du radical libre en présence d'antioxydant après trente minutes de contact ;

$I\%$: pourcentage d'inhibition.

II.2.5.2. Activité antilithiasique

Dans notre travail, on s'est intéressé à évaluer l'effet de l'extrait aqueux des racines de *Silybum marianum* sur la cristallisation oxalocalcique *in vitro*.

II.2.5.2.1. Mode opératoire

La méthodologie utilisée est analogue à celles de travaux antérieurs de **Laoufi et al. (2020)** sur l'étude des feuilles de la plante d'*Urtica dioica*. Les urines de 24 heures, de sujet masculin sans antécédents lithiasiques, ont été collectées et conservées dans une bouteille en plastique, sans ajout d'agent antibactérien. Une aliquote de 4 ml d'urine et de 100 µl d'infusion de la plante à différentes concentrations ($C_5 = 1$ g/l, $C_4 = 0,5$ g/l, $C_3 = 0,25$ g/l, $C_2 = 0,125$ g/l, $C_1 = 0,0625$ g/l) ont été placés dans plusieurs tubes. En parallèle, un tube sans extrait de plante est laissé comme référence. Tous les tubes sont incubés à 37 °C. La cristallisation de l'oxalate de calcium est induite par l'addition de 100 µl de solution d'oxalate de sodium à 0,1 mol/l, préalablement conservée à 37 °C. Puis, tous les tubes sont incubés à nouveau à 37 °C, pendant 30 minutes. La lecture de la densité optique (DO) de chaque échantillon se fait à 620 nm. Enfin, les échantillons ont été filtrés sous vide et sur membranes 0,2 µm. Les filtres ont été observés par microscopie électronique à balayage (MEB).

II.2.5.2.2. Observation au MEB

L'observation au MEB a nécessité une préparation préalable des échantillons afin de pallier au caractère isolant de ces derniers. Dans un premier temps, les échantillons constitués de morceaux de 1 cm de côté environ (papier-filtre) ont été collés avec de la laque d'argent sur un porte-échantillon adaptable au porte-objet du MEB. Une métallisation par pulvérisation cathodique a été ensuite réalisée afin de déposer une couche d'or d'environ 20 nm sur l'ensemble, ce qui permet l'évacuation des charges électriques lors de l'observation. Le MEB utilisé est un LEO Gemini 982 à canon à effet de champ (FEG) pouvant obtenir des images très résolues à basse tension (< 5 kV), ce qui a l'avantage d'éviter d'endommager les échantillons.

II.2.6. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été faite par le logiciel Statistica (6). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes $\pm$ ES (erreur standard). Une différence significative est représentée par un $p < 0,05$.



Chapitre III
Discussion des résultats

III.1. screening phytochimique

Les analyses phytochimiques permettent de révéler la présence ou l'absence des métabolites secondaires dans la plante à partir de son extrait, cherchons ainsi les tanins totaux, les iridoïdes, les tannins galliques, les tannins cathéchiques, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les sénosides, les quinones, les coumarines et les mucilages.

Les résultats récents de **Benchachoua (2019)** réalisés sur les extraits des différentes parties de *Silybum marianum* obtenus par macération et décoction ont révélé la présence de cinq groupes de composés bioactifs dans tous les extraits, la présence remarquable des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des stérols, des triterpènes, et des glucosides cardiotoniques. Les anthraquinones sont présentes en faible quantité, et un résultat négatif indique l'absence totale de saponosides.

Akhtar et al. (2015) ont montré que les résultats du screening phytochimique effectué sur l'extrait aqueux obtenu par macération des parties aériennes de la plante *Silybum marianum* révèlent la présence de tanins et d'alcaloïdes et l'absence des terpènes, des glucosides, des saponines, des quinones, et des coumarines.

Cette différence dans la richesse en métabolites est attribuée à l'adaptation évolutive liée étroitement aux conditions biotiques (l'espèce elle-même) et abiotique (milieu). Selon **Fadili et al. (2015)**, les conditions climatiques (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires influencent la composition chimique à différents lieux de croissance, tout au long du développement de la plante.

Ces différences peuvent être dues à certains facteurs écologiques, en particulier l'âge de la plante, la période du cycle végétatif, et les caractères édaphiques des sols ou même à des facteurs génétiques (**Athamena, 2009**).

Ces études ont également montré l'existence d'une réelle biodiversité moléculaire, qui confère à la plante des vertus médicinales importantes à valorisées. Parmi les métabolites secondaires mis en évidence, les flavonoïdes ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales ; antioxydantes (**Iserin, 2001**), anti-inflammatoires, inhibiteurs d'enzymes, antiallergiques, antiulcérogènes, et effets protecteurs vasculaires (**Ghedira, 2005**), et antimicrobiens (**Cushnie et Lamb, 2005**). Les tanins avec leurs propriétés de former des complexes avec les protéines, présentent des propriétés anti-diarrhétiqes, antibactériennes et antifongiques (**Bruneton, 2009**). Les anthocyanes sont des puissants antioxydants (**Iserin, 2001**). Les coumarines ont des propriétés antipyrétiques, analgésiques, sédatives, antioedémateuses et anti-convulsivantes, ainsi qu'une capacité de

favoriser l'expulsion des gaz intestinaux entraînant une diminution des ballonnements et des flatulences (**Mpondo et al., 2015**).

III.2. Dosage des polyphénols

Le taux des polyphénols a été estimé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer le taux des polyphénols. L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans cette méthode.

Le travail réalisé par **Alaoui (2016)** a révélé un taux des polyphénols dans l'extrait éthanolique des graines de *Silybum marianum* récoltées en mois d'octobre au bord des champs à Rabat égale à 45.31 mg EAG/g MS.

Les résultats de **Ben rahal (2012)** ont montré un taux de polyphénols égale à 14.7 mg EAG/g dans l'extrait des graines de *Silybum marianum* récoltées en mois de mai jusqu'au mois d'août au sud de la Tunisie obtenu par le soxhlet, une méthode classique pour l'extraction solide-liquide.

Ces différences notées sont probablement dues à la partie de la plante utilisée, le type et la concentration du solvant, la méthode d'extraction, la période et la région de récolte (**Benchachoua, 2019**).

III.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Le test 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. L'objectif du protocole mis en œuvre est d'évaluer la capacité de chaque échantillon à réduire le radical stable qui est le DPPH. En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables (**Benchachoua, 2019**).

La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 515-518 nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet. Il se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir anti radicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (**Molyneuxs, 2004**).

Selon les résultats de **Benchachoua (2019)** l'extrait aqueux des feuilles de *Silybum marianum* obtenu par macération a donné une IC50 de 133.75 µg /ml. Par contre les résultats d'**Akhtar et al. (2015)** rapportent un pouvoir antioxydant assez intéressant de l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante *Silybum marianum* avec une IC50 de 25 µg /ml.

La comparaison entre ces deux études est résumée dans le tableau 6.

Tableau 6: tableau comparatif des études réalisées sur le pouvoir antioxydant de *Silybum marianum*

Nom de la plante	La partie utilisée	Solvant d'extraction	Méthode d'extraction	Résultats IC50 (µg/ml)	Références
<i>Silybum marianum</i>	Feuilles	Eau	Macération	133,75±0,75	Benchaachoua (2019)
<i>Silybum marianum</i>	Partie aérienne	Méthanol	Macération	25	Akhtar et al. (2015)

Cette différence entre les résultats peut être due à la méthode d'extraction, aux solvants d'extraction ou expliquée par la composition, la teneur en composés phénoliques et respectivement l'activité antioxydante qui varient selon la nature des groupements fonctionnels (**Benchaachoua, 2019**).

III.4. Evaluation de l'activité antilithiasique

Les travaux réalisés par **Laoufi et al. (2020)** sur l'extrait polyphénolique des feuilles d'*Urtica dioica* ont montré la disparition complète de l'oxalate de calcium monohydraté Whewellite suite à l'ajout de l'extrait végétal et ce à toutes les concentrations prises. On constate que l'extrait de la plante pourrait contenir des substances inhibitrices de la croissance de l'oxalate de sodium monohydraté. Cette propriété d'*Urtica dioica* pourrait être très intéressante dans la prévention des lithiases oxalocalcique. Cependant, les cinq échantillons en présence de l'extrait de la plante contiennent des cristaux de weddellite, ce qui a permis de constater que l'infusion d'*Urtica dioica* a un effet inducteur de la cristallisation de l'oxalate de calcium dihydraté dans des urines de sujets sains, puisque sa présence à concentration élevée a eu pour effet l'augmentation du nombre de cristaux. Cependant, la seule présence de cristaux dans les urines est une condition insuffisante pour développer un calcul urinaire, puisque toutes les urines peuvent en contenir. En outre, la présence d'agrégats cristallins de weddellite, en présence de l'extrait aqueux de la plante, quelle que soit la concentration, peut être un indice d'un déficit en inhibiteurs de cristallisation qui s'ajoute à la sursaturation du milieu. Dans ce modèle biologique qui est l'urine totale, *Urtica dioica* a montrée des propriétés

controversées, elle est d'une part inhibitrice de la cristallisation de l'oxalate de calcium monohydrate, et présente d'autre part un effet promoteur amoindri, à des concentrations diluées, sur la cristallisation de la Weddellite (Laoufi *et al.*, 2020).

Les travaux menés par **Atmani et Khan (2000)** afin d'évaluer l'efficacité d'un extrait de *Herniaria hirsuta* sur la cristallisation de l'oxalate de calcium *in vitro*, ont révélé que l'extrait végétal a favorisé la précipitation des particules d'oxalate de calcium dans l'urine totale. Les observations au MEB ont montré qu'il y avait plus de cristaux, mais plus petits, avec des concentrations croissantes d'extrait. Ces résultats ont été codés dans une expérience indépendante de nucléation, qui a montré que l'extrait contenait des agents nucléateurs. L'extrait d'*Herniaria hirsuta* induit plus de cristaux dans l'urine totale, ce qui réduit la sursaturation et la taille des particules. Cette propriété est donc avantageuse pour prévenir la formation de calculs urinaires, en induisant l'excrétion des petits cristaux et réduire le risque de leur rétention dans les voies urinaires. De plus, l'extrait de la plante a favorisé la formation de l'oxalate de calcium dihydraté plutôt que de cristaux monohydratés, donc il peut contenir des substances qui inhibent la croissance des cristaux whewellite. Il peut également contenir des substances qui inhibent l'agrégation des cristaux de l'oxalate de calcium. Ces propriétés de *Herniaria hirsuta* pourraient être bénéfiques pour prévenir la formation de calculs rénaux. Une comparaison entre ces deux études est résumée dans le tableau 7.

Tableau7 : tableau comparatif des études réalisées sur l'effet de l'*Urtica dioica* et l'*Herniaria hirsuta* sur la cristallisation oxalocalcique

Nom de la plante	La partie utilisée	Méthode d'extraction	Résultats	Références
<i>Urtica dioica</i>	Feuilles	Infusion	Inhibe la cristallisation de l'oxalate de calcium monohydraté - Favorise la cristallisation de l'oxalate de calcium dihydraté	Laoufi <i>et al.</i> (2020)
<i>Herniaria hirsuta</i>	La plante entière	Décoction-lyophilisation	- Favorise la nucléation des cristaux - Inhibe la formation de l'oxalate de calcium monohydraté - Favorise la formation de l'oxalate de calcium dihydraté	Atmani et Khan (2000)

Malgré la différence de plante, de la partie utilisée et de la méthode d'extraction, on remarque que les résultats constatés sont presque les mêmes. Les deux extraits végétaux sont inhibiteurs de l'oxalate de calcium monohydraté, et promoteurs de l'oxalate de calcium dihydraté, de plus l'*Herniaria hirsuta* favorise la nucléation des cristaux.



Conclusion et perspectives

Dans le but de contribuer à l'évaluation du pouvoir antioxydant et antilithiasique des racines de chardon Marie (*Silybum marianum*), la présente étude a été menée à partir de laquelle une caractérisation phytochimique a été effectuée, suivie d'une quantification des polyphénols totaux ainsi qu'une évaluation des deux activités biologiques.

L'estimation qualitative des différentes parties de *Silybum marianum* selon les précédentes études a montré la richesse de cette plante en flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, stérols, triterpènes, et en glucosides cardiotoniques.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adaptant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu réalisés par les précédentes études a révélé un taux très important des polyphénols dans l'extrait des graines de chardon Marie.

L'activité antioxydante des extraits de *Silybum marianum* a été évaluée par méthode de piégeage de radical libre DPPH. Les résultats réalisés par les précédentes études sur l'extrait des feuilles de *Silybum marianum* ont montré que l'extrait aqueux possède une activité antioxydante relativement faible par rapport au standard, contrairement aux résultats réalisés sur l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante qui rapportent un pouvoir antioxydant assez intéressant.

Il était souhaitable de faire une étude sur l'effet de l'extrait aqueux des racines de chardon Marie sur la cristallisation oxalocalcique, mais vue la période de la crise sanitaire du COVID-19 cette présente étude n'a pas été réalisée.

Afin de compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Valoriser l'extrait de la plante par des tests sur autres activités biologiques ;
- Donner plus d'importance aux racines de chardon Marie puisque à notre connaissance, c'est la première mention de cette partie dans une approche phytochimique ;
- Élargir l'étude du pouvoir antilithiasique aux autres parties de la plante ;
- Accompagner cette étude *in vitro* avec une autre *in vivo*.



Références bibliographiques

A

Abbassene, F. (2019). *Etude épidémiologique de la lithiase urinaire*. Thèse de doctorat en biologie et santé. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 310p.

Achat, S. (2013). *Polyphénols de l'alimentation : Extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques*. Thèse de doctorat en biologie. Université Ahmed Mira-Bejaia, 211p.

Akhtar, N., Ihsan, UH., Bushra, M. (2015). *Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species, Arabian Journal of Chemistry, 1-13.*

Alaoui, IS. (2016). *Valorisation de deux plantes marocaines Melia azedarach et Silybum marianum*. Thèse de doctorat en chimie. Université Mohamed V, 150p.

Amrani, O. (2006). *Valeur nutritive du chardon marie (silybum marianum (1) Gaerthn) "Tawra"*. Thèse de Magister .Université de Batna, 86p.

Anderson, PL., Brundage, RC., Kakuda, TN. and Fletcher, CV. (2002). *Response is correlated with peak plasma concentration of indinavir in adults with undetectable human immunodeficiency virus ribonucleic acid. Clinical pharmacokinetics; 71: 280-285.*

Athamena, S. (2009). *Etude quantitative des flavonoïdes des graines de Cuminum cyminum et les feuilles de Rosmarinus officinalis et l'évaluation de l'activité biologique* (Doctoral dissertation, Université de Batna 2), 90p.

Atmani, F., et khan, S.R. (2000). *Effects of an extract from Herniaria hirsuta on calcium oxalate crystallization in vitro. BJU Int; 85(6): 621-625.*

B

Basavaraj, D. R., Biyani, C. S., Browning, A. J., and Cartledge, J. J. (2007). *The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. EAU-EBU update 5 : 126-136.*

Bayer, E. et Buller, K. P. (1990). *Guide de la flore méditerranéenne : caractéristiques,*

habitats, distributions et particularités de 536 espèces. Ed. Delachaux et Niesthe Paris, 222p.

Belouahem, AD. (2009). *Biodiversité floristique et vulnérabilité des Aulnaies Glutineuses de la Numidie Algérienne (N.E Algérien)*. *European Journal of Scientific Research*, 32 (3) 345.

Belyagoubi, N. (2012). *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien*. Thèse de doctorat en biologie. Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen, 161p.

Ben rahal, N. (2012). *Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de Silybum marianum, étude de leurs activités antioxydantes et antitumorales*. Thèse de doctorat en génie des procédés et des produits. Université de Lorraine (France) et Université de Carthage (Tunis), 194p.

Benhelima, A. (2017). *Etude chimique et biologique des substances naturelles extraites par photochimie et leurs effets sur les germes et cristaux oxalo-calciques*. Thèse de doctorat en chimie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 183p.

Beniston, NT. WS. (1984). *Fleurs d'Algérie*. Ed. Entreprise Nationale de livre Alger, 274p.

Besancenot, J. (1992). *Sécheresses et lithiases urinaires. Science et changements planétaires/Sécheresse*. 3 (4): 211-217.

Beygrine, A. (2011). *Corrélation entre la composition chimique, l'aspect radiologique et le résultat de la lithotritie extracorporelle pour les calculs rénaux et urétéraux*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Mohammed V (Rabat), 93p.

Bezanger, BJ., Pinkas, MO.,et Trot, F. (1980). *Plantes médicinales des régions tempérées*. Edition Vlaloine S.A. Paris, 416p.

Bhatia, N. Agarwa, R. (2001) Feb: *Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, Prostate. The prostate*, 46 (2):98-107.

Bimbenet, J.-J., Duquenoy, A.,et Trystram, G. (2002). *Génie des procédés alimentaires : Des bases aux applications*, Dunod.

Brikowski, T., Lotan, Y.,and Pearle, M. (2008). *Climate related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States. PNAS*. 105 (28): 9841-9846.

Bruneton J.(2008). *Acides phénols. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales.*
Ed: Tec et Doc. Lavoisier, Paris. 1118p.

Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.).* Lavoisier.

C

Campos, R. Garrido, A. and Guerra, R. (1989). *Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. Planta Medica.* 55: 417-419.

Charpentier, J. P et Boizot, N. (2006). *Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des oranges d'un arbre forestier. Cahier des techniques de l'INRA,* 79-82.

Charrié, JC., Chastel B., Cieur, C., Combe, P., Damak, M., Hedayat, K., et Saigne-Soulard, C. (2017). *Plantes médicinales, phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique.* Ed. Lavoisier Tec et Doc Paris, 256-257p.

Cotton, F., wolff, F., Simon, I., Idrissi, Tielemans, C., Vandenbossche, M., Roumguère, T.,et Pozdzik, A. (2014). *Apport de la biologie clinique dans l'exploration étiologique et le suivi de l'urolithiase. Revue médicale de Bruxelles ;* 4 (35): 243-249.

Crozier, A., Jaganath, I. β., and Cclifford, M. N. (2006). *Phenols, polyphenols and tannins: an overview. Plant secondary metabolites: Occurrence, structure role in the human diet,* 1.

Curhan, G.C. (2007). *Epidemiology of stone disease. Urol Clin North Am;* 34 (3): 287-293.

Cushnie, T. T., et Lamb, A. J. (2005). *Antimicrobial activity of flavonoids. International journal of antimicrobial agents,* 26 (5), 343-356.

D

Dalibon, P. (2015). *La lithiase urinaire, une affection sous surveillance. Actualités Pharmaceutiques,* 54 (542): 23–29.

Daudon, M. (1995). *Approche de la néphrolithiase par l'analyse du calcul. Médecine et hygiène,* 53, 565-573.

Daudon, M. (2000). *L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant*, Arch. Pédiatr, 7: 855- 865.

Daudon, M., Bounxouei, B., Santa cruz, F., Leite da Silva, S., Diouf, B.,et Angwafoo III, F. (2004). *Composition des calculs observés aujourd'hui dans les pays non industrialisés*. Prog Urol, 14 :1151-61.

Daudon, M., Jungers, P., et Traxer, O. (2012). *Lithiase urinaire*. 2nd ed. Lavoisier.

Daudon, M., Traxer, O., Lechevallier, E., et Saussine, C. (2008). *La lithogénèse*. Progrès en urologie, 18 (12): 815-827.

Debré, B., Saighi, D.,et Peyromaure, M. (2004). *Urologue connaissance et pratique*, Paris France.

Deysson, G. (1979). *Organisation et classification des plantes vasculaires*, 2^{ème} partie. Systématique, Cours de botanique générale, 540p.

Ditomaso, JT. (2007). *Weeds of California and other western states*. California weed science society ed, 391-394p.

E

El Gharras, H. (2009). *Polyphenols : food sources, properties and applications-a review*. International journal of food science and Technology, 44 (12), 2512-2518.

EL Kabbaj, S., Meiouet, A., et EL-Amrani (2000). *Analyse des calculs urinaires par spectrophotométrie infrarouge à propos de 218 cas au Maroc*. Biol. et Santé, 1 (1): 14-23.

F

Fadili ,K., Amalich, S., N'Dedianhoua ,S.K., Bouachrine ,M., Mahjoubi ,M., EL hilali ,F. and Zair T.(2015). *Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: Rosmarinus officinalis and Thymus satureioides*; International Journal of Innovation and Scientific Research. 5 (17): 24-33.

Flachowsky, G., Klosch, M., Schneider, A., Richter, G. H., & Löhnert, H. J. (1998). *Influence of various phosphorus supply on apparent digestibility of crude nutrients, growing*

and slaughtering performance as well as selected parameters of metabolism of fattening bulls. Archives of Animal Nutrition, 51(1): 39-52

Foster, S. (1995). *Milk thistle: herbal seeds and medicinal needs. Better Nutrition for Today's Living, 64-71p.*

G

Ghazal, M. (2016). *Prise en charge de La lithiase urinaire au service d'urologie au CHU Hassan II - Fès. Thèse de doctorat en médecine. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.*

Ghedira, K. (2005). *Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie, 3 (4): 162-169.*

Graf, J.-D., Féraïlle, E. (2000). *Importance de l'analyse du calcul dans l'exploration de la lithiase rénale. Médecine et hygiène, 58: 431-433.*

Grases, F., and Costa-Bauza, A. (1990). *Study of factors affecting calcium oxalate crystalline aggregation. BJU International, 66 (3): 240-244.*

H

Haddouchi, F., Chaouche, T.M., and Halla, N. (2016). *Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. Phytothérapie, 1-9.*

Halbach, G. et Gorler, K. (1971). *Separation of flavone in silybum marianum fruits, planta med; 19: 293-298.*

Hambuer, J.P., Grunfeld, et Auvert, J. (1980). *Néphrologie-urologie, Flammarion médecine, Science. 20 rue de Vaugirard Paris France.*

Hannache, B. (2014). *La lithiase urinaire : Épidémiologie, rôle des éléments traces et des plantes médicinales. Université Paris Sud-Paris XI, 101p.*

Hartek, K. (1987): *Kommentar Wissensechaftlick Verlags-gesellschaft mbH, Stuttgart, 18: 2226-2227.*

Herring, L.C. (1962). *Observations on the analysis of ten thousand urinary calculi, Journal of Urology*, 88: 545-562.

Hess, B. (2011). *Kidney Stone Belt - l'impact environnemental sur la lithiase urinaire. Forum Med Suisse*, 11(47): 853-856.

Houlgatte, A., Fournier, R. (2004). *Calculs et corps étrangers de la vessie et de l'urètre, Annales d'Urologie*, 38 :45-51.

I

Iserin , P. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*. London, ypogly Edith Ybert, Tatiana Delasalle- Feat, 335p.

J

Jiang, C. Angarwal, R, Lu J. (2000). *Anti-angiogenic potential of cancer chemopreventive flavonoid antioxyant, silymarine, biochem biophys Res commun*, 276(1): 371-8.

K

Kaloustian, J., EL-Moselhy, T.F., and Portugal, H. (2003). *Determination of calcium oxalate (mono-and dehydrate) in mixtures with magnesium ammonium phosphate or uric acid: the use of simultaneous thermal analysis in urinary calculi. Clin. Chim. Acta*, 33: 117-129.

Kaloustian, J., Pauli, A.M., and Pieroni, G. (2002). *The Use of Thermal Analysis in Determination of Some Urinary Calculi of Calcium Oxalate, Journal of Thermal Analysis and Colorimetry*, 70: 959-973.

Karkanis, A., Dimitrios B., Efthimiadou, A. (2011). *Cultivation of milk thistle (silybum marianum L.Gaertn.). a medicinal weed. industrial Crops and Products*, 34(1): 825-830.

Khan, SR., Hackett, RL. (1993). *Role of organic matrix in urinary stone formation: an ultrastructural study of crystal matrix interface of calcium oxalate monohydrate stones. J. Urol* ; 150: 239-45.

Khitri, W., Lachgueur, N., Tasfaout, A., Lardjam, A., et Khalfa, A. (2016). *Plantes anti lithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d'Oran, Algérie. Revue d'ethnoécologie*, 9 (9).

Knoll, T. (2010). *Epidemiology, pathogenesis, and pathophysiology of Urolithiasis. European Urology Supplements*, 9 (12): 802-806.

L

Laoufi, R., Yahiaoui, K., Bouchenak, O., Benhabiles, N., Lefkir, S., Arab, K. (2020). *Beneficial effect of the Urtica dioica aqueous extract on the crystallization of calcium oxalate in urine. International Journal of Green Pharmacy*. 14 (1): 6-10.

Legrand, G. (2015). Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat en sciences. Université de Lille 1, 348p.

M

Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C., (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. 4-5p.

Matou, M. (2019). *Composition et propriétés biologiques d'extraits de Phyllanthus amarus Schumacher & Thonning (8827) utilisés en médecine traditionnelle aux Antilles*. Thèse de doctorat en biologie. Université des Antilles Faculté des Sciences Exactes Naturelles, 212p.

Mayer et Buchtela (1999). Tee-Rezepturen-Ein. Hundbuch for Apotheker und frzte. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Medjdoub, H. (2013). *Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de zygophyllum geslini Coss.* Thèse de doctorat en Biologie. Université Abou bekr belkaid, 108p.

Molyneux, P. (2004). *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity*, Song Klama Karin. *J.Sci. Technol*; 26 (2): 211-219.

Morazzoni, P. and Bombardelli, E. (1995). *Silybum marianum (Carduus marianus)*.

Fitoterapia, 66 (1): 3-49.

Mouillé-Richard, THM. (2014). *Utilisation du chardon-marie (Silybum marianum) dans les affections hépatiques chez les oiseaux et le furet : présentation de quelques cas clinique.* Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 68p.

Mpondo, E. M., Yinyang, J., et Dibong, S. D. (2015). *Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun).* *Journal of Applied Biosciences*, 85 (1), 7804-7823.

N

Nayer, A. (2002). *Determination of urinary caculi by binocular stereoscopic microscopy* *Pediatr Nephrol*, 17: 425-432.

Nkhili, E. (2009). *Polyphénols de l'Alimentationaction, Interactions avec les ions du Fer et du cuivre, Oxydation et pouvoir antioxydant.* Thèse de doctorat en sciences des Aliments. Université Cadi Ayyad-Faculté des Sciences.

O

Ochmanski, W., Kmiecik, J., and Sulowicz, W. (1999). *Analysis of Chemical Composition of Urinary Stones, Int. Urol. and Neph., 31 (6): 743- 750.*

Ody, P. (2002). *Les plantes médicinales : Encyclopédie pratique.* 2^{ème} Ed. Ed selection du Readers Digest, 120p.

Oulghoul, O. (2015). *Prise en charge diagnostique et thérapeutique de la lithiase urinaire au service d'urologie de CHU Med VI Marrakech.* Thèse de doctorat en médecine. Université Cadi Ayyad, 171p.

Oussama, A., Kzaiber, F., Mernari, B., Hilmi, A., Semmoud, A., et Daudon, M. (2000). *Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans le Moyen Atlas Marocain par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. Prog. Urol., 10: 404-410.*

P

Paris, R., & Nothis, A. (1978). *Plantes médicinales, phytothérapie*. Ed Masson.

R

Rathod, N., Chitme, HR., R, C. (2014). *In vivo and in vitro models for evaluating anti-urolithiasis activity of herbal drugs. International Journal Of Pharmaceutical Research And Bio-Science*, 3(5): 309-329.

Roche, C. (1991). Milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) Pacific Northwest Extension Publication. Washington State University, Oregon State University and University of Idaho Cooperative Extension. PNW, 382p.

Rosenfeld, L. (2001). *The chemical work of Alexander and Jane Marcet. Clin. Chem*, 47 : 784.

Ryall, RL., Chauvet, MC., and Grover, PK. (2005). *Intracrystalline proteins and urolithiasis: a comparison of the protein content and ultrastructure of urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. BJU Int*. 96: 654-663.

S

Sadki, C., et Atmani, F. (2017). *Évaluation de l'effet antilithiasique, oxalo-calcique et phospho-ammoniac-magnésien d'extrait aqueux d'Erica multiflora L. Progrès En Urologie*, 27(16), 1058–1067.

Sahli, R. (2017). *Etude phytochimique de quelques plantes extremophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques*. Thèse de doctorat en science du médicament et des autres produits de santé. Université Lille 2 Ecole Doctorale Biologie Santé, 205p.

Saller, R. (1995). *Phytothérapie*, Hang Heidelberg, 267-274p.

Sanchez Moreno, C., Larrauri, J., Saura-Calixto, F. (1998). *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture* 76 (2), 270-276.

Schandalik, R., Perucca, E. (1994). *Pharmacokinetics of silybin following oral*

administration of silipide in patients with extrahepatic biliary obstruction. Ed. Drugs –Exp – Clin-Res, 20(1): 37-42.

Sekkoum, K. (2011). *Composition phytochimique et effet, in vitro, des extraits de quelques plantes médicinales du Sud Ouest Algérien sur la cristallisation lithiasique oxalocalcique.* Thèse de doctorat en sciences. Université Djillali Liabes de Sidi Bela-abbès, 111p.

Sindel, B.M. (1991). *A review of the ecology and control of thistles in Australia. Weed Research, (31): 189-201.*

Spichiger, R.E., Savolainen, V. et Figeat, M. (2000). *Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. 1^{ier} Ed. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, 372p.*

T

Talaj, S. and Czechowicz, A. S. (1989). *Herbal Remedies Harmful and Beneficial Effects, Hill of Content, Melbourne, 221p.*

Talbi, M., (2015). *Dosage des polyphénols de la plante d'Artemisia campestris.L par chromatographie HPLC. Mise en évidence de l'activité biologique.* Thèse de Magister. Université d'Oran 1 Ahmed Benbella, 70p.

Tosukhowong, P., Boonnla, C., Ratchanonn, S., Tantanuch, M., Poonpirone, K., Suparavanich, P., Dissayabutra, T., and Kriangtungsanga (2007). *Crystalline composition and etiologic factors of kidney stones in Thailand: update 2007, Asian biomedicine, 1(1):87-95.*

Turner, N.J. and Szczawinski, A.F. (1991). *Common Poisonous Plants and mushrooms of North America. Timber Press. Portland Oregon, USA. [All about poisonous plants and common poisoning due to exposure to these plants]: 41.*

V

Varro, E. and Tyler, PH.D. (1994). *Herbs of choice the therapeutic Use of phytomedicinals,* PPP, NY, 64p.

Venkataramanan, R., Ramachandran,V. and Komoroski BJ. (2000). *Milk thistle, an*

herbal supplement, decreases the activity of CYP 3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte cultures. Drug Metabolism and Disposition; 28 (11): 1270-1273.

Volak, J. et Stodola, J. (1984). *Plantes médicinales. Illustrations de Frantisek severa*, Ed. ARITA Grund Paris, 319p.

W

Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., and Chen, F. (2006). *A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. Food Chemistry 97: 705-71.*

Y

Yen, GC. , Duth, PD. (1994). *Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active-oxygen species. J. of agric. And food chem. 42 : 629-632.*

داء الحصى الكلوي هو مرض شائع في جميع بلدان العالم، ويتميز بتكوين حصوات بلورية تتطور في المسالك البولية. إن علاج هذا المرض بالنباتات الطبية بديل للعلاج بعقاقير باهظة الثمن أو جراحة وبآثار جانبية. في هذا السياق، شوك الجمل أو *Silybum mmarinum* نبات عفوي من عائلة *Astéracées*، المعروف بقيمته العلاجية القيمة، كان موضوع دراسة كيميائية نباتية لاستخراج جذوره، و قوتها المضادة للأكسدة. كشف الفحص الكيميائي الذي أجرته دراسات سابقة عن ثراء النبات بالجزئيات الحيوية، خاصة الفلافونويد ، والتانينات، والكالسيرويد، والستيروبيدز، والترتربين و جليكوسيدات القلب. تم تحديد محتوى البوليفينول الإجمالي باستخدام عامل القياس اللوني Folin-Ciocalteu، تم تسجيل مستوى عال للغاية من البوليفينول في مستخلص بذور شوك الجمل في الاعمال السابقة. كشف تقييم النشاط المضاد للأكسدة من خلال DPPH أن المستخلص المائي من الجزء الهوائي للنبات ان لديه إمكانية مهمة جدا كمضاد للأكسدة. شوك الجمل له تأثير علاجي، وخاصة كمضاد الأكسدة، بفضل المستقلبات الثانوية في الأوراق التي يتم التعرف عليها كعوامل نشطة في الإجهاد المؤكسدة.

الكلمات المفتاحية : *Silybum marianum*، الجذر، البوليفينول، النشاط المضاد للأكسدة، والنشاط المضاد لتشكيل الحصى الكلوي.

Abstract :

Urinary lithiasis is a common pathology in all countries of the world, is characterized by the formation of crystalline concretions developing in the urinary tract. The treatment of this disease with medicinal plants is an alternative to treatment with expensive drugs or surgery and with side effects. In this context, the Milk thistle or *Silybum marianum*, a spontaneous plant of the Asteraceae family, known for its valuable therapeutic value, has been the subject of a phytochemical study of the extract of its roots, its antilithiasic and antioxidant power. The phytochemical screening carried out by previous studies revealed the richness of the plant in bioactive molecules, including flavonoids, tannins, alkaloids, sterols, triterpenes, and cardiogenic glucosides. The content of total polyphenols was determined using the colorimetric reagent Folin-Ciocalteu, a very high level of polyphenols in the extract of Milk Thistle seeds was recorded in previous work. The evaluation of the antioxidant activity by DPPH revealed that the aqueous extract of the aerial part of the plant has a very interesting antioxidant potential. Milk thistle has a therapeutic effect, particularly antioxidant, due to secondary metabolites in leaves recognized as active agents on oxidative stress.

Key words : *Silybum marianum*, root, polyphenols, antioxidant activity, antilithiasic activity.