



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



**UNIVERSITE DE LORRAINE
UNIVERSITE DE CARTHAGE**

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

**Spécialité : Génie des procédés et des produits
Ecole doctorale : Ressources, Procédés, Produits, Environnement**

**Spécialité : Sciences biologiques
Ecole doctorale : Sciences, Vie et Matière**

**EXTRACTION, IDENTIFICATION ET CARACTERISATION
DES MOLECULES BIOACTIVES DE LA GRAINE ET DE
L'HUILE DE *SILYBUM MARIANUM*. ETUDE DE LEURS
ACTIVITES ANTIOXYDANTE ET ANTITUMORALE.**

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés UPR CNRS 3349 (LRGP) -Nancy-France

**Laboratoire d'Application de la Chimie aux Ressources et Substances Naturelles et à
l'Environnement (LACReSNE) -Bize rte-Tunisie**

Neïla BEN RAHAL

Soutenue publiquement le 05 Octobre 2012 devant le jury composé de :

Rapporteurs

**M. Zine MIGHRI, Pr.
Mme. Pascale SUBRA, DR-CNRS.**

Faculté des Sciences de Monastir
Université de Bordeaux

Examineurs

**Mme. Danielle BARTH, Pr., directeur
Mme. Malika TRABELSI-AYADI, Pr., directeur**

Université de Lorraine
Faculté des Sciences de Bizerte

Invités

**Mme. Isabelle CHEVALOT, Pr.
Mme. Jamila-Kalthoum CHERIF, MCF**

Université de Lorraine
Université de Tunis

REMERCIEMENTS

A Madame le Directeur de Recherches Pascale Subra,

De l'Université de Bordeaux,
Qui me fait l'honneur d'accepter de rapporter et de juger cette thèse.
Avec toute ma gratitude et mes hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Zine El Mighri,

De la Faculté des Sciences de Monastir,
Qui me fait l'honneur de rapporter et de juger ce travail.
Sincères remerciements.

A Madame le Professeur Isabelle Chevalot,

De l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires,
Qui me fait l'honneur de juger ce travail et de faire partie de mon jury de thèse.
Pour m'avoir aidée et encouragée lors de mon stage au sein de l'équipe BioPromo,
En témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Maître de Conférences Jamila-Kalthoum Chérif

De la Faculté des Sciences de Bizerte – Tunisie,
Qui me fait l'honneur de juger ce travail.
Pour ses conseils avisés, son soutien et ses encouragements tout au long de cette thèse.

A Madame le Professeur Danielle Barth

De l'Ecole Nationale Européenne d'Ingénieurs en Génie des Matériaux Nancy-France,
Qui m'a fait l'honneur d'encadrer ce travail.
En témoignage de ma reconnaissance pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse, Sincères remerciements.

A Madame le Professeur Malika Trabelsi-Ayadi

De la Faculté des Sciences de Bizerte – Tunisie,
Qui m'a fait l'honneur d'encadrer ce travail.
Et qui m'accordé sa confiance en m'intégrant dans son équipe. Ses qualités scientifiques et sa passion pour la chimie m'ont permis de mener à bien ce travail de thèse.

A Madame Ouahida Bensebia

De l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Pour sa collaboration et son aide pour la modélisation.

Aux techniciens du LRGP : Hervé Simonaire et Philippe Arnoux

Aux techniciens du LACReSNE : Mohsen Dkhil et Rym Dhrif

Pour leurs gentillesse et leurs conseils pour mener à bien mes manipulations.

A mon papa **Mohamed** et ma maman **Rachida**,

Pour leur amour, leur gentillesse, le soutien qu'ils m'ont toujours apporté, la confiance dont ils m'ont toujours témoignée. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, de m'avoir donné les moyens de réaliser mes projets et d'avoir éclairé mon chemin vers la réussite. Je vous aime.

A ma grande sœur **Imen**

Pour sa gentillesse sans égal, son soutien, son dévouement et ses nombreux coups de main lors de mes déboires pendant ces années.

A ma sœur **Sana**

Qui m'a fait découvrir la biologie et le monde du vivant dès mon jeune âge. Pour sa générosité et son amour, l'affection qu'elle m'a toujours portée.

A mon frère **Mohamed-Ali**

Pour m'avoir soutenue et épaulée au cours de cette aventure avec toute l'attention et la fraternité, trouvant toujours les mots pour me faire rire quand ça n'allait pas.

A mon chéri et fiancé **Aymen**

Qui avec son amour et sa générosité, m'aide, m'encourage tous les jours pour donner le meilleur de moi-même. Du fond du cœur merci.

A ma nièce et petite princesse **Erij**, mes neveux **Amène-Allah, Mâlek et Annas** Je vous adore

A mes beaux frères **Salah et Imed**, pour leurs gentillesse et leurs soutiens.

A ma future belle-sœur **Mahjouba**

A toute la Famille **BEN RAHAL et MARMOURI.**

A mes défunts Grands parents

A mes beaux-parents **Moustafa et Tounes**

A Wassim et Nadia BOUSLAHI et leurs fils **Mohamed-Amine et Rayan.**

A Amal et Mohamed MIDA.

A ma tata **Faouzia** et mon tonton **Hassan GHAZOUANI**

A mon cousin **Nizar** et mes cousines **Amira, Sahar, et Rania**

Pour tous les moments de bonheurs et de rires et les vacances d'été qu'on passait au bord de la plage de Rafrat. Je vous adore.

A mes amis Adnen, Bouchra, Nawel et Ryma pour votre soutien et vos encouragements.

A tous mes collègues du LRGP :

A André et Patricia avec qui j'essaye tous les jours d'apprendre un seul mot brésilien, Olá!

A Elodie pour tous tes conseils avisés dans la période de rédaction.

A Cédric, Clément, Haifa, Karim, Kamel, et Nelly sans vous la recherche n'aurait pas de goût...

A tous mes collègues du LACReSNE : Faycel, Hédi, Farouk et Manel.

Résumé

L'extraction par CO₂ supercritique démontre les avantages d'un procédé de chimie verte en comparant ce procédé à la méthode d'extraction par solvant organiques et en tenant compte du degré de toxicité et de pollution du solvant. L'extraction par solvants organiques met en évidence l'influence du solvant d'extraction alors que l'extraction par CO₂-SC met en évidence l'influence de différents paramètres dont la pression, la température, le temps de contact entre la matrice végétale et le CO₂-SC, le diamètre moyen des particules et l'ajout d'un co-solvant. L'analyse chromatographique a permis d'identifier et de quantifier les flavonolignanes (silychristine, silydianine, silybine, taxifoline) dans les extraits de graines obtenus par solvants organiques et par CO₂-SC avec co-solvant. A 220 bar, les concentrations en silydianine (38,87 mg/g) et en silybine (45,91 mg/g) sont les plus élevées et à 40°C les concentrations en silychristine (31,97 mg/g), en silydianine (38,87 mg/g) et en silybine (45,91 mg/g) sont les plus importantes. Les extraits huileux obtenus à 220 bar et à 40°C des graines de *Silybum marianum* sont riches en acides gras : acide linoléique (65,22%), acide oléique (27,01%), acide palmitique (12,12%).

L'activité antioxydante a été évaluée par deux tests : test DPPH et test ABTS. Ces deux tests sont complémentaires et ont permis de conclure que l'extrait ayant un effet antioxydant le plus important est l'extrait obtenu par CO₂-SC à 220 bar et à 40°C.

L'activité biologique de cet extrait est mise en évidence par rapport à une lignée cellulaire cancéreuse du colon Caco-2. La silychristine, la silydianine et la silybine ainsi que l'extrait obtenu par CO₂-SC avec co-solvant (éthanol) à 220 bar et à 40°C ont été testés vis à vis de cette lignée cancéreuse. Ces expérimentations in vitro reflètent une activité cytotoxique quantifiable et une mortalité cellulaire des Caco-2 des flavonolignanes allant jusqu'à 71%.

Mots clés : Extraction, CO₂ supercritique, flavonolignanes, acides gras, activité anticancéreuse, lignée cancéreuse du colon Caco-2

Abstract

The supercritical CO₂ extraction demonstrates the benefits of green chemistry process comparing with the method of organic solvents extraction and depending to toxicity and pollution solvent degree. Organic solvents extraction shows the solvent extraction influence, so that the SC-CO₂ extraction highlights different parameters including pressure, temperature, contact time between the plant matrix and CO₂ SC, the average particle diameter and the addition of a cosolvent. Chromatographic analysis identified and quantified four flavonolignans (silychristin, silydianin, silybin, taxifolin) in seed extracts obtained by organic solvents and SC-CO₂ with cosolvent.

At 220 bar, silydianin (38.87 mg / g) and silybin (45.91 mg / g) have highest concentrations and at 40 ° C silychristin (31.97 mg / g), silydianin (38.87 mg / g) and silybin (45.91 mg / g) have the most important concentrations. The oily extracts obtained at 220 bar and 40 ° C of *Silybum marianum* seeds are rich in fatty acids: linoleic acid (65.22%), oleic acid (27.01%), palmitic acid (12.12%).

The antioxidant activity measured by two tests: DPPH and ABTS test. These two tests are complementary and confirm that the extract with the higher antioxidant effect is the extract obtained by SC-CO₂ at 220 bar and 40 ° C. The biological activity of this extract is demonstrated with respect to a colon cancer cell line Caco-2. Silychristin, silydianin and silybin and the extract obtained by CO₂-SC with co-solvent (ethanol) at 220 bar and 40 ° C were tested with respect to this line cancer. These experiments in vitro cytotoxic activity reflect estimable and cell death of Caco-2 flavonolignans of up to 71%.

Keys words: Extraction, supercritical CO₂, flavonolignans, fatty acids, anticancer activity, colon cancer cell line Caco-2

Liste des Figures

Figure I.1. Répartition de <i>Silybum marianum</i> en Afrique (a), en Europe (b) et en Amérique (c) (www.plants.usda.gov)	22
Figure I. 2 Parties de la plante de <i>Silybum marianum</i> (www.alchemy-works.com).....	22
Figure I. 3 Tiges de chardon Marie (www.discoverlife.org).....	23
Figure I. 4 Feuilles de chardon Marie (www.themediteckwellnessgateway.com)	23
Figure I. 5 Fleurs de chardon Marie : fraîches (a) et sèches (b) (www.freeflowerpictures.net) .	24
Figure I. 6 Graines de chardon Marie : libres (a) et attachés à la fleur (b) (www.sciencephoto.com)	24
Figure I. 7 Structure des principaux acides gras (Touitou, 2006)	27
Figure I. 8 Structure de base des flavonoïdes.....	31
Figure I. 9 Schéma illustrant les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes (Brunetton, 1999).....	31
Figure I. 10 Les flavonolignanes de <i>Silybum marianum</i> (Foster, 1990).....	34
Figure I. 11 Diagramme de phase du CO ₂ supercritique (Luque de Castro et al., 1994)	46
Figure I. 12 Schéma de principe de l'extraction par CO ₂ -SC associé au diagramme (P-T) (Wang et Waller, 2006)	50
Figure I. 13 Représentation schématique du processus d'extraction de matrices solides par fluide supercritique (A → B : désorption du composé ; B → C : diffusion, C → D : solubilisation dans le fluide supercritique et D → E : transport) (Carvalho et al., 2005)	50
Figure I. 14 Représentation schématique d'un procédé semi-batch d'extraction supercritique avec détente multi-étagée et recyclage du solvant (Penchev, 2010)	52
Figure I. 15 Diagramme schématique du processus d'extraction supercritique.....	53
Figure I. 16 Variation de la composition de la sauge en fonction du temps d'extraction (P=120 bar, T=50°C) (Reverchon et al., 1995)	56
Figure I. 17 Influence du débit de CO ₂ sur le rendement d'extraction de la sauge.....	57
Figure II. 1 Graines de <i>Silybum marianum</i> originaire du Nord de la Tunisie.....	73
Figure II. 2 Montage d'extraction par l'appareil de Soxhlet.....	75
Figure II. 3 Schéma de l'installation d'extraction dynamique	76
Figure II. 4 Pilote d'extraction par CO ₂ supercritique au LRGP	76
Figure II. 5 Schéma de l'extracteur en inox.....	77
Figure II. 6 Aspect des échantillons obtenus après extraction sans ajout de co-solvant (a) et avec ajout de co-solvant (b).....	81
Figure II. 7 Epuisement de la matrice végétale à P=220 bars et à T=40°C (E29)	83
Figure II. 8 Courbe de détermination de la solubilité de l'extrait E38	85
Figure II. 9 Cinétique d'extraction en fonction de la pression.....	86
Figure II. 10 Cinétique d'extraction à P=180 bars (sans co-solvant) et à différentes températures T=40°C (E38) ; 50°C (E39); 70°C(E40);80°C (E41).....	87
Figure II. 11 Cinétique d'extraction à P=220 bars (sans co-solvant) différentes températures T=40°C (E34) ; 50°C (E35); 70°C (E36); 80°C (E37).....	87
Figure II. 12 Cinétique d'extraction à P=180bar et T=40°C en fonction de l'ajout de co-solvant.....	88
Figure II. 13 Cinétique d'extraction à P=220bar et T=40°C en fonction de l'ajout de co-solvant.....	89
Figure II. 14 Cinétique d'extraction à P=220 bars à T=40°C sans co-solvant en fonction du temps de contact	89
Figure II. 15 Cinétique d'extraction en fonction du diamètre moyen.....	90

Figure II. 16 Aspects des poudres des graines de <i>Silybum marianum</i> (a) avant extraction (b) et après extraction)	91
Figure II. 17 Aspects de l'enveloppe externe des graines de <i>Silybum marianum</i>	92
Figure II. 18 Répartition des graines de <i>Silybum marianum</i>	92
Figure II. 19 Particules des graines de <i>Silybum marianum</i> avant (a et c) et après l'extraction (b et d).....	93
Figure II. 20 Cristaux d'acide ascorbique dans les composés internes de la graine de <i>Silybum marianum</i>	93
Figure II. 21 Cristaux d'acide ascorbique (Burgess, sciencephotolibrary).....	93
Figure II. 22 Cinétique d'extraction théorique et expérimental selon le modèle de Reverchon et Sesti Osseo (1994) (180 bar, sans co-solvant à différentes températures)	95
Figure II. 23 Cinétique d'extraction théorique et expérimental selon le modèle de Reverchon et Sesti Osseo (1994) (220 bar, sans co-solvant à différentes températures)	95
Figure III. 1 Chromatogramme de l'échantillon E1 obtenu par GC-MS.....	102
Figure III. 2 Chromatogramme de l'échantillon E1 obtenu par GC-FID.....	102
Figure III. 3 Réaction de formation de la silybine	110
Figure III. 4 Fluorescence de l'extrait E4	112
Figure III. 5 Chromatogramme de l'extrait E4 obtenu par HPLC	114
Figure III. 6 Flavonolignanes (%) des échantillons extraits par solvants organiques	117
Figure III. 7 Composition en flavonolignanes en fonction des températures à 220 bar	119
Figure III. 8 Composition en flavonolignanes en fonction des pressions à 40°C.....	120
Figure IV. 1 Structure du radical stable DPPH	125
Figure IV. 2 Spectre d'absorption du radical DPPH dans le méthanol $C=1,013.10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($T=25,0\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) (Dangles et al., 1999).....	126
Figure IV. 3 Schéma de réaction du DPPH.....	126
Figure IV. 4 Evolution du spectre du DPPH lors de sa réduction par l'acide dihydrocaféique (Roche et al., 2005)	127
Figure IV. 5 Structure chimique de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ABTS.....	127
Figure IV. 6 Schéma de la réaction de l'ABTS avec l'antioxydant.....	128
Figure IV. 7 Spectres d'absorption de (a) l'ABTS et de son radical-cation (b) $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Pinkernell et al., 1997)	128
Figure IV. 8 Structure de l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique	129
Figure IV. 9 Formation et piégeage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ par un antioxydant donneur de H^{\bullet} (Rice-Evans et Miller, 1994)	129
Figure IV. 10 Evolution des spectres d'absorption UV-visible de l'extrait E4 (à $P=100\text{bar}$ et $T=40^{\circ}\text{C}$).....	135
Figure IV. 11 Variation du % DPPH $^{\bullet}$ restant en fonction du volume de l'extrait obtenu par CO_2 supercritique (E4)	136
Figure IV. 12 Courbe d'étalonnage du Trolox.....	139
Figure IV. 13 Cellscreen® : Système automatisé d'analyse de la croissance cellulaire	148
Figure IV. 14 Structure chimique du rouge neutre.....	149
Figure IV. 15 Analyse d'image par le Cellscreen après ajout des flavonolignanes : silychristine (a) ; silybine (b) ; extrait obtenu par CO_2 supercritique (c) et de la silydianine (d) .	151
Figure IV. 16 Cinétique de croissance des cellules Caco-2 (Surface de recouvrement des puits en fonction du temps en présence de la silychristine)	152
Figure IV. 17 Cinétique de croissance des cellules Caco-2 (Surface de recouvrement des puits en fonction du temps en présence de la silydianine)	152
Figure IV. 18 Cinétique de croissance des cellules Caco-2 (Surface de recouvrement des puits en fonction du temps en présence de la silybine)	153

Figure IV. 19 Cinétique de croissance des cellules Caco-2 (Surface de recouvrement des puits en fonction du temps en présence de l'extrait obtenu par CO₂ supercritique à 40°C et 220bar)..... 153

Figure IV. 20 Vitesses spécifiques de croissance (μ, h^{-1}) de cellules Caco2 en présence des falvonolignanes et de l'extrait obtenu par CO₂ supercritique 155

Figure IV. 21 Pourcentage de mortalité des cellules Caco2 après 48h d'exposition déterminé par le test au rouge neutre en fonction de différentes concentrations des flavono lignanes 156

Liste des Tableaux

Tableau I. 1 Classification de <i>Silybum marianum</i> (Bonnier, 1990).....	21
Tableau I. 2. Tableau récapitulatif des caractéristiques de <i>Silybum marianum</i> (Burnie, 1997 ...	25
Tableau I. 3 Structure et taxonomies des acides gras (Cuvelier et al., 2004).	28
Tableau I. 4 Paramètres critiques de plusieurs corps purs (Luque de Castro et al., 1994).....	47
Tableau I. 5 Propriétés physiques pour les gaz, le CO ₂ supercritique et les liquides	47
Tableau II. 1 Pourcentages en eau, matières volatils, sèche, minérale et organique.	73
Tableau II. 2 Paramètres des expérimentations par solvants organiques.....	73
Tableau II. 3 Caractéristiques de l'extracteur	76
Tableau II. 4 Paramètres des expérimentations d'extraction par CO ₂ supercritique	78
Tableau II. 5 Rendements des extractions par solvants organiques.....	79
Tableau II. 6 Rendements (%) des extractions par CO ₂ supercritique par ajout de co-solvant..	81
Tableau II. 7 Rendements (%) des extractions par CO ₂ supercritique sans co-solvant.....	81
Tableau II. 8 Rendements (%) des extractions par CO ₂ supercritique à différents temps de contact à P=220bars, T=40°C	81
Tableau II. 9 Rendements (%) des extractions par CO ₂ supercritique à différentes granulométries à P=220bars, T=40°C	82
Tableau II. 10 Rendements d'extraction à différentes pressions et températures.....	84
Tableau II. 11 Tableau comparatif des résultats de solubilité à différentes pressions et températures	84
Tableau III. 1 Propriétés des extraits huileux	100
Tableau III. 2 Pourcentages en acides gras totaux obtenus par GC-MS (E1 à E22).....	103
Tableau III. 3 Pourcentages en acides gras totaux obtenus par GC-MS (E23 à E45)	103
Tableau III. 4 Pourcentages en acides gras totaux obtenus par GC-FID (E1 à E22).....	104
Tableau III. 5 Pourcentages en acides gras totaux obtenus par GC-FID (E23 à E45).....	105
Tableau III. 6 Tableau comparatif de la composition en acides gras	109
Tableau III. 7 Conditions d'élution	112
Tableau III. 8 Dosage des antioxydants (Ben Rahal, 2008).....	113
Tableau III. 9 Temps de rétention des standards dans les conditions HPLC	114
Tableau III. 10 Composition en flavonolignanes des extraits obtenus par solvants organiques	115
Tableau III. 11 Composition en flavonolignanes des extraits par CO ₂ -SC	116
Tableau III. 12 Tableau comparatif des compositions en flavonolignanes	118
Tableau IV. 1 Tableau comparatif des tests DPPH et ABTS	130
Tableau IV. 2 Dilution de la solution mère de trolox à 2,5 mM.	133
Tableau IV. 3 V ₅₀ et CE ₅₀ de la silymarine naturelle et artificielle et des extraits par Soxhlet par solvants organiques (hexane (E1), chloroforme (E2) et éther de pétrole (E3)).....	137
Tableau IV. 4 V ₅₀ et CE ₅₀ des échantillons extraits par CO ₂ supercritique (E4 à E45).....	137
Tableau IV. 5 Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'ABTS après l'ajout de la silymarine naturelle (SM Nat) et commerciale (SM Com) et des extraits par Soxhlet par solvants organiques (hexane (E1), chloroforme (E2) et éther de pétrole (E3)).....	140
Tableau IV. 6 Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'ABTS des échantillons extraits par CO ₂ supercritique	140
Tableau IV. 7 V ₅₀ (mL) et TEAC (μM) de la silymarine naturelle (SM Nat) et commerciale (SM Com) et des extraits par Soxhlet par solvants organiques (hexane (E1), chloroforme (E2) et éthanol (E3))	141
Tableau IV. 8 V ₅₀ (mL) et TEAC (μM) des échantillons extraits par CO ₂ supercritique à différentes températures et pressions.....	141

Liste des abréviations

ABTS^{•+} : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ADN : acide désoxyribonucléique

AGS : Acide Gras Saturés

AGMI : Acide Gras MonoInsaturés

AGPI : Acide Gras PolyInsaturés

ALD : maladies alcooliques du foie

ALT : sérum alanine aminotransférase

AOM : azoxyméthane

ARN : acide ribonucléique

Atm : Atmosphère

A2780 : lignée de cellules tumorales humaines de l'ovaire

A431 : cellules épidermiques humaines

C : concentration M ou mol/l

Caco2 : lignée cellulaire cancéreuse de colon

CCI : Transitional Cell Carcinoma

CCl₄ : tétrachlorure de carbone

CDDP: Cis-Diamminedichloride platinum

CE₅₀ : concentration efficace pour réduire 50% du DPPH initial

CO₂ : dioxyde de carbone

CO₂-SC : dioxyde de carbone supercritique

D : Diffusivité

DHT: poids tumoral

Dm : Diamètre moyen

DMBA : 7,12-diméthyl (a) anthracène

DMEM : milieu « Eagle » modifiée par Dulbecco

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPPH-H : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine

DPPH^o : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

DU145 : lignée de cellules tumorales de la prostate

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique EtOH : Ethanol

F: lignée cellulaire cancéreuse du colon

GC-FID : Chromatographe en Phase Gazeuse couplé à un Détecteur à Ionisation de Flamme

GC-MS : Chromatographe en Phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse

Geo : lignée cellulaire cancéreuse du colon

HCT116 : lignée cellulaire cancéreuse du colon

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

H₃PO₄ : acide phosphorique

H₂SO₄ : acide sulfurique

H₂O : monoxyde de dihydrogène

IC : ionisation chimique

IDB 1016 : complexe de silibinine avec phosphotidylcholine

IE : impact électronique

IFN- α : interféron-alpha

IGFBP-3 : Insulin-like growth factor-binding protein 3

IL-4 : interleukine-4

IL-10 : interleukine-10

K₂S₂O₈ : persulfate de potassium

M : molarité

MCF-7 : lignée de cellules tumorales mammaires

MDA-MB468 : cellules cancéreuses du sein

MEB : Microscope Électronique à Balayage

MM : Matière minérale

MMP-2 : matrice métalloprotéinase-2

MNU : 1 - méthyl-1-nitrosourée

MO : Matière organique

MPT : perméabilité mitochondriale

MS : Matière sèche

MTT : Test de mortalité cellulaire

OH-BBN : N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine

P: Pression

PAA : acétaminophène

PAR : pouvoir antiradicalaire

PBS : tampon phosphate saline

Pc: Pression critique

PCNA : antigène nucléaire des cellules proliférantes

PDA : détecteur à barrettes de diodes

pH : Potentiel d'hydrogène

P_{max} : Pression maximale

PSA : Prostate-Specific Antigen

R : radical

REACH : Agence européenne des produits chimiques

ROS : espèces oxygénées réactives

SB : Silybine

SC : Silychristine

SD : Silydianine

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

SVF : sérum de veau fœtal

T: Température

t : temps

T_c: Température critique

t_c : temps de contact

TEAC : capacité antioxydante en équivalent trolox

TNF : facteurs de la nécrose des tumeurs

TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate

TPA / OA : Acide okadaïque/promoteur des tumeurs cutanées

Trolox : acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique

TXF : Taxifoline

VEGF : facteur de croissance vasculaire

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

V_m : Volume molaire

V₅₀ : Volume efficace pour réduire 50% du DPPH initial

UV : Ultraviolet

UV-vis : Ultraviolet visible

ω₃ : oméga 3

ω₆ : oméga 6

ω₉ : oméga 9

ρ: Masse volumique (kg/m³)

INTRODUCTION GENERALE.....	17
CHAPITRE I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	20
I.GENERALITES SUR LE <i>SILYBUM MARIANUM</i>.....	20
I.1. HISTOIRE DE LA PLANTE.....	20
I.2. NOMS DE LA PLANTE.....	20
I.3. CLASSIFICATION BOTANIQUE.....	21
I.4. LOCALISATION ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE.....	21
I.5. MORPHOLOGIE DE LA PLANTE.....	22
I.6. CYCLE DE VIE.....	24
I.7. COMPOSITION CHIMIQUE.....	26
I.7.1. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA GRAINE.....	26
I.7.2. HUILE ET ACIDES GRAS DE LA GRAINE DE <i>SILYBUM MARIANUM</i>	26
II. LES ANTIOXYDANTS NATURELS	29
II.1. DEFINITION.....	29
II.2. PROPRIETES DES ANTIOXYDANTS.....	30
II.3. LES DIFFERENTS TYPES D'ANTIOXYDANTS.....	30
II.4. LES ANTIOXYDANTS DE <i>SILYBUM MARIANUM</i>	33
III. <i>SILYBUM MARIANUM</i> EN THERAPEUTIQUE.....	35
III.1. GENERALITES.....	35
III.2. TOXICITE.....	37
III.3. BIODISPONIBILITE DE LA SILYMARINE ET DE LA SILYBININE.....	37
III.4. EFFETS HEPATOPROTECTEURS.....	38
III.5. EFFETS CONTRE L'HYPERCHOLESTEROLEMIE.....	38
III.6. EFFET SUR LE DIABETE.....	39
III.7. AUTRES EFFETS.....	40
III.8. L'EFFICACITE PREVENTIVE DE LA SILYMARINE ET DE LA SILIBININE CONTRE LES MECANISMES ASSOCIES AU CANCER.....	40
IV. EXTRACTION.....	44
IV.1. EXTRACTION PAR SOLVANTS ORGANIQUES.....	44
IV.2. EXTRACTION PAR LE DIOXYDE DE CARBONE SUPERCRITIQUE.....	45
REFERENCES	58
CHAPITRE II EXTRACTION	72
I. PROCEDES D'EXTRACTION	72
I.1. INTRODUCTION.....	72

I.2.MATERIEL ET METHODES	72
I.2.1. MATERIEL VEGETAL	72
I.2.2. EXTRACTION PAR SOLVANTS ORGANIQUES.....	73
I.2.3. EXTRACTION PAR CO ₂ SUPERCRITIQUE.....	74
II.RESULTATS	79
II.1. RENDEMENTS	79
II.2. CINETIQUE D'EXTRACTION PAR CO ₂ SUPERCRITIQUE.....	85
II.3. ANALYSE DES PARTICULES PAR MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.....	91
III. MODELISATION	94
IV. CONCLUSION.....	96
REFERENCES	97
CHAPITRE III ETUDE DES MOLECULES BIOACTIVES DE LA GRAINE DE SILYBUM MARIANUM	99
I. ANALYSE DES ACIDES GRAS DES EXTRAITS DE GRAINES DE <i>SILYBUM MARIANUM</i>.....	99
I.1. INTRODUCTION	99
I.2. TECHNIQUES ANALYTIQUES.....	100
I.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	101
II.ANALYSE DES FLAVONOLIGNANES DES EXTRAITS DE GRAINES DE <i>SILYBUM MARIANUM</i>.....	110
II.1. INTRODUCTION.....	110
II.2. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE.....	111
II.3. RESULTATS ET DISCUSSION	113
REFERENCES	121
CHAPITRE IV ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET CYTOTOXIQUE	124
INTRODUCTION	124
I. MESURE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	124
I.1. INTRODUCTION	124
I.2. GENERALITES SUR LE POUVOIR ANTIOXYDANT.....	125
I.3. ETUDE EXPERIMENTALE.....	130
I.3.1. TEST DPPH	130
I.3.1.1. PREPARATION DE LA SOLUTION DE DPPH*	130

I.3.1.2. DETERMINATION DE CONCENTRATION DE DPPH [•] PAR SPECTROPHOTOMETRIE	131
I.3.1.3. DETERMINATION DU POURCENTAGE D'INHIBITION DU DPPH [•] PAR L'ANTIOXYDANT	131
I.3.1.4. DETERMINATION DU POURCENTAGE DE DPPH [•] RESTANT	132
I.3.2. TEST ABTS	132
I.3.2.1. PREPARATION DE LA SOLUTION D'ABTS.....	132
I.3.2.2. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIRADICALAIRE.....	133
I.3.2.3. DETERMINATION DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE EN EQUIVALENT TROLOX (TEAC)	133
I.4. RESULTATS.....	134
I.4.1. DETERMINATION DU POUVOIR ANTIRADICALAIRE PAR DPPH.....	134
I.4.1.1. MISE EVIDENCE DU POUVOIR ANTIRADICALAIRE.....	134
I.4.1.2. EVALUATION DU POUVOIR ANTIRADICALAIRE	135
I.4.2. DETERMINATION DU POUVOIR ANTIRADICALAIRE PAR ABTS	139
I.5. CONCLUSION	142
II. ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES FLAVONOLIGNANES	143
II.1. INTRODUCTION.....	143
II.2. MATERIELS ET METHODES.....	144
II.2.1. MATERIELS.....	144
II.2.2. METHODES.....	145
II.2.2.1. ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE.....	145
II.2.2.1.1. CULTURE CELLULAIRE	145
II.2.2.1.2. CONSERVATION DES CELLULES	146
II.2.2.1.3. SUIVI DE LA CROISSANCE CELLULAIRE A MICRO-ECHELLE PAR LE SYSTEME CELLSCREEN®.....	147
II.2.2.1.4. TEST ROUGE NEUTRE.....	149
II.2.3. RESULTATS ET DISCUSSION	150
II.2.3.1. EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE	150
II.2.3.2. MORTALITE CELLULAIRE	155
REFERENCES	158
CONCLUSION GENERALE.....	163
ANNEXES	167
ANNEXE 1 CINETIQUE D'EXTRACTION EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.....	167
ANNEXE 2 CINETIQUE D'EXTRACTION EN FONCTION DE LA PRESSION	169
ANNEXE 3 MODELE AVEC EXTRACTION UNIFORME TOUT AU LONG DU LIT	171
ANNEXE 4 COURBE D'ETALONNAGE DES FLAVONOLIGNANES.....	175
ANNEXE 5 FICHES TECHNIQUES DES FLAVONOLIGNANES.....	176
ANNEXE 6 COMPOSITION DES FLAVONOLIGNANES EN FONCTION DES TEMPERATURES.....	187
ANNEXE 7 EVOLUTION DES SPECTRES D'ABSORPTION UV-VISIBLE	189

INTRODUCTION GENERALE

Le monde végétal de part 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.

Les antioxydants font aujourd'hui l'objet de nombreuses études afin d'apporter des solutions au stress oxydant, source de ces maladies, et constituent aussi un grand intérêt dans de nombreux domaines cosmétique, agroalimentaire et pharmaceutique. Ils peuvent neutraliser les radicaux libres qui causent un dommage oxydatif au niveau des molécules biologiques de notre organisme plus particulièrement les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

Notre organisme est doté d'un système endogène de protection contre les radicaux libres (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase/réductase) et lors d'un déséquilibre (stress oxydatif, contamination, exposition aux rayonnements UV, maladies, vieillissement, cigarettes...), la production de radicaux libres augmente d'une façon significative et le système de défense endogène s'avère insuffisant.

La solution alternative trouvée depuis des années est la synthèse de molécules bioactives afin de répondre aux exigences industrielles et aux impératifs économiques. Par contre cette solution reste inappropriée du point de vue respect de l'environnement et de la nature, et l'intégration de molécules d'origine naturelle constitue une alternative intéressante. La valorisation des molécules d'origine naturelle est un potentiel économique important et un outil de l'émergence et du développement d'un nouveau concept : la chimie verte.

Ce concept s'est aussi basé sur les techniques innovantes d'extraction et l'isolement des molécules bioactives des matrices végétales ainsi que sur le développement de nouvelles technologies dans le domaine de la chimie analytique qui a ouvert la porte à l'exploration de la flore.

La richesse et la diversité en végétaux du contour méditerranéen et surtout la particularité de son climat et de ses sols lui confère une place privilégiée pour l'exploitation des plantes, certaines d'entre elles poussent spontanément et ceci représente un intérêt primordial dans le domaine agronomique et médicinal. C'est le cas du *Silybum marianum.L* qui autrefois a été employé dans des préparations culinaires. Aujourd'hui, des pouvoirs hépatoprotecteur, sédatif, digestif, hémostatique, anti-inflammatoire et diurétique ont été attribués à ce végétal et des études récentes ont démontré que cette plante possède des propriétés anti-tumorales et anti-cancérogènes. Elle est la base de plusieurs médicaments et de préparations pharmaceutiques en cours d'essais cliniques agissant contre les lésions hépatiques causés par le VIH qui fait de plus en plus de ravage dans le monde et qui crée un réel danger pour l'humanité.

Actuellement, les procédés d'extraction mis en œuvre sont principalement l'hydrodistillation, qui présente le risque de dégradation thermique des molécules les plus intéressantes, et l'extraction par solvants organiques, qui présente la difficulté d'éliminer les traces de solvant du produit final.

Par contre les procédés utilisant les fluides supercritiques, freinés dans leur développement par des coûts d'investissements supérieurs à ceux des procédés traditionnels, connaissent actuellement un gain d'intérêt lié entre autres aux contraintes environnementales de plus en plus fortes pesant sur l'utilisation des solvants traditionnels.

L'augmentation des risques environnementaux et professionnels due à la modernisation et l'industrialisation a permis le développement accru de diverses maladies telles que les troubles cardiovasculaires, le diabète, l'obésité et le cancer. Le plus dangereux étant le cancer avec une charge économique imposante et d'importantes implications sociales et psychologiques. Au fil des années, des efforts considérables ont été consacrés à déterminer les facteurs de risque pour le développement du cancer, de nombreuses études épidémiologiques ont conclu que les variations géographiques de l'incidence du cancer partout dans le monde sont associés principalement au style de vie, aux habitudes alimentaires et en particulier à l'environnement.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été de valoriser la graine de *Silybum marianum.L* tout en participant à l'avancée des technologies mettant en évidence des techniques d'extraction d'identification et d'analyses des molécules bioactives des graines.

L'étude de l'activité antioxydante et anticancéreuse des extraits de la graine du *Silybum marianum.L* 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.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à la description botanique de la plante et de la graine du *Silybum marianum.L*, ainsi qu'une synthèse bibliographique sur leurs molécules bioactives à savoir les antioxydants, les acides gras de l'huile et leurs effets thérapeutiques et surtout leurs activités anticancéreuses. Dans ce même chapitre, nous présentons les différentes techniques d'extraction et nous nous étendrons sur l'extraction par CO₂ supercritique et ses propriétés.

Le matériel et les méthodes utilisés dans l'extraction des principes actifs de la graine sont menés dans le second chapitre et les résultats des différentes extractions et leurs comparaisons sont discutés dans la seconde partie de ce chapitre. L'influence des principaux paramètres d'extraction par CO₂ supercritique est aussi mise en évidence.

Dans le troisième chapitre, nous étudions les molécules bioactives du *Silybum marianum.L* et plus particulièrement l'analyse des acides gras par chromatographie gazeuse et l'identification des flavonolignanes qui sont une classe des flavonoïdes spécifiques de cette graine et de quelques rares plantes. Nous avons aussi mis en évidence l'influence de la pression et de la température du CO₂ supercritique sur l'extraction des molécules extractibles.

Dans le dernier chapitre, nous avons étudié les activités biologiques des extraits de la graine qui consistent à réaliser des tests antioxydants et à évaluer leurs activités cytotoxiques vis-à-vis d'une lignée de cellules cancéreuses du colon.

Notre travail s'achève par une conclusion générale où nous exposerons les principaux résultats de notre étude afin de mettre en relief les conditions d'extraction optimales dans le but d'extraire la majorité des flavonoïdes ayant les plus importantes activités biologiques.

Chapitre I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur le *Silybum marianum*

I.1. Histoire de la plante

Silybum marianum est une plante spontanée ou encore herbe ‘mauvaise’ identifiée depuis deux mille ans par sa valeur estimable en thérapeutique. Elle a été utilisée comme médicament populaire et traditionnel en Europe et en Asie (Morazzoni et al., 1993).

C’est une plante résistante grâce à la répartition de ces graines sur et en dessous de la surface du sol. Elle ne succombe pas facilement aux différentes tentatives de pâturage (Bonnier, 1990).

On disait autrefois que le nom de chardon Marie venait d’une légende datant du Moyen-âge. Lors son voyage de l’Egypte vers la Palestine, la Vierge Marie voulant dissimuler son enfant Jésus aux troupes d’Hérode le Grand, l’aurait déposé dans les larges feuilles de chardon Marie. D’après cette légende, les tâches blanches au niveau des nervures des feuilles caractéristiques de l’espèce sont des traces ‘héréditaires’ qui proviendraient des gouttes de lait de la Vierge Marie.

Cité dans la Bible, le terme *Silybum* était déjà cité par Pline et Discoride dans son *materia medica* comme une plante médicinale du genre chardon ; le nom dérive du grec *Silybon* ou *Silybos* qui veut dire houppe (Rodzko, 2000). Le nom a été donné à d’autres chardons comestibles et plus précisément aux deux espèces de ce genre, c’est le seul représentant connu du genre *Silybum*, certains auteurs mentionnent cependant une seconde espèce, *Silybum eberneum* (Julve, 1998) (Rodzko, 2000). Le terme *marianum* se réfère à La Vierge Marie (Morazzoni et Bombardelli, 1995).

I.2. Noms de la plante

Noms communs : Chardon-Marie, Chardon argenté ou marbré, Chardon de Notre-Dame, artichaut sauvage, silybe de Marie (Rodzko, 2000).

Nom botanique: *Silybum marianum* Gaerthn; *Carduu maculatus* L; *Cirsium maculatum* Scop; *Silybum maculatum* Moench; *Carduus Mariae* Crantz; *Silybum Mariae* S-F Gray; *Carthamus maculatus* Lamp

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* (Bonnier ,1990).

I.3. Classification botanique

Le tableau I.1 représente la classification du *Silybum marianum* selon Lignée (Bonnier ,1990).

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

Tableau I. 1 Classification de *Silybum marianum* (Bonnier ,1990).

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.

Un grand nombre d'Astéracées sont comestibles et plusieurs d'entre elles sont cultivées comme des plantes ornementales et renferment des principes actifs ou des essences aromatiques très utilisées en médecine (Bonnier ,1990).

I.4. Localisation et répartition géographique

Le chardon Marie affectionne particulièrement les lieux secs et ensoleillés, souvent sur sols acides, secs et cailloux (Morazzoni et Bombardelli, 1995).

Cette plante pousse essentiellement dans un climat chaud et tempéré et ne pousse qu'au-dessus de 700 mètres d'altitude. Sa répartition géographique est concentrée sur le pourtour méditerranéen (Rodzko, 2000). Elle est réellement originaire des lieux incultes des pays du Maghreb, de l'Europe, et de l'Asie de l'Ouest grâce au climat favorable qu'offrent ces pays. Elle est aussi cultivée en Californie et dans l'Est des Etats-Unis. Elle pousse dans les jardins mais elle est plus dominante dans les champs incultes, dans les pâturages, le long des bordures des sentiers et entre les décombres (Morazzoni et Bombardelli, 1995). La carte de la

figure I.1 explique la répartition de cette plante en Afrique, en Europe et en Amérique (www.plants.usda.gov).

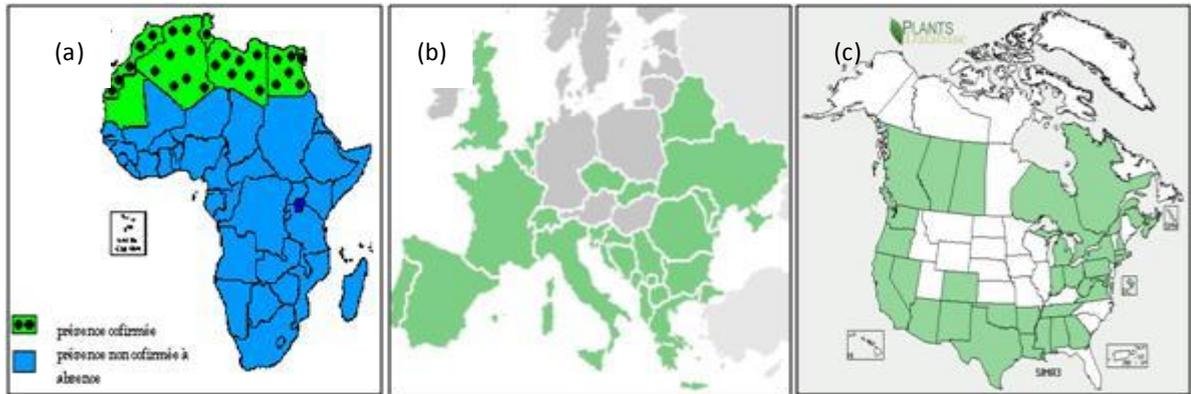


Figure I.1. Répartition de *Silybum marianum* en Afrique (a), en Europe (b) et en Amérique (c) (www.plants.usda.gov)

I.5. Morphologie de la plante

Les différents organes (racine, tige, feuilles, fleurs, graines) de la plante de *Silybum marianum* ainsi que leurs parties sont schématisés figure I.2.



Figure I. 2 Parties de la plante de *Silybum marianum* (www.alchemy-works.com)

Les espèces de *Silybum* se distinguent les unes des autres grâce à leurs parentés phylogénétiques qui existent entre les classes du règne végétal.

Racines : La tige du *Silybum marianum* s'appuie sur une épaisse racine principale développée, fibreuse, pivotante, forte, longue et épaisse.

Tige : De plus d'un mètre d'hauteur, c'est une tige cannelée, dressée et rameuse.



Figure I. 3 Tiges de chardon Marie (www.discoverlife.org)

Feuilles : Elles sont vertes, luisantes et en général largement tachetées de blanc le long des nervures bordées de dents épineuses dont l'épine est jaune et très puissante. Les feuilles moyennes et inférieures sont allongées, aiguës et embrassent largement la tige par leur base. Les feuilles inférieures ont un pétiole, elles sont relativement très grandes, à limbe profondément divisé en segments élargis (Morazzoni et al. ,1993).

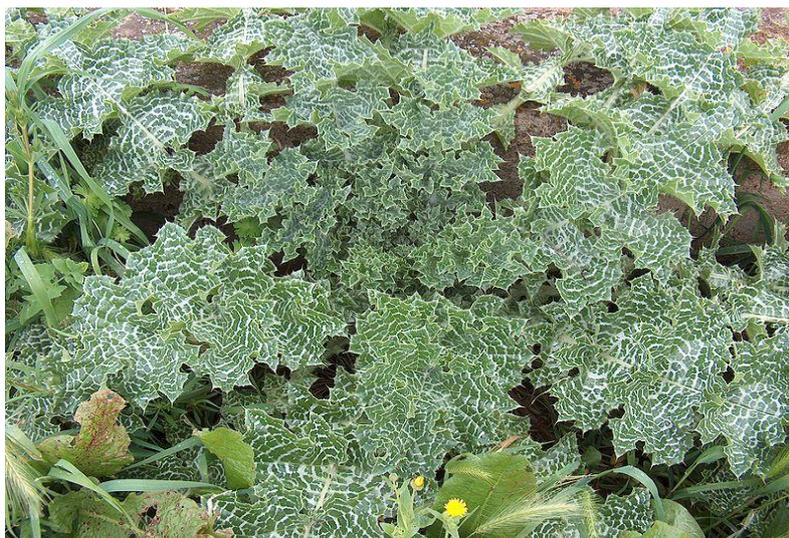


Figure I. 4 Feuilles de chardon Marie (www.themediteckwellnessgateway.com)

Fleurs : les capitules de fleurs sont violets (figure I.5). Les fleurs sont à 5 étamines qui forment un tube autour du style. Elles fleurissent depuis le mois de juin jusqu'au mois d'août

en Europe et en Asie (Morazoni et al. ,1993).



Figure I. 5 Fleurs de chardon Marie : fraîches (a) et sèches (b) (www.freeflowerpictures.net)

Fruits : (figure.I.6) sont sous forme de graines noires, luisantes, légèrement aplaties, plus ou moins marbrées de jaune. 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 (Morazzoni et al. ,1993).

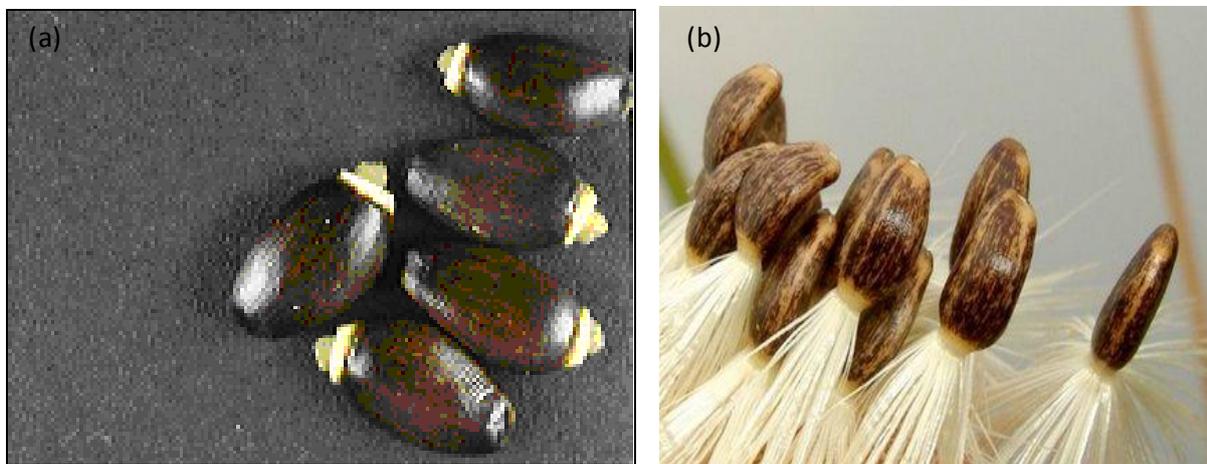


Figure I. 6 Graines de chardon Marie : libres (a) et attachés à la fleur (b)
(www.sciencephoto.com)

I.6. Cycle de vie

Le *Silybum marianum* est, du point de vue écologique, un végétal xérophile (adapté aux climats secs), nitrophile (préférence pour les milieux riche en azote) et thérophyte (poussant pendant la saison froide à l'état de graine).

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

Presque la quasi-totalité (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 (Sindel, 1991). La floraison débute dès le mois de juin jusqu'au mois d'août. C'est une floraison basée sur une inflorescence de type racème de capitule. A la fin de l'été, les graines sont complètement séchées. La pollinisation est autogame (par autofécondation) ou encore entomogame (la fécondation se fait par divers moyens : les insectes, le vent, etc). Le *Silybum marianum* est une espèce hermaphrodite (ayant des organes reproducteurs des deux sexes mâle et femelle) (Guittoneau et Huon, 1983).

Grâce à son cycle de vie et à sa croissance, le chardon Marie peut envahir une importante superficie. Le tableau I.2 récapitule les principales caractéristiques botaniques du chardon Marie.

Type d'inflorescence	Racème de capitule
Répartition des sexes	Hermaphrodite
Type de pollinisation	Entomogame, autogame
Période de floraison	juin à août
Type de fruit	Akène
Mode de dissémination	Anémochore
Type d'habitat	Friches vivaces
Aire de répartition	Méditerranée

Tableau I. 2. Tableau récapitulatif des caractéristiques de *Silybum marianum* (Burnie, 1997)

I.7. Composition chimique

I.7.1. Composition chimique de la graine

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 (qui peut être extraite séparément ou séparé des différents composés de l'huile) d'où l'intérêt porté à cette partie de la plante (Karkanis et al. ,2001)

La graine contient en fait 4 à 6 % de silymarine (Saller, 1995) dont 70-80% de flavonolignanes et 20-30% de composés polyphénoliques oxydés non identifiés (Svobodova et al. ,2006).

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 (Saller, 1995 ; Meschy et Guenguén, 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⁻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 (Amrani, 2006).

I.7. 2.Huile et acides gras de la graine de *Silybum marianum*

L'huile extraite des graines de *Silybum marianum* contient essentiellement des lipides, de la vitamine E (50 à 60 mg/100g (Garner, 2004)), et des flavonoïdes (0.25%, (Garner, 2004)) (Li et al. ,2011). Sa teneur élevée en acides gras insaturés (56% de polyinsaturés et 21 % de mono-insaturés) lui permet d'entrer dans les régimes anti-cholestérol et pour la prévention des maladies cardio-vasculaires (El-Mallah et al. ,2003).

Les lipides ont un rôle énergétique (1g de lipides = 9 kcal), ils sont les principaux constituants de la membrane cellulaire, et interviennent dans les communications intra et intercellulaires. En fait les acides gras sont les constituants élémentaires des lipides ; ce sont des molécules organiques comprenant une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxylique. Cette chaîne carbonée peut être dépourvue de toute double liaison et, dans ce cas, les acides gras sont dits saturés (AGS). Elle peut aussi présenter une ou plusieurs

double(s) liaison(s), les acides gras sont alors désignés sous les termes de monoinsaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI). Alors que les acides gras saturés, les monoinsaturés et une partie des polyinsaturés sont synthétisés dans l'organisme, les acides gras polyinsaturés des familles oméga 6 et oméga 3, ou tout du moins les acides linoléique et alpha-linolénique, doivent être apportés par l'alimentation (Cuvelier et al., 2004).

Les acides gras insaturés sont classés en familles par rapport à la première double liaison côté méthyl terminal. Ainsi, les acides gras des familles oméga 6 (n-6 ou ω 6) et oméga 3 (n-3 ou ω 3) ont pour caractéristique d'avoir leur première double liaison située respectivement à 6 carbones (n-6) et 3 carbones (n-3) de l'extrémité méthyl. Ces deux doubles liaisons sont impossibles à insérer chez l'homme et l'animal. Par contre, l'organisme humain et l'organisme animal peuvent ajouter aux deux acides gras indispensables (Figure I.7) (acide linoléique C18:2 n-6 et acide alpha-linolénique C18:3 n-3) des doubles liaisons supplémentaires, vers l'extrémité carboxyle, et allonger la chaîne à cette extrémité (Cuvelier et al., 2004).

L'ensemble des dérivés obtenus, ajoutés aux deux acides gras indispensables précurseurs, constitue les deux familles d'acides gras essentiels, nécessaires au maintien d'une fonction biochimique, cellulaire ou physiologique donnée.

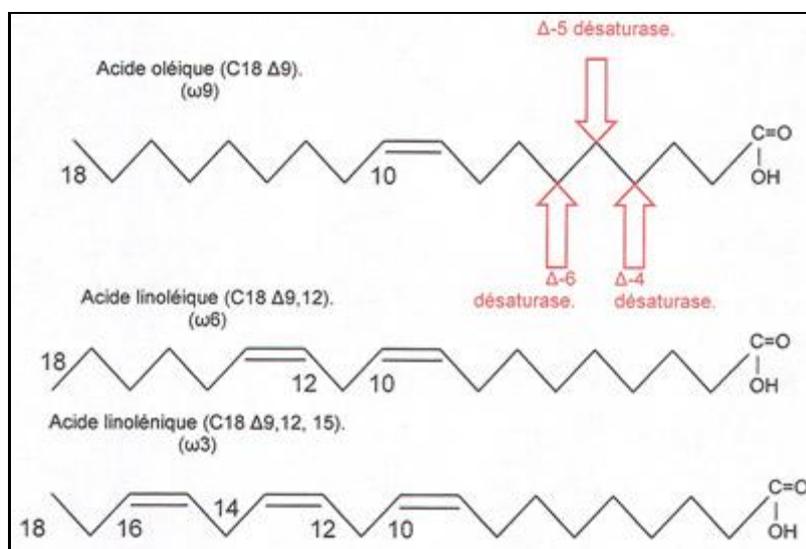


Figure I. 7 Structure des principaux acides gras (Touitou, 2006)

Dans la représentation schématisée des acides gras, la chaîne carbonée est symbolisée par une succession d'atomes de carbone reliés entre eux par des liaisons covalentes. Le tableau I.3 illustre les acides gras et leurs formules chimiques contenus dans l'huile extraite des graines de *Silybum marianum* (Cuvelier et al., 2004).

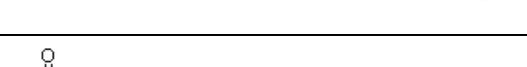
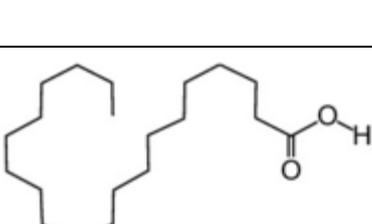
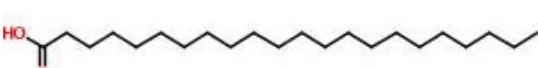
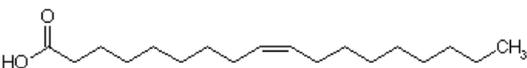
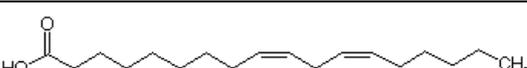
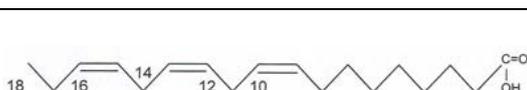
Structure	Taxonomies	Nom commun	Formule chimique
C12:0	Acide didécanoïque	Acide laurique	
C14:0	Acide tétradécanoïque	Acide myristique	
C16:0	Acide hexadécanoïque	Acide palmitique	
C16:1	Acide -7 <i>Cis</i> -9 hexadécaénoïque	Acide palmitoléique	
C18:0	Acide octadécanoïque	Acide stéarique	
C20:0	Acide eicosanoïque	Acide arachidique	
C22:0	Acide docosanoïque	Acide behénique	
C18:1	Acide -9 <i>Cis</i> -9 octadécaénoïque	Acide oléique	
C18:2	Acide -6 <i>Cis</i> -9,12 octadécadiénoïque	Acide linoléique	
C18:3	Acide -6 <i>Cis</i> -6,9,12 octadécatriénoïque	Acide linoléinique	

Tableau I. 3 Structure et taxonomies des acides gras (Cuvelier et al.,2004).

II. Les antioxydants naturels

II.1. Définition

Dans la nature, chaque organisme a pu mettre en œuvre un ou plusieurs systèmes de défense et de protection naturels pour lutter contre les agressions. Parmi eux ils existent les antioxydants qui ont été définis et mis en évidence en 1990 par Halliwell.

Un antioxydant est une molécule qui peut inhiber ou même retarder le phénomène d'oxydation, alors qu'elle présente une très faible concentration dans le milieu dans lequel elle intervient (acides aminés, lipides, protéines, carbohydrates, ADN), et ce en augmentant le temps au bout duquel intervient une altération décelable du produit (Tessier et Marconnet, 1995)

L'organisme est équipé d'un système complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques présents aussi bien dans les compartiments intra- et extracellulaires (Mette et Berger, 2006).

Parmi les mécanismes les plus importants dans lesquels interviennent les antioxydants est l'interruption des réactions d'oxydation et par définition l'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ces réactions en chaîne en s'oxydant avec les radicaux libres et en inhibant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols... (Mette et Berger, 2006).

Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi être destructrices : les plantes et les animaux utilisent et produisent de nombreux antioxydants pour se protéger, tels le glutathion, la vitamine C et la vitamine E, ou des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase et certaines peroxydases. Une déficience ou une absence de production d'enzymes antioxydantes entraîne un stress oxydatif pouvant endommager ou détruire les cellules.

Les antioxydants sont aussi beaucoup utilisés dans l'industrie comme conservateurs pour les aliments, les cosmétiques, ou encore pour préserver le caoutchouc ou l'essence.

Les antioxydants comprennent deux grands systèmes :

*Les systèmes non enzymatiques regroupant des antioxydants moléculaires endogènes (l'acide urique) et exogènes (vitamine C et E, polyphénols, carotènes).

*Les systèmes enzymatiques (sélénium, glutathion, glutathion de la peroxydase) (Mette et Berger, 2006).

II.2. Propriétés des antioxydants

D'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur : il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont réduire les radicaux libres si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé. Ainsi, les antioxydants présents dans les aliments protègent les molécules organiques (par exemple les graisses ou l'ADN) de l'oxydation et semblent jouer un rôle protecteur contre la cancérogenèse. Comme les antioxydants sont aussi interdépendants donc en cédant un électron, ils deviennent eux-mêmes des radicaux libres qui doivent être rééquilibrés et réduits (Mette et Berger, 2006).

II.3. Les différents types d'antioxydants

Les antioxydants cellulaires élaborent un système de défense perfectionné contre l'agression radicalaire (Hadi, 2004). Ils sont caractérisés par un mécanisme d'action qui peut être direct comme pour le cas des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques ou indirect en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Mette et Berger, 2006).

Dans ce travail, nous nous intéressons aux antioxydants non enzymatiques exogènes et plus précisément aux polyphénols.

Les polyphénols

De nombreuses études épidémiologiques et expériences in vitro réalisées sur les animaux révèlent que les polyphénols présents au niveau de certains fruits et végétaux possèdent des propriétés antioxydantes et exercent des effets anti-inflammatoire, anti-carcinogénique, antibactérien, anti-antimutagène, antiviral, antibactérien anti-tumorales. Les polyphénols sont des substances présentes dans les boissons obtenues à partir des plantes, des fruits, et des légumes, tels que l'huile d'olive, le vin rouge et le thé (Curtay et Robin, 2000).

Durant les dix dernières années, des études ont prouvé que les polyphénols ont, in vivo et in vitro, une activité qui consiste à réduire et à empêcher les effets de l'oxygène d'où dérivent les radicaux libres liés à des maladies humaines. Un intérêt spécial a été porté au rôle thérapeutique neurodégénératif comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Mette et Berger, 2006).

Les polyphénols sont divisés en trois familles :

- Les flavonoïdes
- Les tanins
- Les anthocyanes

Les flavonoïdes sont aussi appelées molécules piègeuses du fait de leur aptitude à piéger efficacement les radicaux libres.

Ils sont aussi des chélateurs des métaux (cuivre, fer) origine de la production de radicaux libres par réactions de Fenton et d'Haber-Weiss.

Les flavonoïdes sont des substances liposolubles et hydrosolubles. La figure I.9 représente la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont présents dans les végétaux et dans les différents composants comme les graines, l'écorce, les feuilles et les fleurs des plantes, les conditions climatiques et les conditions environnementales jouent un rôle important dans cette répartition.

Certains types de flavonoïdes sont présents dans des aliments plus que d'autres, nous mentionnons à titre d'exemples les :

- Flavanones: naringénine présente dans les fruits du genre citrus
- Flavones : Chrysin présente dans la peau des fruits ; Apigénine présente dans le persil, le thym, le romarin, le céleri. Lutéoline présente dans le persil et le céleri
- Flavonol : Kaempférol présent dans le radis, le brocoli, le thé noir. Quercétine présente dans l'oignon, la pomme, l'olive, le vin rouge, la tomate. Myricétine présente dans le vin rouge
- Flavan-3-ols : Epicatéchine présente dans le thé vert, le thé noir ; Catéchine présente dans le thé vert, le thé noir. Epigallocatechine présente dans le vin rouge
- Anthocyanidols : Cyanidol présent dans le cassis, les myrtilles. Malvidol présente dans les raisins, les fraises, le cassis. Apigénidol présent dans les framboises et les fraises.

Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs mais très abondants dans quelques familles comme les polygonacées, les rutacées, les légumineuses, les apiacées,(ombellifères) et les astéracées(composées) (Hadi, 2004) .

Les flavonoïdes sont des protecteurs vasculaires améliorant la résistance et la perméabilité des vaisseaux artériels et veineux d'où leurs utilisations en thérapeutique en tant que vasculoprotecteurs et veinotoniques. Ils augmentent aussi la résistance des vaisseaux en protégeant le tissu conjonctif périvasculaire des dégradations enzymatiques. Ils favorisent les échanges liquidiens transcapillaires et la diffusion des protéines plasmatiques.

De nombreuses recherches menées afin de prévenir et de ralentir la croissance et le développement du cancer ont montré que les flavonoïdes ont un effet considérable dans l'inhibition de la croissance de lignées cellulaires cancéreuses en interférant avec les

mécanismes de transduction des signaux mitogènes à des stades du cycle cancérigène à savoir l'initiation, la promotion et la progression.

Leurs mécanisme consiste à inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des procarcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes (Hadi, 2004).

Plusieurs études ont confirmé que la consommation de flavonoïdes alimentaires a un effet préventif important dans la lutte contre des types de cancer comme le cancer des poumons et de la prostate. Dans certains cas, les flavonoïdes peuvent agir en association avec la vitamine C pour optimiser et potentialiser les effets de la vitamine C (Hadi, 2004)..

II.4. Les antioxydants de *Silybum marianum*

Depuis ces dernières années, les antioxydants (les caroténoïdes, les tocophérols, les vitamines C et E, les polyphénols...) ont fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques qui se sont révélé intimement liés à leurs consommation dans les fruits et les légumes et à leurs réduction des incidents cardiovasculaires et des tumeurs cancéreuses (Milpied-Homsi, 2004) .

A part les polyphénols les plus connus, il existe une grande famille connue sous le nom des flavonolignanes présents uniquement au niveau des graines de *Silybum marianum*. En fait, la silymarine est un élément naturel et constitutif de ce fruit composé d'un mélange de flavonolignanes : silychristine, silydianine, et de deux groupes de diastéréiosomères la silybine A, la silybine B, l'isosilybine A et l'isosilybine B (Hadi, 2004).

La silymarine était considérée comme un composé pur mais avec de nouvelles techniques d'analyse et de séparation, plusieurs auteurs (Brown, 1993 ; Foster 1990) ont confirmé que la silymarine est en réalité formé d'un mélange isomérique des flavonolignanes actifs : silychristine, silydianine et deux groupes de flavonolignanes diastereoisomériques la silybine A, la silybine B, l'isosilybine A et l'isosilybine B dont les structures chimiques sont schématisées dans la figure I.10 (Foster, 1990) .

Le composé le plus actif biologiquement est la silybine. Plusieurs études ont prouvé son efficacité thérapeutique par rapport aux autres composants de la silymarine.

Les deux diastéréiosomères de la silybine : la silybine A (3,5,7-trihydroxy-2-[3-(R) - (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(R)-(hydroxyméthyl) - 2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-one) et la silybine B (3,5,7-trihydroxy-2-[3-(S)-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) - 2-(S)-(hydroxyméthyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]chroman-4-one) sont présents à des taux égaux (Foster, 1990).

Depuis 200 ans, à travers ces flavonolignanes le *Silybum marianum* a pu confirmer son utilisation comme remède et de nos jours, on apprécie son utilisation partout dans le monde et surtout en Europe et aux Etats-Unis où leurs préparations sont disponibles pour un usage clinique (Milpied-Homsi, 2004).

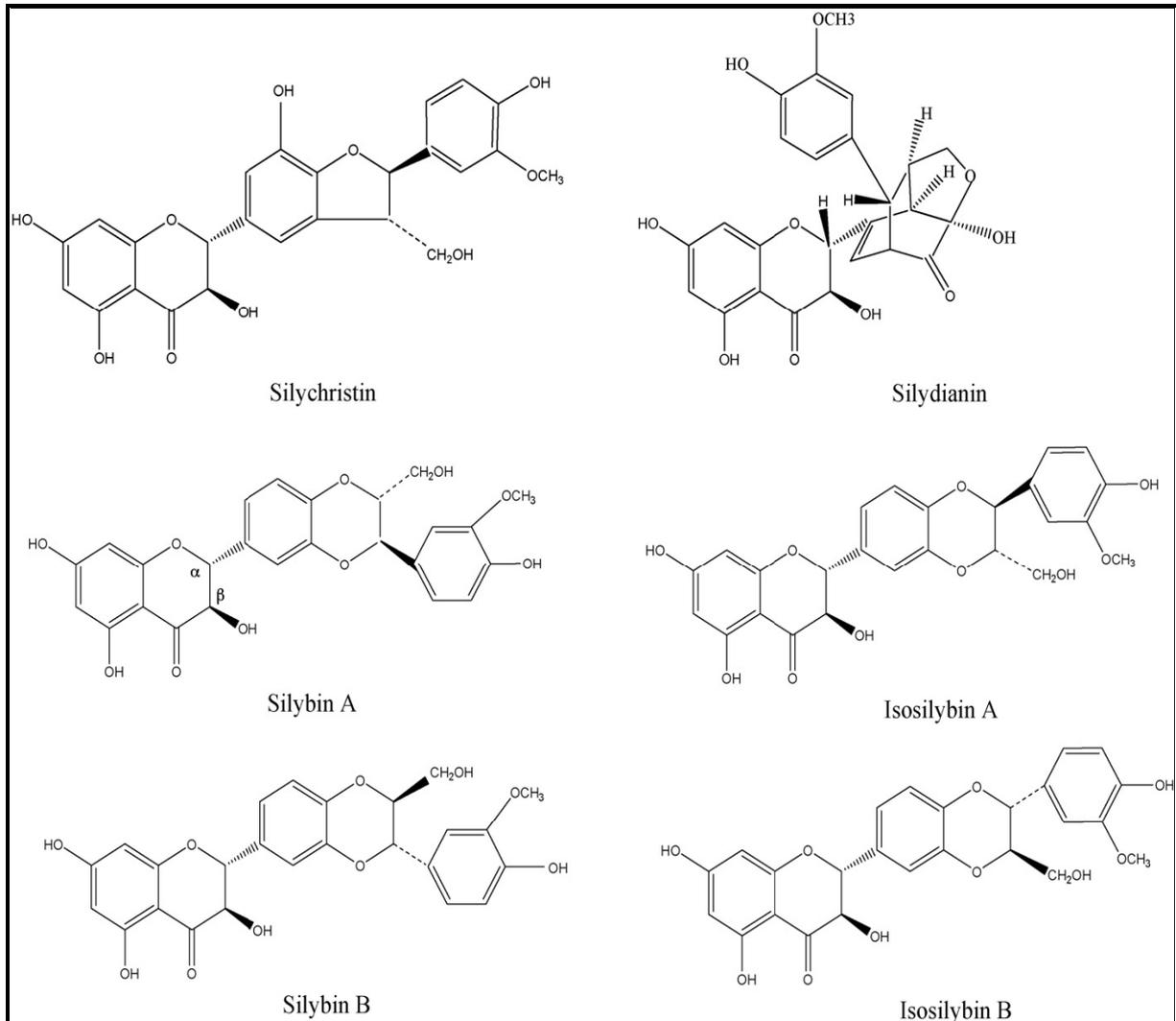


Figure I. 10 Les flavonolignanes de *Silybum marianum* (Foster, 1990).

Autrefois, la silymarine était connue par sa capacité à lutter contre les affections hépatiques et la cirrhose du foie en empêchant les dommages du foie provoqués par l'alcool, les drogues, les pesticides et quelques poisons, elle est aussi capable de traiter l'empoisonnement par certains champignons venimeux, on a aussi reconnu son rôle pour empêcher la carcinogénèse. (Tessier et Marconnet, 1995).

Par l'action de ces différents mécanismes (action antioxydante, stabilisateur de la membrane cellulaire...) la silymarine possède des propriétés anti-inflammatoires d'où son utilisation dans le cas d'asthme allergique (Arrigo et Scharenberg, 2006).

De nombreux traitements, destinés à combattre le virus de SIDA provoquent l'endommagement du foie, du tube digestif et même des reins : la silymarine a pu aider à traiter ces dommages dont les plus importants sont l'indigestion, l'affaiblissement de la fonction rénale et hépatique (Berger, 2006).

Les propriétés pharmacologiques attribuées à la silymarine sont essentiellement les propriétés de la silybine qui ont été étudié par Vogel (1968). En fait, les propriétés antioxydantes de la silybine ont été observées dans divers modèles cellulaires, y compris des cellules de foie (Foster, 1990).

La silybine a un pouvoir hépatoprotecteur qui protège contre la phalloïdine, l' α -amanitine, le praséodymium, le tétrachlorure de carbone, l'éthionine et la thioacétamide, poisons qui ont en commun l'attaque élective des hépatocytes (Curtay et Robin, 2000).

Elle stimule l'ARN polymérase I et donc la synthèse de l'ARN et des protéines (Foster, 1990).

III. *Silybum marianum* en thérapeutique

III.1. Généralités

Le *Silybum marianum* est utilisé en médecine traditionnelle comme aide digestif, anti-inflammatoire, tonique antinéoplastique, diurétique (Meschy et Guenguen, 1995).

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% (Meschy et Guenguen, 1995).

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. Ces composés subissent le recyclage enterhépatique ce qui a comme conséquence des concentrations plus élevées dans les cellules de foie que dans le sérum (Widmer, 1999).

C'est un véritable antidote contre l'empoisonnement surtout celui dû aux champignons en bloquant leur effet venimeux.

D'un point de vue résultats, 4 sur 6 des études effectuées sur l'affection hépatique alcoolique montrent une amélioration significative des fonctions de foie. Toutes les études sur la cirrhose alcoolique et non alcoolique ont affirmé que l'administration d'extrait de chardon Marie est associée à des améliorations remarquables. D'autres études ont évalué le chardon Marie comme efficace dans la prévention des dommages dues aux drogues hépatotoxiques en améliorant la survie biochimiques et histologiques.

Au niveau du rein, les composés de *Silybum marianum* réduisent les dommages oxydants des cellules rénales in vitro et peuvent empêcher la synthèse du cholestérol et réduire les lipides du sang.

Des expérimentations effectuées sur des diabétiques humains ont montré une nette régulation du glucose et de l'insuline dans le sang après l'administration du *Silybum marianum* d'où son aptitude à protéger le pancréas (Amrani, 2006).

Il augmente également la prolifération des lymphocytes, de l'interféron gamma, de l'interleukine 4 et des cytokines interleukines10 d'où un rôle important dans la survie des cellules immunitaires et donc un rôle dans la prévention des maladies infectieuses.

D'autres études ont montré que le chardon Marie favorise la différenciation et la survie neuronales (Amrani, 2006).

Les composés de *Silybum marianum* sont considérés comme agents chemopréventifs normaux qui offrent potentiellement la possibilité d'une utilité sûre en combinaison avec les agents chimiothérapeutiques tels que le doxorubicin, le carboplatin ou le cisplatine dans le traitement du cancer du sein. En raison de son potentiel antiprolifératif, ces composés peuvent être utilisés en thérapeutique dans le traitement du cancer de la prostate (Jozef et al., 1988).

Le chardon Marie est aussi utilisé dans le cas des patients atteints de VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine). Le chardon-Marie n'a pas fait l'objet d'essais cliniques contrôlés à titre de traitement des lésions hépatiques causées par ce virus. Pourtant, on en a évalué la capacité d'aider des patients à se remettre des lésions hépatiques causées par d'autres problèmes de santé chroniques.

Des études ont confirmé que le chardon-Marie peut ralentir ou réduire l'activité de certaines enzymes du foie. Ces enzymes ont pour rôle de dégrader plusieurs des substances consommées, ainsi que les molécules chimiques ingurgitées comme les médicaments. Lorsque l'activité de ces enzymes est compromise, ces molécules risquent de demeurer plus longtemps dans le sang et d'atteindre des concentrations trop élevées dans le sang. Ceci

entraîne des effets secondaires ou aggrave des effets secondaires déjà existants. Alors que si l'activité de ces enzymes est stimulée, les taux de médicaments risquent d'atteindre des valeurs sous les normales. Dans ce cas, le VIH pourra résister plus facilement aux médicaments et les options thérapeutiques futures seront limitées (El-Mallah et al., 2003).

III.2. Toxicité

Le chardon Marie est non-toxique. Dans une étude expérimentale réalisée sur des souris, les résultats ont montré qu'elles pouvaient tolérer une dose de 20g kg^{-1} . Toutes fois des réactions allergiques ont été reportées (Sindel, 1991 ; Saller, 1995).

III.3. Biodisponibilité de la silymarine et de la silybinine

Selon l'European Medicines Evaluation Agency (EMA, Human guideline 2001) la biodisponibilité se définit comme étant la vitesse et l'étendue avec lesquelles la substance active ou sa fraction active est absorbée à partir de sa formulation pharmaceutique et devient disponible au site d'action (Toutain et Bousquet-Melou, 2008).

Des études sur la biodisponibilité de la silybine, qui est le constituant majeur le plus actif de la silymarine, ont été menées sur des souris. La première observation après 30 minutes de l'administration d'une dose de 50 mg / kg dose orale de silybinine à la souris est une détection de la silybinine sous sa forme libre dans le foie, les poumons, l'estomac et le pancréas. Dans d'autres organes, tels que la prostate et la peau, la détection a été réalisée seulement 1 h après l'administration. Les résultats de son administration systémique montrent clairement la biodisponibilité de la silybinine (Zhao et Agarwal, 1999). En outre, dans la littérature de nombreux travaux ont étudié la biodisponibilité accrue testée sur différents modèles animaux (Abrol et al., 2005 ; El-Samaligy et al., 2006). Une autre étude détaillée sur la biodisponibilité et l'efficacité clinique a été réalisée sur les humains avec un principe actif commercialisé appelé Siliphos®. Dans cette étude, les auteurs ont constaté que la silybine est plus disponible sous la forme Siliphos® que sous sa forme non complexée (Kidd et Head, 2005).

III.4. Effets hépatoprotecteurs

Depuis des siècles la silymarine a été largement utilisée pour ses effets hépatoprotecteurs, bien que d'autres effets bénéfiques sur la santé soient reconnus depuis quelques années. La plupart de ces effets ont été attribués à la capacité antioxydante de la silymarine, comme étant un capteur des espèces réactives d'oxygène, un piègeur de radicaux cétyle phénylglyoxylique (Luper, 1998).

Ces dernières années, des efforts accrus ont été consacrés à comprendre les mécanismes de l'effet hépatoprotecteur de la silymarine, en utilisant des modèles expérimentaux de différentes maladies du foie, ainsi que des patients humains atteints de maladies du foie. Les résultats de ces études ont en partie éclairé certains aspects des mécanismes hépatoprotecteurs de la silymarine. En cas de maladies alcooliques du foie (ALD), où le stress oxydatif et l'inflammation sont la clé dans le cas de la pathogenèse, la silymarine a pu exercer des pouvoirs hépatoprotecteurs en atténuant les facteurs de la nécrose des tumeurs (TNF), diminuant l'activité de la production du sérum alanine aminotransférase (ALT), inhibant la peroxydation des lipides et l'augmentation contenue du glutathion intracellulaire (Song et al., 2006).

III.5. Effets contre l'hypercholestérolémie

Les effets préventifs de la silymarine contre l'hypercholestérolémie induite par l'alimentation ont été observés chez les rats, et les effets ont été comparables à celui observé avec des médicaments hypocholestérolémiant, Probucol (Krecman et al., 1998). Les effets hépatoprotecteurs de la silymarine ont également été observés dans le cas de la toxicité hépatique induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) - et l'acétaminophène (PAA), due en partie à son pouvoir antioxydant (Luper, 1998). La silibinine exerce aussi des effets hépatoprotecteurs en partie par inhibition de la formation des leucotriènes par les cellules de Kupffer (Dehmlow et al., 1996), et estimé comme un des médiateurs de la réponse immunitaire in vivo (Schumann et al., 2003).

La silymarine a également été signalée pour exercer un effet protecteur contre les lésions mitochondriales dans le foie de rat, survenant pendant la transplantation et / ou la chirurgie du foie, en empêchant les altérations de la mitochondrie, la diminution du potentiel de la membrane et la sensibilité accrue à la transition de perméabilité mitochondriale (MPT) (Rolo et al., 2003).

III.6. Effet sur le diabète

Plusieurs études cliniques ont été menées afin d'étudier l'efficacité hépatoprotectrice de la silymarine dans diverses pathologies dans le foie et dans d'autres organes. La majorité de ces essais cliniques ont été réalisés sans aucune précaution majeure et ont concerné la toxicité et la biodisponibilité de ce composé chez l'homme. L'administration de 600 mg de silymarine par jour à deux groupes de patients diabétiques atteints de cirrhose alcoolique et traités à l'insuline, a permis d'observer après seulement 4 mois de traitement, une diminution significative de la glycémie.

Les résultats ont permis conclure que la silymarine conduit à la peroxydation des lipides et à la diminution du taux d'insuline exogène. Dans une autre étude sur les patients alcooliques atteints de cirrhose hépatique, l'administration de 450mg de silymarine (150mg /3 fois par jour) pendant 2 ans (comparé à l'effet d'un placebo) n'a aucun effet sur la survie et l'évolution clinique de la maladie (Pares et al. ,1998).

Trappolier et al. , (2005) ont mené des expériences avec un complexe de silybinine/vitamine E /phospholipides, qui a été administré à des patients non alcooliques (sans mettre en évidence l'atteinte du virus de l'hépatite C (VHC). Les résultats de cette étude ont permis d'attribuer une valeur thérapeutique à ce complexe se résumant à l'amélioration de la résistance à l'insuline.

La silymarine contient un grand nombre de constituants actifs incluant les flavonoïdes aux propriétés antioxydantes, qui augmentent le taux cellulaire de glutathion et les propriétés stabilisatrices des membranes cellulaires. Chez les patients diabétiques de type 2, l'augmentation du glucose et des acides gras libres mène à la génération d'espèces réactives de l'oxygène et au stress oxydatif. Ces anomalies métaboliques n'induisent pas que des complications ultérieures mais mènent aussi à la résistance à l'insuline, au dysfonctionnement des cellules β , et à la diminution de la sécrétion d'insuline.

La silymarine, grâce à son pouvoir antioxydant, est active contre le stress oxydatif, et peut induire un effet positif sur les anomalies métaboliques diabétiques. La silymarine régule la sécrétion des enzymes comme le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase, dans des modèles animaux. Cela peut exercer des effets potentiels inhibiteurs sur la relance de la peroxydation lipidique. L'utilisation d'antioxydant comme la silymarine en traitement complémentaire chez les patients diabétiques de type 2 nécessite de futures investigations.

III.7. Autres effets

Les flavonolignanes de la silymarine ont montré des effets protecteurs sur les cardiomyocytes de rats exposés à la doxorubicine en raison de son pouvoir antioxydant, chélateur du fer et aussi pour sa capacité à stabiliser la membrane cellulaire (Chlopčikova et al. ,2004).

Les effets anti-athérosclérotiques de silymarine ont été démontrés dans le système in vitro, la silymarine peut inhiber l'expression des molécules d'adhésion des cellules HUVEC (Kang et al. 2003). La silymarine a également été mentionnée pour ses pouvoirs

neurotrophiques et ses effets neuroprotecteurs, car elle favorise la différenciation et la survie des cellules nerveuses (Kittur et al., 2002).

Grâce à ses effets immunostimulants, la silymarine augmente la sécrétion d'interféron-alpha (IFN- α), l'interleukine-4 (IL-4) et l'interleukine-10 (IL-10) dans les lymphocytes (Wilasrusmee et al., 2002). Les effets protecteurs de la silymarine ont été observés contre les dommages induits par l'acétaminophène chez le cerveau du rat, ceux-ci ont été attribués à son potentiel antioxydant dans la prévention de la peroxydation des lipides, (Nencini et al., 2006).

III.8. L'efficacité préventive de la silymarine et de la silibinine contre les mécanismes associés au cancer

Les premières recherches sur la silymarine se sont intéressées à ses effets hépatoprotecteurs mais au fil du temps de nombreux autres effets biologiques de la silymarine ont été reconnus. L'un d'entre eux a permis de reconnaître l'efficacité anticancéreuse de la silymarine en démontrant son activité anti-tumorale contre la 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) ainsi que la stimulation des tumeurs induites dans l'épiderme de souris, qui a été attribué à sa capacité à inhiber l'activité épidermique et l'expression de l'ornithine décarboxylase (Agarwal et al., 1994).

L'activité anticancéreuse de la silymarine ainsi que celle de la silibinine ont été observées contre le cancer du sein (Zi et al., 1998 ; Tyagi et al., 2004), le cancer de la peau (Ahmad et al., 1998 & Lahiri-Chatterjee et al., 1999), le cancer de la prostate (Zi et Agarwal, 1999 ; Zi et al., 2000 & Bhatia et Agarwal, 2001 ; Thelen et al., 2004) le cancer du col de l'utérus (Bhatia et al., 1999), le cancer de la vessie (Tyagi et al., 2004), le cancer hépatocellulaire (Varghese et al., 2005) le cancer du côlon, (Agarwal et al., 2003) le cancer de l'ovaire, (Scambia et al., 1996) et le cancer du poumon (Sharma et al., 2003 & Chu et al., 2004).

Les résultats de ces études dans les systèmes de culture cellulaire *in vitro* des différents cancers ont fourni des données pour d'autres recherches afin d'explorer leur efficacité et leurs applications cliniques.

La silymarine a une implication dans la prévention du cancer et son potentiel anti-angiogénique grâce à l'inhibition de facteur de croissance vasculaire (VEGF) l'endothélium vasculaire et la sécrétion de la matrice métalloprotéinase-2 (MMP-2) (Jiang et al., 2000 ; Yang et al., 2003).

III.8.1. Cancer de la peau

Comme mentionné précédemment, la silymarine possède la capacité de réduire l'expression de promoteur endogène de la tumeur TNF α dans 7,12 Diméthylbenz (a) anthracène (DMBA) initié et TPA / Acide okadaïque (OA) promoteur des tumeurs cutanées chez SENCAR souris (Zi et al. ,1997). La silymarine a également été signalée grâce à ses effets thérapeutiques, in vivo administrée dans l'alimentation, contre le DMBA initié et le promoteur TPA du papillovirus dans la peau des souris SENCAR.

III.8.2. Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est la deuxième cause de cancer lié au décès chez les hommes américains (American Cancer Society, 2005). L'échec des traitements conventionnels, notamment l'effet de l'hormone de PSA (antigène prostatique spécifique) a conduit à des efforts croissants afin de découvrir de nouvelles approches pour combattre cette maladie. Dans ce but, l'utilisation de divers agents chimio-préventifs, en particulier d'origine naturelle comme l'incitation à une alimentation biologique ou la prise de compléments alimentaires sans toxicité systémique. Donc, la silymarine / silybinine a montré une activité potentielle anticancéreuse contre les deux lignées des cellules cancéreuses de la prostate hormono-dépendants et hormono-indépendants.

Des études visant à tester l'efficacité in vivo de silymarine / silybinine menées ont révélé que l'alimentation biologique de souris portant le facteur tumorale DU145 de la prostate inhibe significativement la croissance tumorale et augmente le niveau d'insuline sécrétée (IGFBP-3) dans le plasma sans aucun symptôme de toxicité (Singh et al. ,2002).

III.8.3. Cancer du sein

Des études menées ont révélé que la silybinine exerce des effets synergiques anticancéreux avec des médicaments et des agents chimiothérapeutiques telles que la doxorubicine, le cisplatine et la carboplatine dans les cellules cancéreuses humaines MCF-7 et MDA-MB468 (Scambia al. ,1996 ; Tyagi et al. ,2004).

Cependant, il n'y a qu'une seule étude in vivo dans la quelle les auteurs ont évalué l'efficacité du traitement préventif du cancer du sein chez le rat.

Contrairement à l'efficacité anticancéreuse de la silymarine contre les cellules cancéreuses du sein, les compléments alimentaires de la silymarine augmentent moyennement le nombre de tumeurs mammaires chez les animaux traités avec le 1 - méthyl-1-nitrosourée (MNU). Dans cette étude, l'augmentation de l'incidence et la multiplicité des tumeurs

mammaires ont été également observées par l'administration de la silymarine chez la souris (Malewicz et al. ,2006).

III.8.4. Cancer de la vessie

Les travaux de Vinh et al, (2002) ont permis de constater que la silybinine inhibe la croissance et la prolifération du CCI (Transitional Cell Carcinoma) au niveau des cellules cancéreuses de la vessie chez l'être humain en provoquant un arrêt du cycle cellulaire et en induisant l'apoptose.

In vivo, une seule étude a concerné l'administration de la silymarine à la phase d'initiation ou à la phase post-initiation de la N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (OH-BBN) induite par la carcinogénèse de la vessie chez des souris mâles ICR et a permis de conclure qu'il y a une diminution considérable de l'incidence des néoplasmes de la vessie et des lésions préneoplasiques. (Vinh et al. ,2002). Ces résultats suggèrent que la silymarine peut être un agent chimio-préventif avec un potentiel efficace contre le cancer de la vessie.

III.8.5. Cancer des poumons

La silybinine peut améliorer le potentiel thérapeutique de la chimiothérapie traditionnelle via la doxorubicine (médicament) par une inhibition de doxorubicine induite par la chimiorésistance.

En outre, la silybinine améliore aussi les effets néfastes associés à la doxorubicine sur la santé (Singh et al. ,2004). D'autres études ont été menées pour évaluer l'efficacité chimio-préventive de la silybinine dans les tumeurs pulmonaires chez la souris.

Cependant, il est possible que la silybinine exerce ses effets principalement au stade de post- initiation de la tumorigénèse de cancer du poumon, et que les taux de la silybinine utilisées dans cette étude fussent beaucoup plus faibles, et pourraient ne pas avoir atteint des niveaux physiologiquement pertinents chez les animaux. Dans la plupart des expériences in vitro du cancer du poumon, la silybinine a permis d'empêcher l'invasion de ces lignées cellulaires (Chen et al. ,2005 ; Chu et al. ,2004).

III.8.6. Cancer du colôn

L'efficacité anticancéreuse de la silymarine / silybinine a été mentionnée dans le cas de nombreuses lignées cancéreuses du côlon dans plusieurs études mais uniquement deux études sont disponibles dans la littérature qui ont évalué l'efficacité de chimio-préventive in vivo de la silymarine dans le cancer du côlon. Dans une première étude, les auteurs signalent

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

Dans une étude plus détaillée, on n'a observé que l'administration par l'alimentation pendant 4 semaines de la silymarine, soit pendant ou après l'exposition à l'agent cancérigène AOM, conduit à une importante réduction du nombre de colonies adénomiques.

Dans une expérience à long terme, la silymarine réduit significativement l'incidence et la multiplicité des adénocarcinomes du côlon lors de la phase d'initiation ou la phase de post-initiation de cancérogenèse colique induite par l'AOM (Kohno et al., 2002). La silymarine peut aussi exercer des effets bénéfiques via la réduction de l'antigène nucléaire (PCNA) des cellules proliférantes et les cellules positives et l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Parmi les effets bénéfiques de la silymarine, Gershbein, (1994) a noté la baisse de la sécrétion de la prostaglandine E2 (PGE2).

III.8.7. Cancer des ovaires

Des études ont été menées avec la silybinine commercialisée sous le nom de Silipide ou BID 1016 (complexe de silybinine et de phosphotidylcholine) afin d'améliorer sa biodisponibilité. Ces études ont permis d'observer que l'administration de la BID 1016 par gavage oral des souris porteuses de xénogreffes de la lignée de cellules cancéreuses humaines A2780 de l'ovaire produit une inhibition significative du poids de la tumeur (Gallo et al., 2003).

Dans une autre étude, Giacomelli et al., (2002) ont rapporté que Silipide a augmenté le potentiel de la cytotoxicité des médicaments anticancéreux comme le cisplatine (CDDP) *in vitro*.

Grâce à ses activités biologiques citées dans de nombreuses publications, les molécules bioactives des graines de *Silybum marianum* présentent intérêt croissant, cependant la technique d'extraction de ces molécules restent toujours une question pertinente.

IV. Extraction

IV.1. Extraction par solvants organiques

De nombreuses substances sont extraites de produits naturels d'origine végétale, animale ou minérale (colorants, parfums, arômes, huiles essentielles...). Il existe de nombreux procédés (filtration, décantation, distillation, extraction...) dont certains sont très anciens. Ces

techniques sont très utilisées dans différents domaines de la chimie (industrie pharmaceutique, parfumerie, industrie alimentaire...).

En ce qui concerne la matière végétale, il existe des techniques conventionnelles comme l'entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation (Carnat et al. ,1998 ; Hadolin et al. ,2004 ; Carvalho et al. ,2005 ; Dastmalchi et al. ,2008 ; Rozzi et al. ,2002 ; Bocevska), l'extraction par Soxhlet (Toth et al. ,2003 ; Sterbova et al. ,2004 ; Grigonis et al. ,2005 ; Reighard) , l'extraction en mode batch (Herodez et al. ,2003 ; Zgoraka et Glowniak,2001 ; Carnat et al. ,1998 ; Liu et al. ,2006 ; Cavalho et al. ,2005) et l'extraction assistée par sonication (Caniova et Brandsteterova,2001 ; Janiscsak et Mathe,1999 ; Janiscsak et Mathe,1997 ; Wang et al. ,2004 ; Tena et Valcarcel,1997).

L'extraction par Soxhlet est souvent mentionnée dans la littérature (Luque de Castro et Garcia-Ayuso, 1998). C'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide.

Le premier avantage à citer est que ce phénomène d'extraction se produit en faisant entrer le solvant d'extraction en contact avec la matrice solide, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. L'extraction peut durer aussi longtemps qu'il reste des extractibles dans la matrice végétale.

Le principal inconvénient est la nécessité de chauffer les solvants jusqu'à leur point d'ébullition pendant l'extraction, ce qui peut entraîner la dégradation des molécules thermosensibles (Rozzi et al. ,2002). Par comparaison avec les autres techniques conventionnelles (entraînement à la vapeur et hydrodistillation), la durée d'extraction est plus importante et la quantité de solvant consommée est plus grande, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental ainsi que sur le plan d'utilisation de l'extrait obtenu puisque les résidus du solvant (même après son élimination persiste) dans l'extrait, limitant ainsi son emploi dans les domaines alimentaire et cosmétique. Puisque cette technique est généralement suivie d'une étape d'évaporation du solvant qui porte l'extrait obtenu à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles. Cependant des échauffements locaux sont également possibles (Grigonis et al. ,2005). Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable (Wang et Waller, 2006).

Ce procédé d'extraction en mode batch convient à des végétaux dont le rendement en huile est suffisamment important. Les solvants les plus utilisés sont : l'éther, l'hexane, le chloroforme et le méthanol qui s'évaporent rapidement. Le solvant lave la matière première

qui subira après décantation et concentration, une distillation partielle. Ce solvant volatil est alors séparé de la concrète par filtrage puis glaçage de -12°C à -15°C . La précieuse substance ainsi obtenue est à nouveau filtrée et condensée à faible pression (Grigonis et al. ,2005).

Plusieurs solvants ont été utilisés dans l'extraction des graines de chardon Marie : l'éther de pétrole/éthanol (Subramaniam et al. ,2008), l'éther de pétrole, l'hexane (Martinez, 1989), le dichlorométhane, le chloroforme (Hadolin et al. ,2001).

Subramaniam et al. ,(2007) ont étudié l'effet du prétraitement de la matrice végétale (graines de *Silybum marianum*) par l'hydroxyde de sodium, par l'acide sulfurique, la cellulase et le bicarbonate de sodium afin d'étudier l'influence de la température et de la pression de l'extraction par CO_2 supercritique.

De nombreuses recherches ont été menées dans le but d'éviter certains inconvénients des procédés d'extractions conventionnels et ont conduit aux développements de nouvelles méthodes d'extraction utilisant les fluides supercritiques ; nous nous intéresserons dans ce travail à l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique.

IV. 2. Extraction par le dioxyde de carbone supercritique

IV. 2.1. Introduction

La première application d'extraction par fluide supercritique fut la décaféinisation de grains de café en 1971. Suite à l'avancée de cette technique, l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (1989) lança un programme de développement des méthodes d'extraction par fluide supercritique en vue de diminuer de 95% la consommation de solvants organiques chlorés.

Au cours de ces dernières années, les fluides supercritiques ont suscité un intérêt croissant dans différents domaines d'application industrielle tels que le domaine agro-alimentaire, la pharmacie, l'environnement (la dépollution des sols, l'extraction de pesticides, de métaux lourds et d'hydrocarbures...). Cette diversité d'application repose principalement sur les propriétés spécifiques qui concernent les phénomènes de solvatation sélectifs, de pouvoir de solubilité ou de réactivité.

L'existence d'un 'état' supercritique fut découverte par le Baron Cagniard de la Tour 1822-1859 (physicien et ingénieur français de l'Ecole Polytechnique). Il constata la disparition de l'interface gaz-liquide de certaines substances chauffées en milieu fermé.

Johannes Diderick Van der Waals (1837-1923) a énoncé le principe du « point critique » qui est le point d'arrêt de la courbe d'équilibre liquide-vapeur.

En 1879, le pouvoir solvant des fluides supercritiques fut décrit par Hannay et Hogarth. Ils observèrent la solubilité élevée de l'iodure de potassium dans l'éthanol supercritique ($T_c=243^\circ\text{C}$ et $P_c=63\text{ atm}$) et montrèrent que la réduction de la pression provoquait la précipitation du sel à partir du fluide homogène (Sevha, 1976).

IV. 2.2. Diagramme de phase d'un corps pur

Par définition, le domaine supercritique est caractérisé par la disparition de l'interface séparant le domaine liquide et le domaine gazeux au-dessus d'une certaine température et d'une certaine pression. Comme mentionné précédemment le point critique est défini par sa température et sa pression critique (P_c ; T_c) et prend des valeurs particulières pour chaque corps pur (Clifford, 1989). L'exemple d'un diagramme de phases (dioxyde de carbone) est présenté sur la figure I.11.

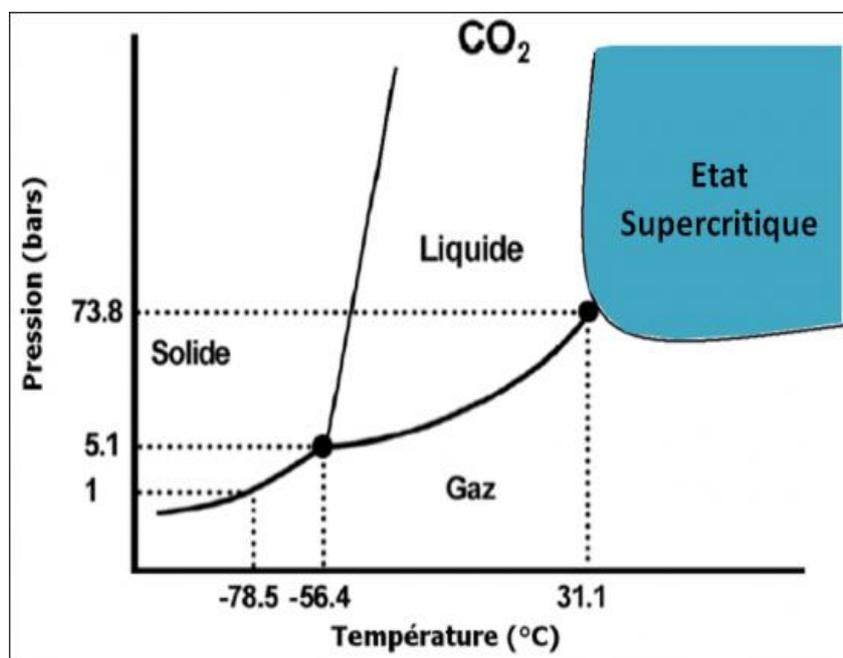


Figure I. 11 Diagramme de phase du CO₂ supercritique (Luque de Castro et al.,1994).

IV. 2.3. Principaux fluides supercritiques et leurs propriétés physico-chimiques

Les fluides traditionnellement utilisés pour l'extraction en mode supercritique sont le dioxyde de carbone et l'eau. Comme le montre le tableau I.4 (Luque de Castro et al., 1994), les paramètres critiques (pression et température) varient fortement suivant le choix du fluide supercritique. Les propriétés des fluides supercritiques (tableau I.5) sont intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz. Le fluide supercritique présente une viscosité faible et une diffusivité élevée comme les gaz et une masse volumique se rapprochant de celle d'un liquide.

Fluide	Pression (bar)	Température (°C)	Masse volumique (kg/m ³)
Dioxyde de carbone	73,8	31,1	468
Ethane	48,8	32,2	203
Ethylène	50,4	9,3	200
Propane	42,5	96,7	220
Propylène	46,2	91,9	230
Benzène	48,9	289	302
Toluène	41,1	318,6	290
Chlorotrifluorométhane	39,2	28,9	580
Trichlorofluorométhane	44,1	196,6	554
Protoxyde d'azote	71,0	36,5	457
Ammoniac	112,8	132,5	240
Eau	220,5	374,2	320

Tableau I. 4 Paramètres critiques de plusieurs corps purs (Luque de Castro et al. ,1994).

Le CO₂ est le fluide supercritique présentant les propriétés les plus satisfaisantes du point de vue coût, toxicité et énergie puisqu'il est peu coûteux et disponible à une pureté élevée, sa pression (73,8 bar) et sa température (31,1°C) critiques sont relativement faciles à atteindre, il est non inflammable et non-toxique (Rozzi et al. , 2002 ; Clifford, 1989 ; Wang et Waller, 2006).

Propriétés	Gaz (30°C et 1 bar)	CO ₂ supercritique (Tc et Pc)	Liquide (30°C et 1 bar)
Masse volumique ρ (kg/m ³)	1	468	600-1600
Diffusivité D (m ² /s)	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	5.10 ⁻¹⁰
Viscosité η (kg/m s)	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷

Tableau I. 5 Propriétés physiques pour les gaz, le CO₂ supercritique et les liquides (Luque de Castro et al. ,1994).

IV. 2.4. Applications des technologies supercritiques

Depuis une trentaine d'années les fluides supercritiques ont été utilisés en tant que solvants dans divers procédés : la micronisation à haute pression, la chromatographie (Hodulin et al. ,2003 ; Ramirez et al. ,2005) ainsi que pour des réactions chimiques et biochimiques (Hodulin et al. ,2003 ; Hadolin et al. ,2004) Et de nos jours le monde industriel et pharmaceutique s'appuie sur la vaste gamme de technologies innovantes d'extraction par fluides supercritiques comme la meilleure alternative à l'usage de solvants organiques.

Parmi les exemples d'applications dans l'industrie, on peut citer l'extraction de la caféine des grains de café (Zosel,1972 ; Katz et al. ,1988 ; Moorman et al. ,1989) et dans le domaine pharmaceutique , l'extraction de la nicotine (Fisher et Jefferies,1996 ; Fantozzi et al. ,1993) , de la digoxine (Moore et Taylor, 1997), du paclitaxel (Moon-Kyoon et al. ,1996 ; Vandana et al. ,1996), de la coronaridine et de la voacangine (Pereira et al. ,2004) , de l'artémisinine (Kohler et al. ,1997) , de l'acétate d'aurentiamide (Peng et al. ,2005) , de la vinblastine (Choi et al. ,2002) , du parthénolide (Smith et Burford, 1992) , de la cocaïne (Brachet,2000), de la tagitinine C (Ziemons et al. , 2005), des pyréthrinés (Pan et al. ,1995) ; dans le domaine agroalimentaire pour l'extraction de colorants naturels (Mira et al. ,1996 ; Franca et al. , 1999), d'antioxydants (Turner et al. , 2001 ; De Lucas et al. ,2002) , d'acides gras polyinsaturés (Fleck et al. ,1998 ; Létisse et al. ,2006) , pour la production de boissons sans alcool (Vollbrecht et al. ,1992 ; Gamse, 1999 ; Senorans et al. ,2001) , de denrées alimentaires délipidées (Mohamed et al. , 2000 ; Devineni et al. ,1997) , de bouchons en liège traités (Taylor et al. , 2000) ; et dans le domaine de la cosmétique (arômes et parfums) : extraction du jasmin, de la rose, de la vanille, du citron, de l'eucalyptus, du romarin, du thym...) (Mukhopadhyay et Sastry,1995 ; Moldao-Martins et al. ,2000 ; Perakis et al. ,2005 ; Senorans et al. ,2000).

IV. 2.5. L'extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique constitue le secteur d'application le plus ancien. L'EFSC prend de plus en plus d'importance par rapports aux techniques conventionnelles pour l'extraction de matrices solides.

Suite aux restrictions imposées par la directive Agence européenne des produits chimiques (REACH) , visant à assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement contre les risques que peuvent poser les produits chimiques, a permis de minimiser voir interdire l'utilisation des solvants organiques pour le traitement des matières végétales.

Szentmihalyi et al. ,1998 ont extrait des fractions des graines de *Silybum marianum*, qui fait l'objet de cette étude, avec le CO₂ supercritique et avec le propane à des températures de 25 à 55°C et des pressions de 80 à 400 bar.

IV. 2.5.1. Choix du CO₂ supercritique

Ce choix s'est fait en se basant sur les avantages offerts par ce procédé d'extraction par rapport aux autres extractions (Tableau I.4) :

(1) Diffusivité élevée, viscosité faible (Rozzi et al. , 2002 ; Clifford, 1989 ; Wang et Waller, 2006), tension de surface faible (Rozzi et al. , 2002 ; Wang et Waller, 2006) ,

(2) procédé flexible (possibilité de contrôler le pouvoir solvant et donc la sélectivité du fluide supercritique en modifiant les conditions de température et de pression)

(3) Temps d'extraction supercritique 'faible'.

(4) Température critique relativement basse (31°C) (Clifford, 1989 ; Wang et Waller, 2006 ; Reverchon et De Marco, 2006) permettant d'éviter la thermodestruction éventuelle des composés, de minimiser les risques d'hydrolyse et d'isomérisation des produits (Rozzi et al. , 2002).

(5) Procédé non-toxique.

(6) CO₂ disponible. Procédés n'ayant pas d'impact négatif supplémentaire en tant que gaz à effet de serre (Ribeiro et al. ,2001).

L'inconvénient majeur est l'aspect économique, car ces procédés sont considérés comme plus coûteux en investissement que les procédés d'extraction traditionnels (Wang et Waller, 2006). Cette technologie exige une consommation d'énergie non-négligeable pour atteindre les pressions et les températures requises pendant les différentes étapes d'extraction (extraction, séparation et recyclage du solvant).

IV. 2.5.2. Principe

Le principe du procédé d'extraction, tel que schématisé sur la figure I.12, auquel est associé le diagramme (P-T) repose sur la bonne solubilité des matières à extraire dans le fluide supercritique (CO₂). Comme nous l'avons déjà souligné, l'extraction par CO₂ supercritique ou liquide comporte deux étapes, l'étape d'extraction proprement dite où l'on recherche une solubilité maximale du soluté dans le CO₂ et l'étape de séparation où au contraire cette solubilité doit être la plus faible possible afin de récupérer l'extrait dans sa totalité.

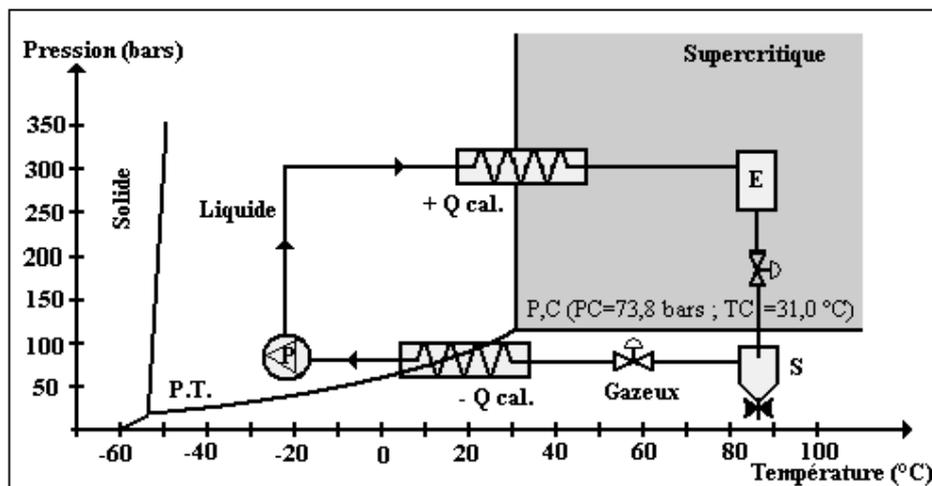


Figure I. 12 Schéma de principe de l'extraction par CO₂-SC associé au diagramme (P-T)
(Wang et Waller, 2006)

IV. 2.5.3. Traitement et influence des matrices solides

L'extraction supercritique à partir de matrices solides peut être menée en mode batch ou en mode semi-batch et les propriétés physico-chimiques de cette matrice jouent un rôle important dans le processus d'extraction en influençant la durée et le rendement d'extraction du ou des composé(s). On peut penser que le processus d'extraction d'un composé comporte plusieurs étapes (Figure I.13) :

- désorption (A → B) ;
- diffusion hors des pores (B → C) ;
- solubilisation dans le fluide supercritique (C → D)
- transport du composé (D → E).

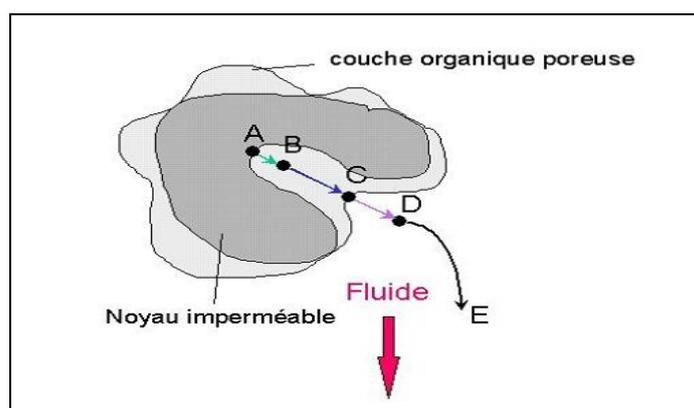


Figure I. 13 Représentation schématique du processus d'extraction de matrices solides par fluide supercritique (A → B : désorption du composé ; B → C : diffusion, C → D : solubilisation dans le fluide supercritique et D → E : transport) (Carvalho et al. ,2005).

La solubilité du composé dans le fluide supercritique (C → D) n'est donc pas une condition suffisante pour garantir l'efficacité de l'extraction à partir de matrices solides.

En général, le profil d'une extraction par fluide supercritique est un processus dynamique qui se divise en trois phases : solubilité du composé dans le fluide supercritique, diffusion du composé au sein de la matrice et désorption du composé (Lamaison et al. ,1991).

En mode batch, la matrice solide est disposée dans l'extracteur et le solvant supercritique est introduit jusqu'à ce que les conditions opératoires fixées soient atteintes.

Le contact entre la matière et le solvant est maintenu pendant un temps relativement long (plusieurs heures) ou court (dépendant des molécules et des produits à extraire) afin d'atteindre la composition à l'équilibre.

Cette phase est fortement influencée par l'affinité du soluté avec le matériel solide dans l'extracteur et pour réaliser une extraction efficace, il faut que la force motrice du procédé soit égale à la concentration à l'équilibre des solutés entre la phase solide et le fluide. Dans certaines expériences il est possible d'extraire plus d'un soluté, il faut dans ce cas éliminer l'influence et l'effet que peut avoir l'un des solutés sur l'autre.

Dans certains cas, il n'est pas possible d'extraire toute la quantité du soluté et l'extract ne fournit pas d'informations sur le contenu total de ce composé dans la matrice.

Le procédé en mode semi-batch est le plus largement utilisé et plus pratique surtout dans le cas des matrices végétales. La matière première est dans ce cas placée dans l'extracteur sous forme d'un lit fixe de particules. Le solvant supercritique est propulsé en continu par une pompe à haute pression et le débit est maintenu constant. Un ou plusieurs étages de séparation (nombre de séparateurs généralement de 1 à 3) peuvent être utilisés dans ce schéma afin de séparer les solutés du fluide supercritique. Les extracteurs peuvent atteindre des volumes de 10 à 200 cm³ et 500 L respectivement à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote (Reverchon, 1997) ; généralement la pression et la température du dernier séparateur doivent être maintenues afin de liquéfier le solvant gazeux dans le condenseur.

La séparation soluté-solvant peut être simple en une seule étape ou en plusieurs étapes, cette dernière est réalisée lorsque la masse volumique du solvant est élevée au moment de l'extraction. La réussite du procédé de récupération est basée sur le choix convenable des étapes de séparation. Par exemple, il est possible de séparer des composés d'un soluté par rapport à d'autres en modifiant la température ou la pression.

Le principe du procédé d'extraction en mode semi-batch suivie de la séparation soluté(s)-solvant par détentes multi-étagée avec recyclage du CO₂ est schématisé sur la figure I. 14.

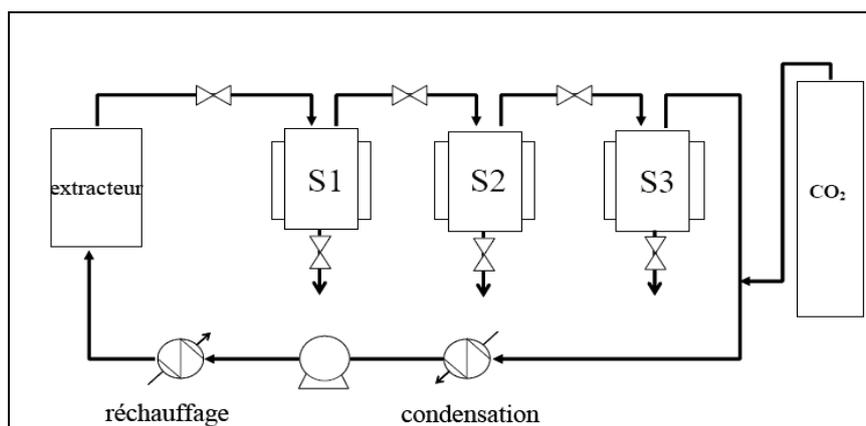


Figure I. 14 Représentation schématique d'un procédé semi-batch d'extraction supercritique avec détente multi-étagée et recyclage du solvant (Penchev, 2010)

La température et la pression sont les deux paramètres principaux qui permettent de changer le pouvoir solvant du fluide supercritique et par conséquent d'améliorer les résultats souhaités à savoir le rendement surtout dans le cas d'extraction de substances très précieuses comme les huiles essentielles et les antioxydants.

Et par conséquent, une augmentation de la pression influence positivement le pouvoir solvant du fluide par accroissement de sa densité alors qu'une augmentation de la température à pression élevée permet à la fois d'augmenter la tension de vapeur de la substance et de diminuer les interactions soluté-soluté.

Un autre facteur influant en plus du pouvoir solvant est la taille des particules de la matrice, il a été démontré qu'une augmentation de la surface de contact avec le fluide supercritique lors d'une réduction de la taille des particules se traduit par une forte accessibilité du composé à extraire (Penchev, 2010).

IV. 2.5.4. Aspects énergétiques du procédé d'extraction semi-batch

D'après Clifford (1989), l'enthalpie et de l'entropie des fluides supercritiques peut être présenté sur l'exemple de l'extraction au CO₂ supercritique avec recyclage. On suppose que les propriétés du fluide restent égales à celles du CO₂ pur dans tout le procédé. Le processus est schématisé sur la figure I.15.

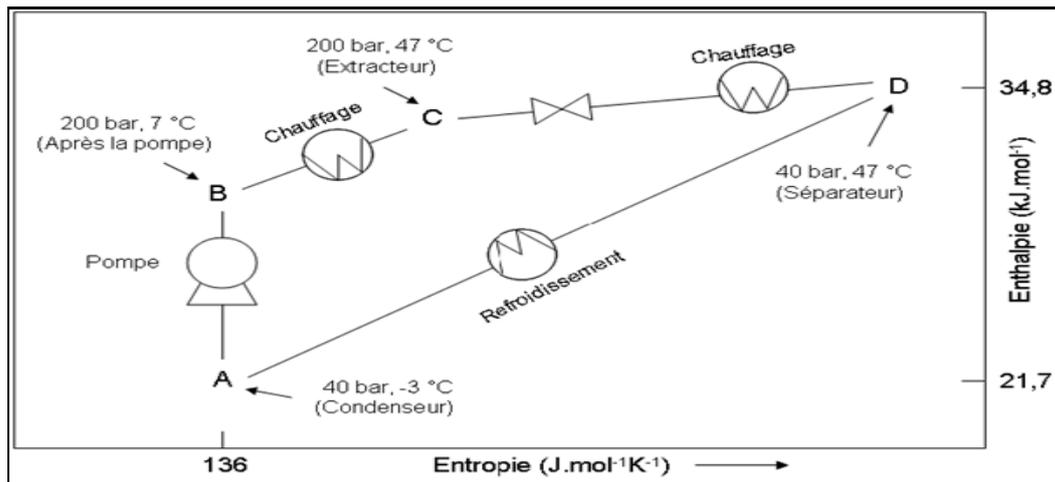


Figure I. 15 Diagramme schématisique du processus d'extraction supercritique (Clifford,1989)

Point A : CO₂ dans le condenseur à -3 °C et à 40 bar

Point B : CO₂ comprimé à 200 bar et réchauffé jusqu'à 47 °C

Point C : CO₂ dans l'extracteur

Point D : CO₂ est détendu à 40 bar dans le séparateur qui doit être chauffé pour que le CO₂ reste à l'état gazeux (la température reste ainsi égale à 47 °C)

Le CO₂ est ensuite refroidi puis renvoyé au point A pour être recyclé.

La compression d'un liquide est dans ce procédé adiabatique et réversible, entre le point A et le point B l'entropie du CO₂ reste pratiquement constante et égale à 136 J.mol⁻¹K⁻¹. En raison du travail de compression, la température du CO₂ augmente de 10 °C. Au point A, il y a une différence de 0,7 kJ.mol⁻¹ puisqu'à -3 °C et 40 bar, l'enthalpie est égale à 21,7 kJ.mol⁻¹ tandis qu'à 7 °C et 200 bar, elle est de 22,4 kJ.mol⁻¹. Cette différence correspond au travail nécessaire pour comprimer le CO₂ liquide de 40 à 200 bars.

Au point B, le CO₂ est à l'« état »supercritique suite à sa vaporisation qui nécessite 3,8 kJ.mol⁻¹ à l'échangeur de chaleur. L'étape suivante requiert l'apport énergétique sous forme d'énergie thermique (8,6 kJ.mol⁻¹) suite aux changements du fluide qui va passer de l'état liquide à l'état vapeur entre les points C et D.

Afin de revenir au point A il faut une perte d'énergie 13,1 kJ.mol⁻¹ de dans l'étape entre le point D et A se résumant à une condensation du CO₂ jusqu'à 40 bar. La quantité totale d'énergie retirée au niveau de cet échangeur doit être égale à l'énergie totale fournie au système pour la compression et le réchauffement entre les points A et D (Clifford, 1989).

IV. 2.6. Influence des paramètres d'extraction

IV. 2.6.1. Effet de la température et de la pression

Le choix des conditions opératoires dépend des spécificités du soluté ou d'une famille de composés à extraire. Il est nécessaire de toujours tenir compte de la masse molaire et de la polarité du constituant à extraire.

Certaines règles générales peuvent être appliquées, la première règle est que dans le cas d'extraction des composés thermolabiles, la température d'extraction qui doit être fixée entre 35 et 60°C (supérieure à la température critique du CO₂), l'augmentation de la température à pression constante réduit la masse volumique du CO₂-SC, ce qui conduit à une augmentation de la pression de vapeur des composés à extraire, par conséquent la tendance de ces composés de passer dans la phase fluide augmente.

Souvent, la capacité du solvant aux conditions opératoires données est décrite en fonction de la masse volumique du CO₂, qui dépend de la température et de la pression. Dans les conditions opératoires données, la masse volumique du CO₂ varie entre 150 et 1000 kg/m³ et dépend de la pression et de la température, aussi sa variation n'est pas linéaire (Luque de Castro et al., 1994).

A pression élevée, il peut y avoir l'extraction de composés indésirables et qui peut faire varier d'une manière considérable la solubilité du soluté recherché.

Langa et al., (2009) ainsi que Reverchon et al., (1992) ont étudié l'influence de la pression et de la température et ont montré que l'augmentation de la pression entraîne une augmentation du rendement de l'extraction, ce qui est dû à une augmentation de la masse volumique du solvant, cependant le même résultat n'est pas assuré lors d'une augmentation de la température à cause de l'influence soit de la masse volumique du solvant, soit de la pression de vapeur des composés à extraire.

IV. 2.6.2. Solubilité dans le CO₂ supercritique

La détermination de la solubilité du composé à extraire ou à séparer dans le solvant (la solubilité des composés non-désirés est aussi prise en considération) est une information fondamentale dans le domaine de l'extraction supercritique. Cette information est autant plus utile quand il s'agit de l'extraction de saveurs ou de fragrances (Reverchon, 1997).

Les matrices végétales contiennent beaucoup de composés lipophiles facilement extractibles avec du CO₂ supercritique. La connaissance de la solubilité de ces composés permet de sélectionner la pression et la température d'extraction surtout lorsqu'une séparation en plusieurs étapes est envisagée (Reverchon, 1996). Par exemple, le linalool, un terpène

oxygéné typique, est complètement miscible avec le CO₂ supercritique à haut pression (85 bar) quand la température est placée à 40°C (Reverchon et De Marco, 2006).

La solubilité est déterminée par diverses méthodes expérimentales : méthodes statique-analytique, statique-synthétique et dynamique. Dans le cas des méthodes statistiques, le composé est placé dans un volume fermé et les conditions d'équilibre sont obtenues en attendant un temps assez long. Dans le cas de la méthode dynamique, le solvant supercritique passe au travers du soluté.

Le temps de contact établi dans le système est suffisamment long pour que les conditions proches de l'équilibre soient obtenues.

IV. 2.6.3. Influence du co-solvant

Comme il a été mentionné précédemment, la polarité du CO₂ est intermédiaire entre celle d'un solvant non-polaire comme l'hexane et d'un solvant faiblement polaire (Hodulin et al. , 2003, King et Bott, 1993 ; Senorans et al. ,2000 ; Vaher et Koel, 2003). Le CO₂ est alors très bon solvant pour des molécules apolaires mais un mauvais solvant pour des molécules polaires.

L'augmentation de la solubilité engendrée par les co-solvants permet de baisser la pression d'extraction ceci peut être intéressant dans le calcul du bilan énergétique du procédé. La sélectivité induite par l'ajout d'un co-solvant polaire peut être due à des interactions spécifiques avec le soluté. L'addition d'un tiers corps polaire permet d'augmenter la polarité du CO₂, et donc d'augmenter la solubilité des composés polaires. Le résultat est une amélioration de l'affinité et du pouvoir solvant par rapport aux molécules polaires.

L'addition d'un co-solvant conduit à la perturbation de l'environnement qui entoure la molécule ce qui permet d'augmenter la densité locale autour de cette molécule. Cette amélioration est également expliquée par l'existence d'interaction attractive dipôle-dipôle ou par formation d'interactions spécifiques soluté-solvant et co-solvant de type liaison hydrogène ou complexe à transfert de charge (Señoráns et al. ,2000).

L'étape qui suit directement l'extraction utilisant un co-solvant est l'élimination de ce co-solvant (évaporation) ceci complique la mise en œuvre d'un procédé de fractionnement d'où leur utilisation rare voir inexistante dans l'industrie alimentaire, à l'exception de l'eau qui est faiblement soluble dans le CO₂ supercritique, mais dont le rôle paraît déterminant lors de l'extraction de produits végétaux (Esquivel et al. ,1999) comme l'extraction de la silymarine des graines de *Silybum marianum* (Skerget et al. ,2003).

IV. 2.6.4. Influence du temps sur la composition des extraits

La durée d'extraction dépend généralement des composés que l'on souhaite extraire et donc de leurs propriétés physico-chimiques par exemple l'extraction de monoterpènes présents dans les feuilles de menthe réalisées par Ozer et al. , (1992) a eu lieu au début de l'expérience alors que celle des composés lourds est prévue à la fin de l'extraction.

D'après les résultats obtenus par Kerrola et al. , (1994) l'extraction des monoterpènes des racines de l'angélique à 120 bar et 50°C a donné des pourcentages différents selon le temps d'extraction à savoir 83% au début de l'extraction, 55% au milieu de temps d'extraction et 14% à la fin de l'extraction. Les produits lourds (34 % de coumarines et psoralènes et 43 % d'acides gras et autres composés lourds) sont aussi présents dans l'extrait obtenu à la fin de l'expérience.

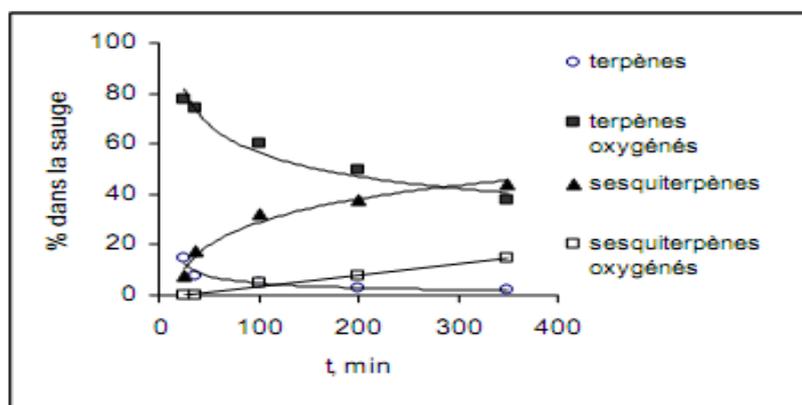


Figure I. 16 Variation de la composition de la sauge en fonction du temps d'extraction (P=120 bar, T=50°C) (Reverchon et al. ,1995).

Les travaux de Reverchon et al. , (1995) ont permis d'étudier la composition de l'huile essentielle des feuilles de sauge en fonction du temps à 90 bar et à 50°C ; ces feuilles sont séchées à l'air libre et à l'ombre, la teneur en eau est de 9,6% de matière sèche avec un diamètre moyen de particules égale à 0,25mm (figure I.16). Les résultats obtenus permettent de conclure qu'il existe une large variation de la composition en fonction du temps expliqué par la différence du temps de diffusion des différents composés à l'intérieur de la matière végétale.

IV. 2.6.5. Influence du débit de solvant

Un autre facteur ayant une grande influence sur l'efficacité de l'extraction est le débit du solvant d'extraction qui est en effet la vitesse de pénétration du fluide à travers l'extracteur ; si la vitesse est lente, le solvant pénètre en profondeur la matrice solide. La vitesse du fluide (vitesse linéaire) dépend fortement du débit et de la taille de l'extracteur.

Papamichail et al. , (2000) ont observé une augmentation de la quantité extraite en fonction du temps lors d'une augmentation du débit lors de l'extraction des grains de céleri. A faible débit, la quantité extraite par kilogramme de CO₂ est plus grande, ceci est à cause de la résistance de diffusion intra-particulaire.

Kerrola (1994) & Reverchon et Sesti Osseo (1994) ont conclu que le débit du solvant peut contrôler le procédé d'extraction si les conditions d'équilibres sont atteintes ou si le mécanisme du transfert externe est dominant durant le procédé d'extraction. Par contre dans le cas où le transfert interne contrôle le procédé, l'influence du débit est négligeable comme le montre la figure I.17 où deux débits différents produisent pratiquement la même vitesse d'extraction de l'huile essentielle de sauge (Reverchon et Marrone ,2001).

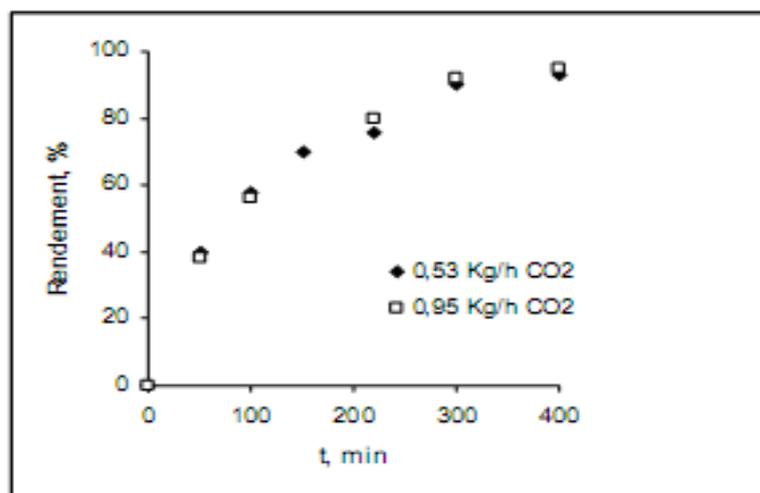


Figure I. 17 Influence du débit de CO₂ sur le rendement d'extraction de la sauge (Reverchon, 1996)

IV. 2.6.6. Influence de la taille des particules de la matrice solide

En général, une augmentation du rendement de l'extraction est liée à la dimension des particules de la matrice solide. En effet, la réduction de la taille des particules engendre une augmentation de la surface d'échange et conduit à une augmentation de la masse d'extrait.

Reverchon et De Marco (2006) ont pu évaluer un diamètre optimal (0,25 et 2,0 mm) choisi en prenant en considération la quantité d'eau présente dans le solide et la quantité de composé liquide extrait qui peut produire le phénomène d'agglomération. Par contre différents travaux (Ozer, 1992 ; Reverchon et Marrone, 2001 ; Reverchon et De Marco ,2006) ont montré que l'utilisation de très fines particules conduit à la formation de canaux à l'intérieur de la cellule végétale.

Références

- Abrol S., Trehan A., Katare O.P. Comparative study of different silymarin formulations: formulation, characterisation and in vitro/in vivo evaluation. (2005) *Curr. Drug Deliv*, 2, 45–51.
- Agarwal R., Katiyar S K., Lundgren DW., Mukhtar H. Inhibitory effect of silymarin, an anti-hepatotoxic flavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice. (1994)*Carcinogenesis*, 15, 1099–1103.
- Agarwal C., Singh RP., Dhanalakshmi S., Tyagi AK., Tecklenburg M., Sclafani RA., Agarwal R. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. (2003) *Oncogene*, 22, 8271–8282.
- Ahmad N., Gali H., Javed S., Agarwal R., Skin cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin are mediated via impairment of receptor tyrosine kinase signaling and perturbation in cell cycle progression.(1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 247, 294–301.
- American Cancer Society. (2005). *Cancer Facts and Figures*, 1–60.
- Amrani O., Valeur nutritive du chardon marie (*Silybum marianum*(1) Gaerthn) "Tawra". (2006) *Magister de la faculté des sciences de L'Algérie Batna*.
- Arrigo Y., Scharenberg A. *Les plantes riches en tanins dans l'affouragement des ruminants*. (2006). Journée d'information ALP.
- Berger M M., Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances.(2006) *Nutrition clinique et métabolisme*. 20, 48–53
- Bhatia N., Agarwal R., Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistein and epigallocatechin 3-gallate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells. (2001) *Prostate*, 46, 98–107.
- Bhatia N., Zhao J., Wolf, D M., Agarwal R. Inhibition of human carcinoma cell growth and DNA synthesis by silibinin, an active constituent of milk thistle: comparison with silymarin.(1999). *Cancer Lett*. 147, p 77–84.
- Bocevska M., Sovova H., Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow. (2007) *J. of Supercritical Fluids*, 40, 360–367.

- Bokemeyer C., Fels LM., Dunn T., Voigt W., Gaedeke J., Schmoll HJ., Stolte H., Lentzen H., Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. (1996) *J. Cancer* 74, 2036–2041.
- Bonnier G., *La Grande Flore en couleurs*. Edition Belin Paris. 4 ; 1990, 582-589
- Brachet A., Christen Ph., Gauvrit J-Y., Longerey R., Lantéri P., Veuthey J-L., Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves. (2000). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 43, 353-366
- Brown D., Silymarin education monograph. (1993) *Herbal Res Update*, 23-36
- Bruneton., Sources alimentaires des flavonoides. (1999) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3^{ème} édition)*. Editions Tec and Doc Lavoisier, 1120.
- Burnie. G. *Encyclopédie de botanique et de l'horticulture*. Plus de 10.000 plantes du monde entier. Ed Random house Australia ptyltd, 1997; 843.
- Caniova A., Brandsteterova E., HPLC Analysis of Phenolic Acids in Melissa Officinalis. (2001) *J. Liq. Chrom. & Rel Technol*, 24 (17) 2647 – 2659
- Carnat AP. , Carnat A. , Fraisse D. , Ricoux L. , Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (Melissa officinalis L. subsp. Officinalis) tea.(1998) *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72 (5), 301-305.
- Carvalho Jr R N., Moura LS., Rosa PTV., Meireles M AA. Supercritical fluid extraction from rosemary (Rosmarinus officinalis): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. (2005) *J. of Supercritical Fluids*, 35, 197–204.
- Chen PN., Hsieh YS., Chiou HL., Chu SC. Silibinin inhibits cell invasion through inactivation of both PI3K-Akt and MAPK signaling pathways. (2005) *Chem.-Biol. Interact.* 156, 141–150
- Chlopcikova S., Psotova J., Miketova P., Simanek V. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes: Part I. Silymarin and its flavonolignans. (2004) *Phytother. Res.* 18, 107–110
- Choi Y.H., Yoo K.P., Kim J., Supercritical extraction and liquid Chromatography electrospray mass analysis of vinblastine from Catharanthus roseus. (2002) *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50 (9), 1294-1296.
- Chu SC., Chiou HL. , Chen PN., Yang SF., Hsieh YS. Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. Mol. (2004) *Carcinog*, 40, 143–149.
- Clifford T., Fundamentals of Supercritical Fluids. (1989) *Oxford University Press, New York*
- Curtay JP., Robin J M., (2000) *Intérêt des complexes antioxydants*.

- Cuvelier C., Cabaraux J-F., Dufrasne I., Hornick JL., Istasse L. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. (2004) *Ann. Méd. Vét*, 148, 133-140
- Dastmalchi K., Damien Dorman HJ., Oinonen PP., Darwis Y., Laakso I., Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. (2008) *LWT*, 41, 391 – 400.
- Dehmlow C., Erhard J., de Groot H., Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. (1996) *Hepatology* 23, 749–754.
- De Lucas A., de la Ossa E.M., Rincon J., Blanco M.A., Gracia I., Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. (2002) *Journal of Supercritical Fluids* 22, 221-228.
- Devineni N. , Mallikarjunan P. , Chinnan M.S. , Phillips R.D. , Supercritical fluid extraction of lipids from deep-fried food products. (1997) *Journal of the American Oil Chemists Society* 74 (12), 1517-1523.
- El-Mallah MH., Safinaz M., El-Shami M., Hassanein M. Detailed studies on some lipids of *Silybum marianum* (L.) seed oil. (2003) *Grasas y Aceites*. 54. Fasc4, 397-402.
- El-Samalgly MS., Afifi NN., Mahmoud EA. Evaluation of hybrid liposomes encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance. (2006) *Int. J. Pharm.* 319, 121–129.
- Esquivel MM., Bernardo-Gil MG., King MB. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. (1999) *The Journal of Supercritical Fluids*, Volume 16, Issue 1, 43–58.
- Fantozzi P., Rossi M., Schiraldi A., Montanari L., Removal of nicotine from tobacco leaf protein by supercritical CO₂. (1993) *Italian Journal of Food Science* 5 (4), 333-339.
- Fischer M. , Jefferies T.M. , Optimization of nicotine extraction from tobacco using supercritical fluid technology with dynamic extraction modelling. (1996) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (5), 1258-1264.
- Fleck U., Tiegs C., Brunner G., Fractionation of fatty acid ethyl esters by supercritical CO₂: high separation efficiency using an automated countercurrent column. (1998) *Journal of Supercritical Fluids* 14, 67-74.
- Follegatti-Romeroa LA., Piantinoa C R., Grimaldi R., Fernando A. Cabral Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds.(2009) *Journal of Supercritical Fluids*, 49, 323–329
- Foster S. Milk thistle: *Silybum marianum*.(1990) *Austin (TX): American Botanical Council*.

- França L.F., Reber G., Meireles M.A., Machado N.T., Brunner G., Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. (1999) *Journal of Supercritical Fluids* 14, 247-256.
- Gallo D., Giacomelli S., Ferlini C., Raspaglio G., Apollonio P., Prislei S., Riva A., Morazzoni P., Bombardelli E., Scambia G. Antitumour activity of the silybin phosphatidylcholine complex, IdB 1016, against human ovarian cancer. (2003) *Eur. J. Cancer*, 39, 2403–2410.
- Gamse T., Rogler I., Marr R., Supercritical CO₂ extraction for utilisation of excess wine of poor quality. (1999) *Journal of Supercritical Fluids* 14, 123-128.
- Gershbein LL., Action of dietary trypsin, pressed coffee oil, silymarin and iron salt on 1,2-dimethylhydrazine tumorigenesis by gavage. (1994) *Anticancer Res.* 14, 1113–1116.
- Giacomelli S., Gallo D., Apollonio P., Ferlini C., Distefano M., Morazzoni P., Riva A., Bombardelli E., Mancuso S., Scambia G. Silybin and its bioavailable phospholipid complex (IdB 1016) potentiate in vitro and in vivo the activity of cisplatin. (2002) *Life Sci*, 70, 1447–1459.
- Grigonis D., Venskutonis PR., Sivik B., Sandahl M., Eskilsson CS. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). (2005) *Journal of Supercritical Fluids*, 33 (3) 223-233.
- Guittoneau G., Huon A. *Connaître et reconnaître la flore et la végétation méditerranéenn.* Ed Ouest France. (1983), 331.
- Hadi M., La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. (2004) Thèse en Pharmacochimie.
- Hadolin M., Hras AR., Davorin B., Knez Z. Isolation and concentration of natural antioxidants with high-pressure extraction. (2004) *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5 (2) 245-248.
- Hadolin M., Mojca S., Zeljko K., Davorin B. High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum*. (2001) *Food Chemistry*, 74 355–364 Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section
- Hadolin M., Hras A. R., Davorin B., Zeljko K. Isolation and concentration of natural antioxidants with high-pressure extraction, (2004), *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5 (2) 245-248.
- Halliwel B., Antioxidant characterization methodology and mechanism. (1995) *Biochemical Pharmacology*, 49, 10, 1341-1348.

- Hamd R., Alireza A., Aliakbar G., Feridun E. Investigation on the Effect of different Supercritical Fluid Extraction Process on the Activation of the R-134 Catalyst (2012) *J. of Supercritical Fluids*
- Herodez SS., Hadolinb M., Skergeta M., Zeljko K. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, (2003) *Food Chemistry*, 80, 275 – 282.
- Hodulin M., Knez Z., Bauman D. Concentration of Rosmarinic Acid with Supercritical Fluids, (2003), *Kem. Ind.* 52 (9) 427 – 432.
- Ibanez E., Oca A., De Murga G., Lopez-Sebastian S., Tabera J., Reglero G., Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. (1999) . *Agric. Food Chem. J.* 47, 1400-1404.
- Janicsak G., Mathe I., Vilmos MV., Blunden G. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Limiaceae species. (1999) *Biochemical Systematics and Ecology*, 27 733 -738.
- Janicsak G. , Mathe I. , Parallel Determination of Rosmarinic and Caffeic Acids by TLC-densitometry. (1997) *Chromatographia*, 46, 322 – 324.
- Jiang C., Agarwa R., Lu J. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochem. (2000). Biophys. Res. Commun.* 276, 371–378.
- Jozef P H., Linssen G M., Kielmen JL., Cozijnsen. Walter P. Comparison of Chufa and Olive Oils. (1988) *Food Chemistry*. 28, 279-285
- Julve P., 1998, Baseflor : index botanique, écologique et chorologique de la flore de France (version 8, septembre 2003).
- Kang JS., Park SK., Yang KH., Kim HM. Silymarin inhibits TNF α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. (2003) *FEBS Lett.* 550, 89–93
- Karkanis A., Dimitrios B., Eftimiadou A. Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. (2011) *Industrial Crops and Products*, Volume 34, Issue 1, 825–830.
- Karimi G., Ramezani M., Tahoonian Z. Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. (2005) *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2, 383–386.
- Katz S. , Spence J. , O'Brien M. , Skiff R. , Vogel G. , Prasad R. , Method for decaffeinating coffee with a supercritical fluid. (1988) *US patent* 4.911.941.

- Kerrola K., Galambosi B., Kallio H. Characterization of volatile composition and odour of angelica root extracts, *Agric. (1994) Food Chem. J*, 42, 1979.
- Kidd P., Head K. A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos). (2005) *Altern Med Rev.* 10, 193–203.
- King MB., Bott T R. Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents, (1993). *Chapman & Hall*.
- Kittur S., Wilasrusmee S., Pedersen WA., Straube-West MP., Wilasrusmee K., Lubelt C., Kittur B. Neurotrophic and neuroprotective effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on neurons in culture. (2002) *J. Mol. Neurosci.* 18, 265–269.
- Kohler M., Haerdi W., Christen Ph., Veuthey J-L., Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. (1997) *Journal of Chromatography A* 785, 353-360.
- Kohno H., Tanaka T., Kawabata K., Hirose Y., Sugie S., Tsuda H., Mori H. Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane induced colon carcinogenesis in male F344 rats. (2002) *Int. J. Cancer* 101, 461–468.
- Krecman V., Skottova N., Walterova D., Ulrichova J., Simanek, V. Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. (1998) *Planta Med.* 64, 138–142.
- Lahiri-Chatterjee M., Katiyar SK., Mohan RR., Agarwal R. A flavonoid antioxidant, silymarin, affords exceptionally high protection against tumor promotion in the SENCAR mouse skin tumorigenesis model. (1999). *Cancer Res.* 59, 622–632.
- Lamaison J.L., Petitjean-Freytet C., Duband F., Carnat A.P. Rosmarinic Acid Content and Antioxidant Activity in French Lamiaceae (1991), *Fitoterapia*, 62 (2) 166 – 171
- Langa E., Della porta G., Palavra JS., Urieta A., Mainar M. Supercritical fluid extraction of spanish sage essential oil: optimization of the process parameters and modelling, (2009) *J. Supercrit. Fluids*, 49, 174-181.
- Létisse M., Rozières M., Hiol A., Sergent M., Comeau L., Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without modifier: I. Optimization of extractions conditions. *Journal of Supercritical Fluids* 38 (1), (2006) pp. 27-36.
- Li F., Liuqing Y., Ting Z., Jiangli Z., Yanmin Zou., Ye Z., Xiangyang W. Optimization of enzymatic pretreatment for n-hexane extraction of oil from *Silybum marianum* seeds using response surface methodology (2011) *Food and bioproducts processing*, 90, 87–94.

- Liu AH, Li L. , Xu MLin. , Y.-H. , Guo H. -Z., Guo D. -A. Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method. (2006) *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 48 – 56.
- Luque de Castro M.D., Garcia-Ayuso L.E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. (1998) *Analytica Chimica Acta*, 369, 1-10
- Luque de Castro M.D., Valcarcel M., Tena M.T., in *Analytical supercritical fluid extraction*. Springer laboratory, Berlin, p 321 (1994).
- Luper. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. (1998) *Alternative Medicine Review*, 3, 410–421.
- Malewicz B., Wang Z., Jiang C., Guo J., Cleary M.P., Grande J.P., Lu, J. Enhancement of mammary carcinogenesis in two rodent models by silymarin dietary supplements. (2006) *Carcinogenesis*, 27, 1739–1747.
- Marfak A., (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES.187
- Martinez F. La chromatographie de fluides en conditions supercritiques : une méthode potentiellement utile pour l'analyse des flavonolignanes.(1989). *Ann.pharmaceutiques francaises*, 47, 162- 168
- Mei S., Feral T. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. (2006) *J. of Supercritical Fluids*, 37, 397–408
- Meschy F., Guenguen L. *Ingestion et absorption des éléments minéraux majeurs:nutrition des ruminants domestiques ; ingestion et digestion*. (1995). Ed. INRA, 721-758
- Messegue M. *Mon herbier de santé. Les plantes qui guérissent*. Ed Robert Laffont, Paris, 1975 ; 334
- Mette M. Berger Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. (2006) *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 48–53
- Milpied-Homsi B. Pathologie allergique de la muqueuse buccale. (2004). *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. 44 ,76–78.
- Mira B., Blasco M., Subirats S., Supercritical CO₂ extraction of essential oils from orange peel. *Journal of Supercritical Fluids* 9, 238-243 (1996).

- Mohamed R. S. , Saldana M.D. A., Socantaype F.H., Kieckbusch T.G., Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina. *Journal of Supercritical Fluids* 16 (3), 225-233 (2000).
- Moldao-Martins M., Palavra A., Beiro da Costa M.L., Bernardo-Gil M.G., Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma. (2000) *Journal of Supercritical Fluids* 18, 25-34.
- Moon-Kyoon C., Hye-Won S., Huen L., Supercritical fluid extraction of paclitaxel and baccatin II from needles of *Taxus cuspidate*. (1996) *Journal of Supercritical Fluids* 9, 192-198.
- Moore W.N., Taylor L.T., Gaining greater selectivity in the supercritical fluid extraction of digoxin from *Digitalis lanata* leaves. *Phytochemical Analysis* 8 (5), 238-243 (1997).
- Moorman C. , Sabadies J. , Royal T. , Apparatus for fluid-solid bed processing. US Patent 4.951.561 (1989).
- Morazzoni P., Bombardelli E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). (1995) *Fitoterapia*, 66, 3-42.
- Morazzoni P., Montalbetti A., Malandrino S., Pifferi G. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. (1993) *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 18, 289-97.
- Mukhopadhyay M., Sastry S.V.G.K., Process for Cyclic supercritical fluid CO₂ extraction of fragrances (absolute or essential oils) from jasmine flowers. (1995) *Indian Patent* 183454 (72/BOM/96).
- Nencini C., Giorgi G., Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. (2006) *Phytomedicine*. 2, 1-40.
- Ozer E. , Platin S., Akman U., Ortascu O., Goto M. (1992) *Turkish J. Chem.* , 16, 273.
- Papamichail I., Louli V., Magoulas KJ. Supercritical fluid extraction of Celery seed oil. (2000). *Journal of Supercritical Fluids*, 18, 213.
- Pares A., Planas R., Torres M., Caballeria J., Viver J.M., Acero D., Panes J., Rigau J., Santos J., Rodes J. Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial. (1998). *J. Hepatol.* 28, 615-621.
- Pan W.H.T., Chang C.C., Su T.T., Lee F., Fuh M.R.S., Preparative supercritical fluid extraction of pyrethrin I and II from pyrethrum flower. (1995) *Talanta* 42 (11), 1745-1749.

- Penchev P. Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basse et haute pressions. Thèse en génie des procédés et de l'environnement. Université de Toulouse (2010).
- Peng J., Fan G., Wu Y., Supercritical fluid extraction of aurenthamide acetate from *Patrinia villosa* Juss and subsequent isolation by silica gel and high-speed countercurrent chromatography. (2005) *Journal of Chromatography A* 1083, 52-57.
- Peng Y., Wu P., A two dimensional infrared correlation spectroscopic study on the structure changes of PVDF during the melting process. (2004), *Polymer* 45, 5295-5299.
- Perakis C., Louli V., Magoulas K., Supercritical fluid extraction of black pepper oil. (2005) *Journal of Food Engineering* 71, 386-393.
- Pereira C.G., Marques M.O., Barreto A.S., Siani A.C., Fernandes E.C., Meireles M.A., Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. (2004) *Journal of Supercritical Fluids* 30, 51-61.
- Ramírez P., Fornari T., Señoráns F. J., Ibañez E., Reglero G. Isolation of phenolic antioxidant compounds by SFC. (2005) *Journal of Supercritical Fluids*, 35 (2), 128-132.
- Reighard TS. , Olesik SV. Bridging the Gap Between Supercritical Fluid Extraction and Liquid Extraction Techniques: Alternative Approaches of the Extraction of Solid and Liquid Environmental Matrices. (2006) *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 26 1-39.
- Reverchon, E., Mathematical modelling of supercritical extraction of sage oil. (1996) *AIChE J*, 42, 1765.
- Reverchon E. De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. (2006) *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 146 – 166.
- Reverchon E., Senatore F. Isolation of Rosemary Oil: Comparison between Hydrodistillation and Supercritical CO₂ Extraction. (1992) *Flavour. Fragr. J*, 7, 227-230.
- Reverchon E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. (1997). *Journal of Supercritical Fluids*, 10, 1-37.
- Reverchon E. , Sesti Osseo L. Modelling the supercritical extraction of basil oil, (1994) *Proceeding of the Third Symposium on Supercritical Fluid*, 2, 189.
- Reverchon E., Marrone C. Modelling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. (2001) *Journal of Supercritical Fluids*, 161-175.
- Ribeiro MA., Bernardo-Gil M.G., Esquivel M.M. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. (2001) *Journal of Supercritical Fluids*, 21, 51 –60.

- Rodzko V. *Abécédaire de phytothérapie*, 1999-2000
- Rolo AP. , Oliveira PJ., Moreno AJ., Palmeira CM. Protection against post-ischemic mitochondrial injury in rat liver by silymarin or TUDC. (2003) *Hepatol. Res.* 26,217–224.
- Rozzi NL. , Phippen W., Simon JE., Singh RK. Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil. (2002) *Components from Lemon-Scented Botanicals, Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 35, 319–324.
- Saller R. *Phytothérapie*. 1995 Haug, Heidelberg, 267-274
- Scambia G., De Vincenzo R., Ranelletti F.O., Panici P.B., Ferrandina G., D'Agostino G., Fattorossi A., Bombardelli E., Mancuso S. Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin. (1996) *Eur. J. Cancer* 32A, 877–882.
- Schumann J., Prockl J., Kiemer AK., Vollmar AM., Bang R., Tiegs G. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. 2003 *J. Hepatol.* 39, 333–340.
- Señoráns F.J., Ibañez E., Cavero S., Tabera J., Reglero G. Liquid chromatographic– mass spectrometric analysis of supercritical- fluid extracts of rosemary plants, (2000) *Journal of Chromatography A*, 870 491 – 499.
- Senorans F. J. , Ruiz-Rodriguez A. , Ibanez E. , Tabera J. , Guillermo R. , Optimization of countercurrent supercritical fluid extraction conditions for spirits fractionation. (2001) *Journal of Supercritical Fluids* 21, 41-49.
- Sevha G. *Comprehensive Analytical Chemistry: Analytical Infrared Spectroscopy*, (1976) *Elsevier, Amsterdam*, 555
- Sindel BM. A review of the ecology and control of thistles in Australia. (1991) *Weed Research*, 31, 189-201
- Singh RP., Tyagi AK., Zhao J., Agarwal R. Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis. (2002) *Carcinogenesis* 23, 499–510
- Singh RP., Mallikarjuna GU., Sharma G., Dhanalakshmi S., Tyagi AK., Chan DC., Agarwal C., Agarwal R. Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance. (2004) *Cancer Res*, 10,8641–8647.
- Skerget M., Kotnik P., Zeljko . Phase equilibria in systems containing α -tocopherol and dense gas. (2003) *J. of Supercritical Fluids*, 26, 181-191

- Sharma G., Singh RP., Chan DC., Agarwal R. Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells. (2003). *Anticancer Res.* 23, 2649–2655.
- Smith R.M., Burford M.D., Supercritical fluid extraction and gas chromatographic determination of the sesquiterpene lactone parthenolide in the medicinal herb feverfew (*Tanacetum parthenium*). (1992) *Journal of Chromatography A* 627, 255-261.
- Song Z., Deaciuc I., Song M., Lee D.Y., Liu Y., Ji X., McClain C. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. (2006). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30,p 407–413.
- Soto C., Mena R., Luna J., Cerbon M., Larrieta E., Vital P., Uria E., Sanchez M., Recoba R., Barron H., Favari L., Lara A. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. (2004) *Life Sci.* 75, 2167–2180.
- Sterbova D. , Matejcek D. , Vlcek J. , Kubán V. Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant material. (2004) *Analytica Chimica Acta*, 513, 435 – 444
- Subramaniam S., Vaughn K., Carrier D., Clausen EC., Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: An alternative to petroleum ether defatting. (2008) *Bioresour. Technol*, 99,2502.
- Svobodova A., Walterova D., Psotova J. *Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts*, (2006) *Burns* 32, 973–979
- Szentmihályi K., Then M., Illés V., Pernecky S., Sándor Z., Lakatos B., Vinkler P. Phytochemical examination of oils obtained from the fruit of milk thistle (*Silybum marianum* L.Gaertner) by supercritical fluid extraction. (1998)*Zeitschrift für naturforschung. Journal of biosciences*, 53 : 779-784
- Taylor M. K., Young T. M., Christian E. Butzke C.E., Ebeler S.E. Supercritical fluid extraction of 2, 4, 6-trichloroanisole from cork stoppers. (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6), 2208-2211.
- Tena MT., Valcarcel M. Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary: Comparison with Liquid Solvent Sonication.(1997) *Anal. Chem*, 69, 521-526.
- Tessier F., Marconnet P. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. (1995) *Science & Sports*.10,1-13.

- Thelen P., Jarry H., Ringert RH., Wuttke W. Silibinin down-regulates prostate epithelium-derived Ets transcription factor in LNCaP prostate cancer cells. (2004) *Planta Med*, 70, 397–400.
- Toth J., Mrlinova M., Tekelova D., Korenova M. Rosmarinic acid an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa Offcinalis* L.), (2003)*Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 50, 139-146.
- Toutou Y. (2006) Biochimie : structure des glucides et lipides Université Pierre et Marie Curie PAES 33
- Toutain PL., Bousquet-Melou A. La biodisponibilité et son évaluation. (2008),1-38
- Trappoliere M., Federico A., Tuccillo C., De Sio I., Di Leva A., Niosi M., D'Auria M., Loguercio C. Effects of a new pharmacological complex (silybin+vitamin-E+phospholipids) on some markers of the metabolic syndrome and of liver fibrosis in patients with hepatic steatosis. Preliminary study. (2005) *Minerva Gastroenterol. Dietol*, 1, 193–199.
- Turner C., King J.W., Mathiasson L., Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. (2001)*Journal of Chromatography* 936, 215-237.
- Tyagi AK., Agarwal C., Chan DC., Agarwal R. Synergistic anticancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDAMB468 cells. (2004) *Oncol. Rep.* 11, 493–499.
- Vaher M., Koel M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis, (2003) *Journal of Chromatography A*, 990 (2) 225-230.
- Vandana V., Teja A.S., Zalkow L.H., Supercritical extraction and HPLC analysis of taxol from *Taxus brevifolia* using nitrous oxide and nitrous oxide + ethanol mixtures. (1996) *Fluid Phase Equilibria* 116, 162-169.
- Varghese L., Agarwal C., Tyagi A., Singh RP. , Agarwal R. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11,8441–8448.
- Vinh PQ., Sugie S., Tanaka T., Hara A., Yamada Y., Katayama M., Deguchi T., Mori H., Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. (2002) *Jpn. J. Cancer Res.* 93, p42–49.
- Vogel G. Silymarin, antihepatotoxic principle form *Silybum marianum* L. as antagonist of the effect of phalloidine. (1968) *Arzneim.Forsch.*18:1063-1064

- Volate SR., Davenport DM. , Muga SJ., Wargovich MJ. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). (2005) *Carcinogenesis* 26, 1450–1456.
- Vollbrecht H.R., Schuetz R., Faust, R., Zobel R., Process for removal of ethanol from drinks produced by fermentation utilizing extraction with compressed carbon dioxide and carbon dioxide regeneration. (1992) *German Patent* 3843908.
- Wang H., Provan GJ., Helliwell K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, (2004)*Food Chemistry*, 87, 307 – 311.
- Wang L., Waller C L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. (2006) *Trends in Food Science & Technology*, 17 300 – 312.
- Widmer N., *Cardui mariae fructus dosage des flavonolignanes*, (1999)
- Wilasrusmee C., Kittur S., Shah G., Siddiqui J., Bruch D., Wilasrusmee S., Kittur DS., Immunostimulatory effect of Silybum marianum (milk thistle) extract. (2002) *Med. Sci. Monit.* 8, 439–443.
- www.plants.usda.gov
- www.alchemy-works.com
- www.discoverlife.org
- www.themediteckwellnessgateway.com
- www.freeflowerpictures.net
- www.sciencephoto.com
- Yang SH., Lin JK. , Chen WS., Chiu JH. Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. (2003) *J. Surg. Res.* 113, 133–138.
- Zgorka G., Glowniak K. Variation of free phenolic acid in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. (2001) *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26,79 – 87.
- Zhao J., Agarwal R. Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implications in cancer chemoprevention (1999) *Carcinogenesis*. 20 (11).2101-2108.
- Ziemons E., Goffin E., Lejeune R., Proença dan Cunha A., Angenot L., Thunus L., Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinin C from *Tithonia diversifolia*. (2005)*Journal of Supercritical Fluids* 33, 53-59.
- Zi X., Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7490–7495.

- Zi X., Feyes DK., Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclindependent kinases and associated cyclins. (1998) *Clin. Cancer Res.* 4, 1055–1064.
- Zi X., Mukhtar H., Agarwal R. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin: inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha.(1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 334–339.
- Zi X., Zhang J., Agarwal R., Pollak M., Silibinin up-regulates insulin-like growth factor-binding protein 3 expression and inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. (2000) *Cancer Res.* 60, 5617–5620
- Zosel K., Process for recovering caffeine. (1972)*US Patent* 3.806.619.

Chapitre II EXTRACTION

I. Procédés d'extraction

I.1.Introduction

Parmi de nombreuses techniques d'extraction, l'extraction par solvants organiques est la méthode la plus conventionnelle et, également, la plus utilisée. L'extraction par CO₂ supercritique est par contre un procédé qui est assez récent et très efficace à cause de la facilité de modification de la polarité et de la densité du solvant d'extraction et de la facilité à éliminer ce dernier (détente du CO₂-SC).

Nous détaillerons dans une première partie les techniques expérimentales utilisées pour extraire les molécules actives des graines de *Silybum marianum* et dans une deuxième partie les résultats obtenus ainsi que les paramètres qui influencent cette extraction.

I.2. Matériels et méthodes

I.2.1. Matériel végétal

L'échantillonnage n'a été réalisé qu'après le passage de la plante par trois phases de croissance : phase végétative, phase de floraison, phase de maturation et phase de récolte. La récolte a été réalisée dès le mois de mai jusqu'au mois d'août au sud de la Tunisie. Les feuilles, tiges, racines ainsi que les impuretés qui les accompagnent ont été éliminées grâce à un tamis classique. Les graines, de taille de 7 à 8 mm en moyenne sont séchées à l'aire libre sous le soleil (figure II.1) puis sont conservées dans un endroit sec afin de garder les graines sèches.



Figure II. 1 Graines de *Silybum marianum* originaire du Nord de la Tunisie

Ensuite les graines sont broyées (moulin à café) jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène. Grâce à une tamiseuse, la répartition granulométrique $250 \mu\text{m} \geq \text{Ø} \geq 2500 \mu\text{m}$ a été établie et le diamètre moyen est estimé à $310 \mu\text{m}$.

Les pourcentages en eau, en matière sèche MS (par séchage dans l'étuve), matière minérale MM (par incinération dans le four) et matière organique MO sont résumés dans le tableau II.1.

% eau	% MS	% MM	% MO
4,04±0,202	95,95±0,36	4,81±0,059	95,18±0,177

Tableau II. 1 Pourcentages en eau, matières volatils, sèche, minérale et organique (Ben Rahal, 2008).

I.2.2. Extraction par solvants organiques

La méthode normée du Soxhlet (NF V 03_903) (figure II.2) a servi de référence pour la détermination de la concrète. C'est un appareil qui porte le nom de son inventeur Franz Von Soxhlet, il permet l'extraction à chaud d'un solide par un solvant. Les extraits prélevés seront traités avec un évaporateur rotatif pour éliminer toutes les traces des solvants d'extraction. Les solvants utilisés sont le chloroforme à 61°C , l'hexane à 68°C , l'éther de pétrole à 137°C . 30 g des graines de *Silybum marianum* broyées sont disposées dans une cartouche, et elles sont introduites dans un extracteur de type Soxhlet, équipé à sa base d'un ballon de 250 mL dans lequel 100 mL de solvant sont introduits. Le solvant est mis en ébullition dans le ballon, sa vapeur passe par le tube latéral et se condense au niveau du réfrigérant. Le solvant remplit progressivement la chambre d'extraction contenant le solide, se charge d'une partie du produit à extraire et la solution est ensuite siphonnée automatiquement dans le ballon dès que la chambre d'extraction est pleine.

La durée d'extraction est mesurée à partir de l'ébullition du solvant. Le mélange recueilli est soumis à une évaporation du solvant par un évaporateur rotatif (RV 10 basic standard). Ce traitement s'effectue à température modérée (40°C). A son issue, on récupère la fraction concrète. Les expériences d'extraction et leurs paramètres sont consignés dans le tableau II.2 (V (solvant) = 100 mL ; $\text{Ø} = 310 \mu\text{m}$).

Echantillon	Solvant utilisé	Température ($^\circ\text{C}$)	Durée d'extraction (h)
E1	Hexane	68	6
E2	Chloroforme	61	3,5

Tableau II. 2 Paramètres des expérimentations par solvants organiques

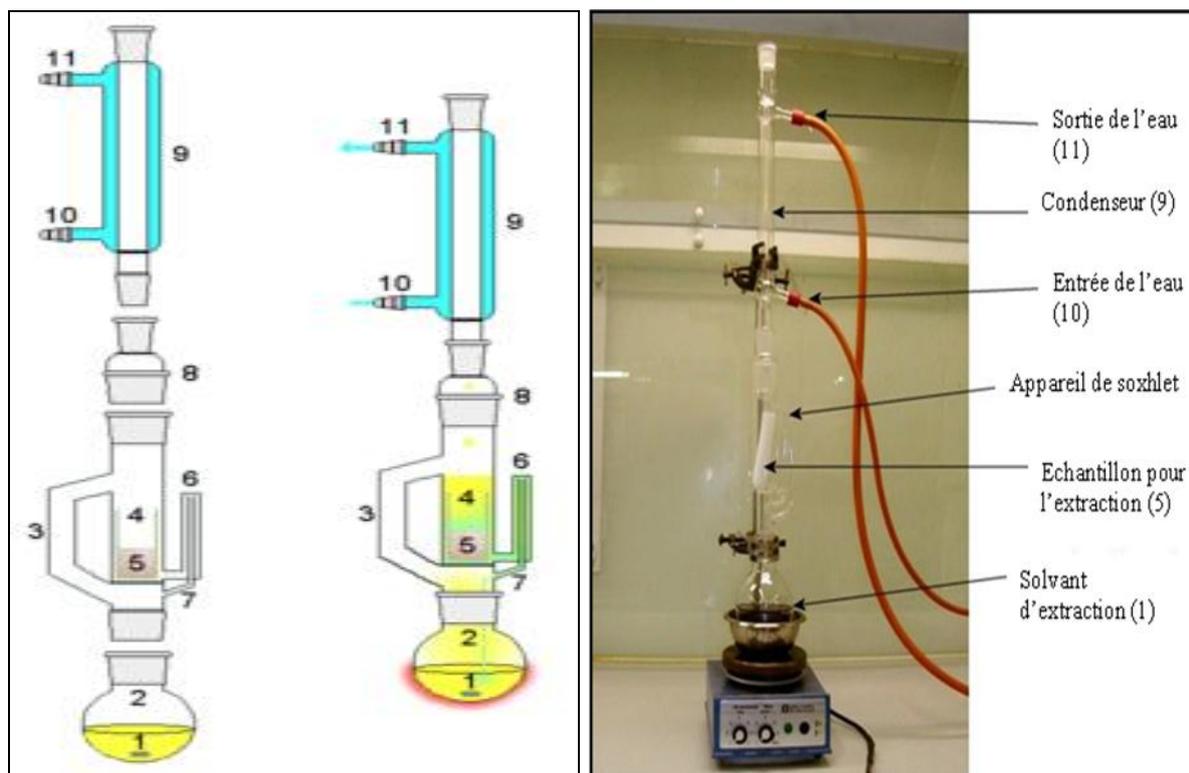


Figure II. 2 Montage d'extraction par l'appareil de Soxhlet(solvant d'extraction (1), ballon (2) , tube d'adduction (3), corps en verre (4) ,cartouche en papier-filtre épais (5), tube siphon (6-7), réfrigérant (9-10-11)

L'extraction par solvant présente certains inconvénients :

- l'extraction se fait à chaud (le solvant est porté à ébullition),
- la masse de matrice végétale est limitée par la taille de la cartouche
- la température d'ébullition de l'extrait est supérieure à la température d'ébullition du solvant.

Afin de mieux évaluer cette méthode d'extraction, nous avons aussi expérimenté un autre procédé pour pouvoir comparer : l'extraction par CO₂ supercritique.

I.2.3. Extraction par CO₂ supercritique

L'installation utilisée est un système d'extraction dynamique où l'extracteur est un cylindre métallique, placé en série avec trois séparateurs. Ces capacités disposent d'un système de double enveloppe permettant la thermostatisation. Cette installation comprend une bouteille de CO₂, un échangeur froid, un échangeur chaud, une pompe haute pression et plusieurs bains thermostatés (figure II.3 et figure II.4).

La procédure utilisée pour extraire les huiles des graines de *Silybum marianum* a été empruntée à la littérature (Szentmihalyi et al., 1998). L'introduction de l'échantillon et le temps de contact sont d'environ une heure.

Préparation du CO₂ supercritique : Le CO₂ sortant de la bouteille est sous forme gazeuse, sa pression est comprise entre 50 et 60 bar et sa température est égale à la température ambiante. Il est ensuite refroidi à une température de 4 à 5°C grâce à un échangeur froid et liquéfié ensuite au niveau de la tête de pompe qui est refroidie. Le liquide est ensuite pompé, réchauffé à l'aide d'un échangeur chaud et dirigé vers le pied de l'extracteur.

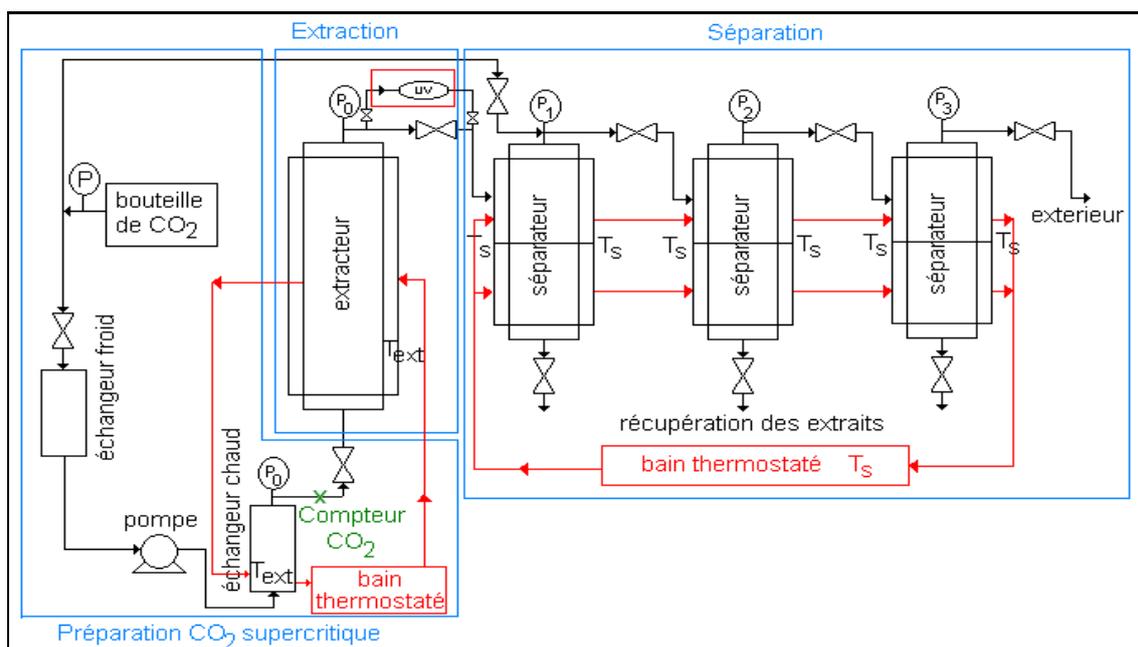


Figure II. 3 Schéma de l'installation d'extraction dynamique
(conditions limites d'utilisations : $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 250\text{ bar}$)

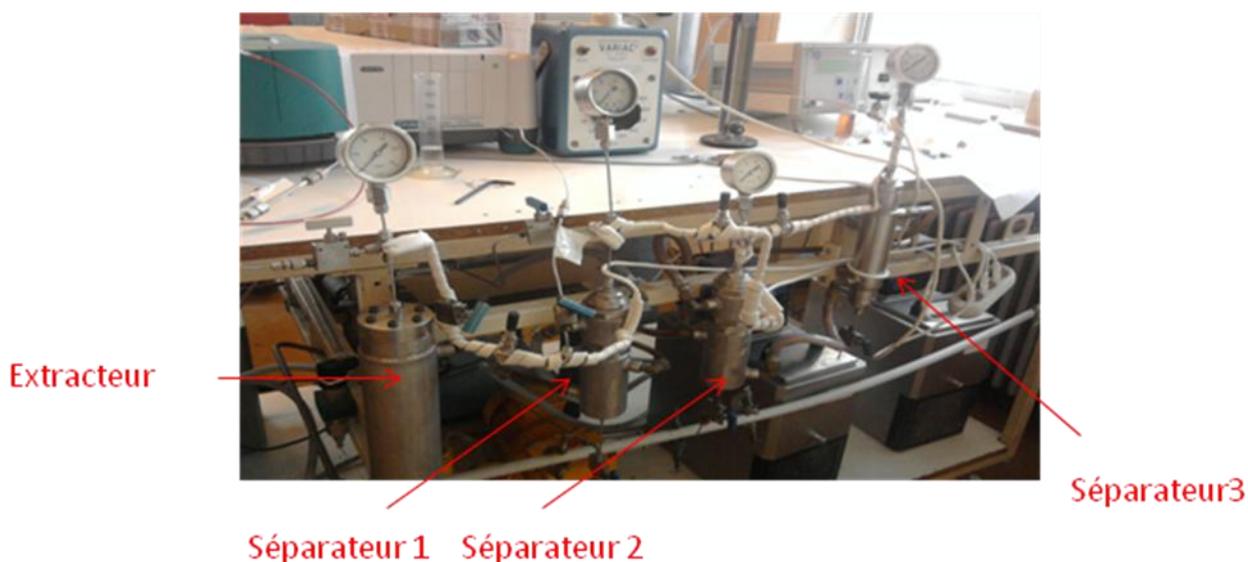


Figure II. 4 Pilote d'extraction par CO₂ supercritique au LRGP

Extraction : La température de la double enveloppe de la colonne d'extraction est réglée grâce à un bain thermostaté (HUBER). Une pompe (Dosparo Milton Roy-MILROYAL D) à membrane métallique, commandée par un système de régulation tout ou rien, permet d'atteindre la pression de l'extraction. Dans ces conditions de température et de pression, le CO₂ est supercritique et il pénètre par le bas de l'extracteur. Le débit maximum d'un tel système est de 3,2 kg h⁻¹. Le débit de CO₂ est mesuré à l'entrée de la colonne d'extraction à l'aide d'un débitmètre (MICROMOTION : ±1g) à force de Coriolis ce qui permet de connaître la quantité de CO₂ utilisée lors de l'extraction.

Séparation : La séparation CO₂- extrait est réalisée à une température de 50°C. Une fois la pression de l'extracteur atteinte, la vanne entre l'extracteur et le premier séparateur est ouverte. Les vannes entre les différents séparateurs sont ensuite réglées de manière à laisser circuler le CO₂ jusqu'à la sortie, tout en essayant de maintenir le débit constant. La durée de l'extraction varie entre 60 et 180 min. elle dépend des conditions opératoires.

L'éthanol est utilisé comme co-solvant pour augmenter la solubilité des antioxydants (polyphénols) dans le solvant. En effet, le CO₂ supercritique permet de solubiliser des composés apolaires et de faible poids moléculaire à une faible température critique (T_c = 31°C), ce qui permet d'extraire à basse température des produits thermosensibles. L'éthanol est introduit avec une pompe Gilson avec un débit de 5 ml/min pendant 15 min pendant le temps de contact de la plante et du CO₂ supercritique (avant de pomper le CO₂ supercritique).

La colonne d'extraction est une capacité cylindrique à double enveloppe en acier inoxydable Sa fermeture s'effectue par l'utilisation de frittés et de cerclips qui permettent d'assurer que la poudre de graine de *Silybum marianum* ne sorte pas de l'extracteur à l'état solide. Les caractéristiques de l'autoclave sont présentées dans le tableau II.3.

Volume (cm³)	125
Hauteur (mm)	300
Diamètre interne (mm)	23
P_{max} (Pa)	250
Matériel	Acier inoxydable
Hauteur du lit (mm)	180

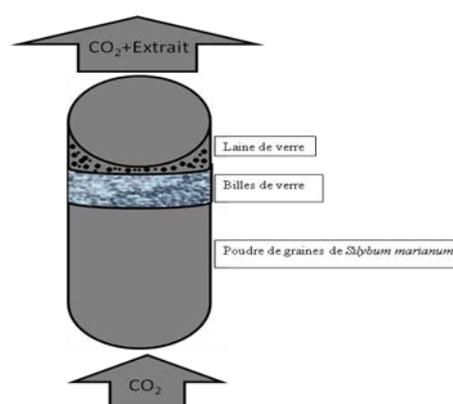


Tableau II. 3 Caractéristiques de l'extracteur **Figure II. 5** Schéma de l'extracteur en inox

La laine de verre et les billes de verre sont placées en premier au fond du réceptacle et enfin la poudre de graines. La procédure de remplissage se fait dans l'ordre indiqué dans la figure II.5. Chaque extrémité de réceptacle (figure II.5) est constituée de frittés qui jouent le rôle de filtres métalliques très fins, ils empêchent l'entraînement de l'échantillon solide et maintiennent l'ensemble de montage. La poudre de graine de *Silybum marianum* et des billes de verre sont placées dans le réceptacle.

Le but d'utiliser des billes de verre de diamètre environ de 1,7 mm est d'accroître la surface de contact entre le CO₂ et l'échantillon, tout en assurant une distribution homogène des substances extraites dans l'autoclave et d'éviter ainsi la formation d'agglomérats au sein de l'extracteur. Ces agglomérats risquent de diminuer la surface de contact avec le CO₂.

Le choix des conditions expérimentales (P, T) a été influencé d'une part par la bibliographie (Szentmihalyi et al., 1998), d'autre part l'installation utilisée ne peut fonctionner qu'à des pressions inférieures à 250 bars et à des températures inférieures à 80°C. Ceci impose de travailler, dans les séparateurs, à des pressions basses et à des températures pas trop faibles, de manière à éviter un refroidissement important lors de la détente qui entraînerait la formation de carboglace présentant une grande difficulté de récupération des produits. La pression au premier séparateur est toujours approximativement égale à la pression de l'extraction alors que la pression des séparateurs n°2 et n°3 est égale respectivement à 50 et 10 bars. Le débit moyen est égal à 0.81kg/h.

Dans le but d'obtenir le meilleur rendement d'extraction plusieurs expériences ont été réalisées, en faisant varier la température et la pression. Pour chaque expérience à T, P donnée, la masse de l'extrait a été mesurée toutes les 15 minutes. Les extraits d'une expérience ont été rassemblés puis l'élimination de l'éthanol pour l'exploitation des résultats quantitatifs qui se fait par évaporation du solvant avec un évaporateur rotatif. Pour chaque expérience, la matière première est pesée avant d'être positionnée dans l'extracteur. Ce dernier est alors fermé et le CO₂ est alimenté avec un débit constant. La pression et la température dans l'extracteur et dans les trois séparateurs sont maintenues également constantes. En fin d'extraction, la matière est à nouveau pesée afin d'estimer la perte de masse de la matière première.

Rendement de l'extraction : Le rendement de l'extraction au CO₂-SCa été déterminé après évaporation de l'éthanol des extraits. 2ml de chaque extrait est mis dans un creuset en aluminium et placé dans un four sous vide VWRScientific Modèle 1415M. Les expériences d'extraction et leurs paramètres sont consignés dans le tableau II.4.

E	P (bar)	T (°C)	Vm CO ₂ (cm ³ /mol)	ρCO ₂ (kg/m ³)	tc (min)	Co-solvant	Solubilité
E4	100	40	82,03	540	30	+	
E5	100	50	122,42	360	30	+	
E6	100	60	156,90	280	30	+	
E7	100	70	182,14	240	30	+	
E8	100	80	203,03	220	30	+	
E9	120	40	69,67	630	30	+	
E10	120	50	86,30	510	30	+	
E11	120	60	110,87	400	30	+	
E12	120	70	134,70	330	30	+	
E13	120	80	154,84	280	30	+	
E14	140	40	64,02	690	30	+	
E15	140	50	74,07	590	30	+	
E16	140	60	88,49	500	30	+	
E17	140	70	105,96	420	30	+	
E18	140	80	123,28	360	30	+	
E19	160	40	60,43	730	30	+	
E20	160	50	67,72	650	30	+	
E21	160	60	77,48	570	30	+	
E22	160	70	89,68	490	30	+	
E23	160	80	103,17	430	30	+	
E24	180	40	57,83	760	30	+	
E25	180	50	63,61	690	30	+	
E26	180	60	70,96	620	30	+	
E27	180	70	80,00	550	30	+	
E28	180	80	90,37	490	30	+	
E29	220	40	54,17	810	30	+	
E30	220	50	58,32	750	30	+	
E31	220	60	63,27	700	30	+	
E32	220	70	69,13	640	30	+	
E33	220	80	75,837	580	30	+	
E34	220	40	54,17	810	30	-	61,34
E35	220	60	63,27	700	30	-	15,82
E36	220	70	69,13	640	30	-	17,61
E37	220	80	75,837	580	30	-	17,86
E38	180	40	57,83	760	30	-	11,91
E39	180	60	70,96	620	30	-	3,31
E40	180	70	80,00	550	30	-	10,34
E41	180	80	90,37	490	30	-	1,38
E42	220	40	54,17	810	15	-	
E43	220	40	54,17	810	60	-	
E44	220	40	54,17	810	90	-	
E45*	220	40	54,17	810	30	-	

Tableau II. 4 Paramètres des expérimentations d'extraction par CO₂ supercritique (E : Echantillon ; P : Pression; T: Température; Vm CO₂:Volume molaire de CO₂ ; ρ CO₂: Masse volumique du CO₂; Tc : Temps de contact ; Co-solvant : éthanol à un débit de 5 ml/min ; Dm : Diamètre moyen de la particule =310µm ; solubilité en g extrait/g de CO₂ déterminée à partir de la figure II.8 page 84)

*Dm=620µm

II. Résultats

L'objectif de ce chapitre est d'étudier expérimentalement l'influence des paramètres opératoires principaux (solvants d'extraction, temps d'extraction, température, pression, granulométrie, débit de CO₂ et présence de co-solvant) sur le rendement en extrait huileux et sur la cinétique du processus d'extraction, afin de pouvoir sélectionner des conditions opérationnelles favorables à l'extraction.

II.1. Rendements

II.1.1. Extraction par solvants

L'extraction par solvants organiques consiste à épuiser la matière végétale en molécules extractibles par un solvant puis à éliminer ce dernier par évaporation. Le choix du solvant doit donc obéir à trois critères principalement liés aux caractéristiques physiques de ce solvant.

- ✓ Etat physique du solvant : Le solvant doit être liquide à la température et à la pression où l'on réalise l'extraction, volatile à des températures pour lesquelles la majeure part des extraits se trouve à l'état liquide.
- ✓ Miscibilité du solvant : Le solvant doit être non miscible à la phase qui contient initialement le composé à extraire.
- ✓ Solubilité : Le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant. C'est à dire, beaucoup plus soluble dans le solvant que dans le milieu où il se trouve initialement.
- ✓ Densité du solvant : Il est nécessaire de connaître ce paramètre dans le cas de la séparation par décantation.

Les extraits obtenus sont des huiles de couleur jaune, très aromatisées dont la masse volumique est de 0,8 à 0,9g ml⁻¹ et le taux de sucres est de 5,85 à 7,45 (obtenu à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe). Les résultats d'extraction par solvants organiques sont calculés selon la formule suivante et sont consignés dans le tableau II.5.

$$\% \text{ massique} = \left(\frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse de la matrice végétal sèche}} \right) \times 100$$

Solvants	Rendement (%)	Rendement (%) Hadolin et al.,2001	Rendement (%)* Szentmihalyi et al.,1998
Hexane (E1)	21,88	20,90	23,00
Chloroforme (E2)	28,85	21,70	-
Éther de pétrole (E3)	19,46	22,50	-

Tableau II. 5 Rendements des extractions par solvants organiques (%*: 23g huile/100g de fruit (10g/250ml hexane /3h))

Le rendement des extractions (Tableau II.5) montre que le chloroforme est le meilleur solvant puisqu'il permet d'obtenir la plus grande quantité d'extractibles, suivi de l'hexane ; l'éther de pétrole est en ces termes, le plus mauvais des trois solvants considérés.

Le rendement maximal est donné par le chloroforme (28.85%) dans nos expériences alors qu'il est donné par l'éther de pétrole (22.50%) dans les travaux de Hadolin et al. , (2001)

Les graines sur lesquelles notre étude est basée, originaires du nord de la Tunisie offre un rendement plus efficace que celle utilisée dans l'étude de Hadolin et al. , (2001) originaire de la Slovénie. Cette différence de rendement est peut être dû au milieu de culture de cette plante et donc écologiquement aux conditions climatiques, ou type de sol, aux fertilisants utilisés à la pluviométrie qui changent entre le contour méditerranéen (lieu de naissance spontanée de cette plante) et la Slovénie et autres pays centrales de l'Europe (lieu d'implantation) ; ce qui a accentué cet écart.

Selon Szentmihalyi et al. , (1998), le rendement des graines de chardon Marie est de 23%, cette différence est due à l'origine de la matrice végétale qui sont des poudres commerciales dans ces travaux (Herbaria Trading Co.,1996).

Dans le but de la recherche de la technique d'extraction la plus fiable de point de vue rendement, on a exploré d'autres méthodes d'extraction telle que l'extraction par CO₂ supercritique.

II.1.2. Extraction par CO₂ supercritique

Afin d'étudier l'influence des principaux paramètres opératoires, nous avons réalisé des expérimentations en faisant varier ces paramètres dans les limites imposées par le matériel disponible au laboratoire des Fluides supercritiques (LRGP-ENSIC-Nancy) et par le matériel végétal.

Le paramètre utilisé pour exprimer les résultats dans cette partie est le Rendement total (%) de l'extrait supercritique qui est consigné dans les tableaux II.6 à II.9. Cependant, ce paramètre a été étudié en fonction de plusieurs conditions expérimentales ; les principales d'entre elles sont la pression et la température. D'autres facteurs ont aussi un rôle déterminant dans la cinétique d'extraction et ont été testés à savoir l'ajout (tableau II.6) ou pas d'un co-solvant (tableau II.6), le temps de contact entre la matrice végétale (tableau II.8) et la CO₂ supercritique et enfin la granulométrie (tableau II.9).

La première observation après extraction à partir des graines de *Silybum marianum* est l'aspect des extraits : la couleur est blanche à jaunâtre, le produit est visqueux et lourd aromatisé pour les extractions réalisées sans co-solvant, par contre celles réalisées avec

l'éthanol, la couleur est jaune foncée, le produit est liquide du fait de sa solubilité dans l'éthanol et avec absence totale d'arôme. (Figure II.6)

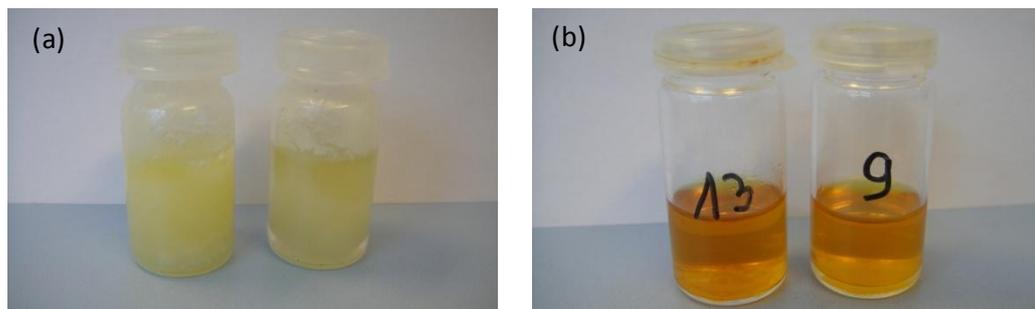


Figure II. 6 Aspect des échantillons obtenus après extraction sans ajout de co-solvant (a) et avec ajout de co-solvant (b).

Influence de la pression : Les tableaux II.6, 7, 8 et 9 montrent que parmi les meilleurs rendements 30,87% avec co-solvant (tableaux II.6) et 32,37% sans co-solvant (tableaux II.7) figurent ceux obtenus à forte pression (220 bar) ; c'est la pression imposée par l'appareillage sachant que certains pilotes d'extraction permettent de travailler à fortes pressions. Généralement la polarité du solvant est liée à sa masse volumique dans les conditions opératoires données, la masse volumique du CO₂ varie entre 0,15 et 1 g/cm³ et dépend de la pression et de la température, aussi sa variation n'est pas linéaire.

Rendement (%)	100 bars	120 bars	140 bars	160 bars	180 bars	220 bars
T=40°C	27,3	26,7	24,7	22,0	26,1	30,8
T=50°C	19,8	17,1	19,5	28,3	20,7	27,6
T=60°C	12,5	13,4	16,9	13,5	14,2	21,9
T=70°C	22,1	21,2	12,6	17,2	16,9	25,2
T=80°C	15,3	23,0	19,1	20,9	19,6	17,5

Tableau II. 6 Rendements (%) des extractions par CO₂ supercritique par ajout de co-solvant 5 ml/min pendant 15 min ($V_{total} = 75$ ml d'éthanol) ; $m_{graines} = 30g$

Rendement (%)	180 bars	220 bars
T=40°C	22,4	32,3
T=60°C	21,7	30,1
T=70°C	24,1	26,1
T=80°C	27,7	30,2

Tableau II. 7 Rendements (%) des extractions par CO₂ supercritique sans co-solvant

Temps de contact	15 min	30 min	60 min	90min
Rendement (%)	19,8	32,3	20,7	19,1

Tableau II. 8 Rendements (%) des extractions par CO₂ supercritique à différents temps de contact à P=220bars, T=40°C

Diamètre moyen	310 μ m	620 μ m
Rendement (%)	32,3	13,5

Tableau II. 9 Rendements (%) des extractions par CO₂ supercritique à différentes granulométries à P=220bars, T=40°C

L'augmentation de la pression entraîne un accroissement important du rendement. Lorsque la pression passe de 180 à 220 bars (à 40 °C) cet accroissement atteint 10 %. Cette évolution est expliquée par l'augmentation de la masse volumique du solvant avec la pression (de 761 à 817 kg/m³) qui a pour conséquence l'accroissement de la solubilité du soluté.

L'extraction par le CO₂ supercritique donne un rendement maximum de l'ordre de 32,37 d'huile par 100 g de matière sèche (E34), et 28.85 d'extrait huileux par 100 g de matière sèche (E3).

Dans le but de la recherche de la technique d'extraction la plus fiable de point de vue rendement, on peut postuler que l'extraction par CO₂ supercritique offre de nombreux avantages. L'extraction par fluides supercritiques montre le plus haut pourcentage de rendement et avec une quantité d'huile pure et sans traces de solvants ce qui est le but de nouvelles techniques d'extraction qui trouveront leurs exploitations dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Influence de la température : De point de vue température (tableau II.6), l'expérience qui permet d'offrir un rendement maximum est celle menée à une température de 40°C, ceci est remarquable pour presque toute pression d'extraction choisie (à 100 ,120 ,140 ,180 et 220 bars avec co-solvant ; à 220 bars sans co-solvant (tableau II.7)) ceci s'explique par le fait que cette température est proche de celle du point critique du CO₂.

Plusieurs études (Nguyen et al. ,1991 ; Langa et al. , 2009) concernant l'influence de la pression et de la température ont montré que l'augmentation de la pression entraîne une augmentation du rendement de l'extraction, ce qui est dû à une augmentation de la masse volumique du solvant, par contre une augmentation de la température ne donne pas le même résultat, du fait de l'influence soit de la masse volumique du solvant, soit de la pression de vapeur des composés à extraire. Reverchon et Senator (1992) ont montré que pour un grand nombre de plantes et de graines, les conditions optimales d'extraction sont une pression de 100 bars et une température de 40 °C.

Influence de l'ajout du co-solvant : L'ajout de l'éthanol donne des résultats plus faibles par rapport aux expérimentations réalisées sans ajout de co-solvant aux mêmes pressions et températures (Tableau II.6 et II.7). Selon Esquivel et al. , 1999, l'ajout du co-

solvant augmente le rendement d'extraction. Ce postulat contredit les résultats de nos travaux, ceci peut être expliqué par plusieurs raisons la plus probable d'entre elle est la perte en masse lors de l'évaporation de l'éthanol par l'évaporateur rotatif (difficulté de récupération de l'huile dans le ballon d'évaporation).

La nécessité de l'ajout d'un co-solvant s'est imposée dans le but de l'identification, la caractérisation et la quantification des flavonolignanes présents dans la graine de *Silybum marianum*. Ceci est à expliquer dans le prochain chapitre.

Influence du temps de contact : Comme mentionné précédemment le temps d'extraction dépend généralement des propriétés physico-chimiques et des structures des composés qu'on souhaite extraire. De nombreuses études (Sun et Temelli, 2006) se sont intéressées au temps d'extraction total (temps d'extraction des caroténoïdes des carottes égale à 4h) qui est en fait le temps dynamique additionné au temps statique d'extraction (temps de contact entre la matrice végétale et le CO₂ supercritique). Par contre certaines d'entre elles mentionnent seulement que le temps statique choisi est de 20 à 30 min (Follegatti-Romero et al., 2009) ; c'est une durée dite optimum. L'étude de l'influence de ce paramètre a permis de confirmer que le maximum de rendement d'extraction est à 30 min (rendement = 32,37%) alors qu'à 15, 60 et 90 min, le rendement est sensiblement égale.

D'après les travaux Reverchon et Senator (1992), l'augmentation du temps statique de l'extraction de l'huile du romarin ne révèle aucun changement dans le rendement d'extraction ce qui est dû probablement à un équilibre établi entre les composés de la matrice de l'échantillon et le fluide supercritique. Il faut noter que le temps dynamique est égal au temps de l'épuisement de la matière végétale, après environ 120 minutes d'extraction comme le montre l'exemple de la figure II.7. (Le choix de la pression et de la température sont aléatoires pour expliquer cet exemple d'épuisement de matière en fin de chaque extraction).

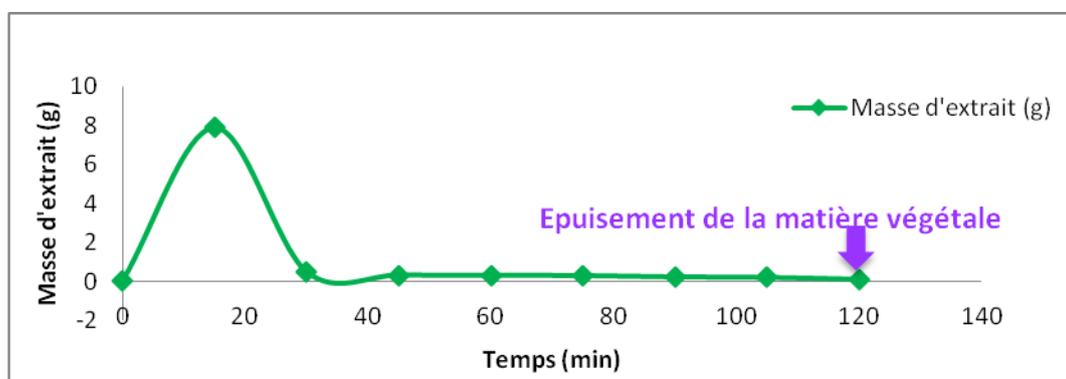


Figure II. 7 Epuisement de la matrice végétale à P=220 bars et à T=40°C (E29)

Influence de la taille des particules : la nature (graines très sèches 95,955%±0,36), la taille (7 à 8 mm) et la dureté des graines nous a permis d'étudier uniquement deux diamètres moyens (310 et 620 μm) puisque des particules plus fines peuvent entraîner la formation de bouchons à la sortie de l'extracteur.

Les résultats de nos travaux (tableau II.9.) confirment qu'une augmentation de la taille des particules (diamètre moyen=620 μm (sans co-solvant)) engendre une diminution de la surface d'échange et conduit à une diminution du rendement de l'extraction (13.50%).

Les travaux de Szentmihalyi et al (1998) montrent que les résultats de rendement d'extraction (Tableau II.10.) sont inférieurs à ceux trouvés dans nos travaux même à très fortes pressions (400 bar) et à des températures proches du point critique (35 à 55°C).

Les différences de pourcentages peuvent être expliquées par l'origine des graines (Herbaria Trading Co. ,1996) et par conséquent les conditions climatiques de la région, le type de sol... comme mentionné précédemment.

Paramètres	Rendement (%) Szentmihalyi et al.,1998
P=30bar; T=35°C	10,58
P=120-400bar; T=35°C	3,22
P=120-400bar; T=55°C	6,095
P=400bar; T=35°C	22,678
P=120-400bar; T=40°C	2,507

Tableau II. 10 Rendements d'extraction à différentes pressions et températures

De point de vue de la solubilité, les travaux de Sˇkerget et al. , (2003), dont les valeurs de solubilité sont consignés dans le tableau II.11, montrent que les valeurs obtenus sont moins élevées que celles que nous avons obtenues.

Paramètres	Solubilité (tableau II.4)	Paramètres	Solubilité (Sˇkerget et al. , (2003))
P=180 bar; T=40°C	11,91	P=187,5 bar; T=40°C	7,7
P=220 bar; T=60°C	15,82	P=227 bar; T=60°C	17,9
P=220 bar; T=80°C	17,86	P=218 bar; T=80°C	10,7

Solubilité (g d'extrait/g CO₂)

Tableau II. 11 Tableau comparatif des résultats de solubilité à différentes pressions et températures

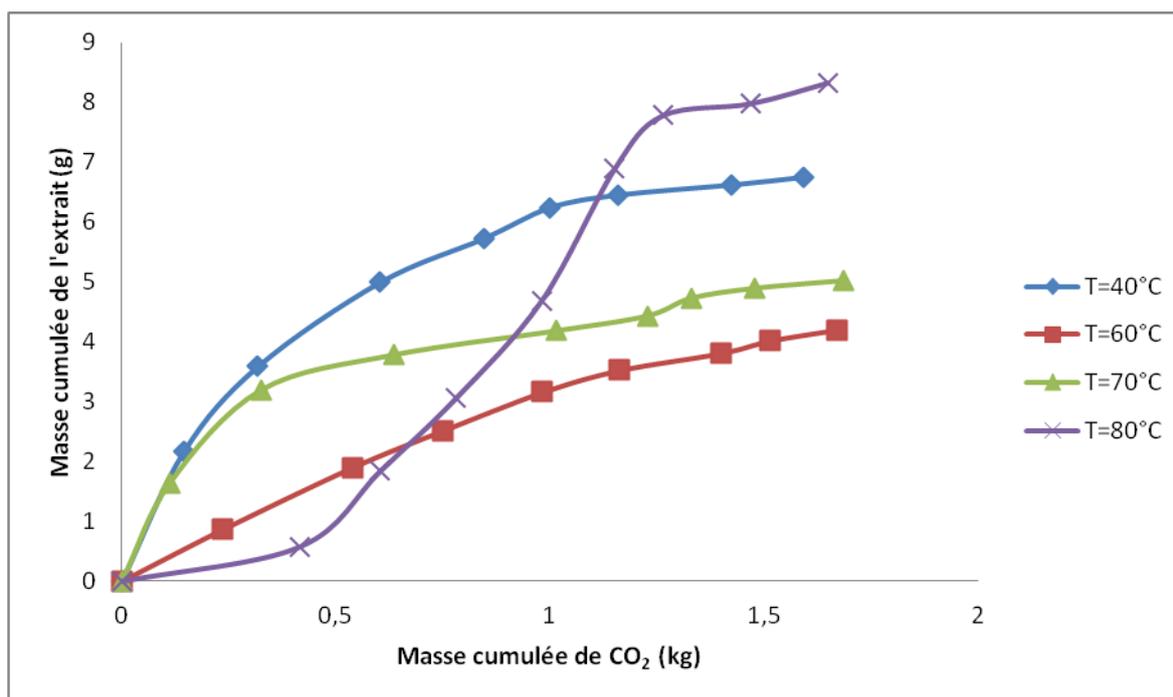


Figure II. 8 Courbe de détermination de la solubilité (P=180 bar)

II.2. Cinétique d'extraction par CO₂ supercritique

Les résultats concernant la cinétique d'extraction sont présentés en traçant l'évolution de la fraction de masse extraite (g extrait/kg matière première) en fonction du temps.

La vitesse d'extraction représente la masse de matière extraite (mg) par unité de temps (min). Ce paramètre permet de mettre en évidence le régime d'extraction à un temps donné.

II.1.1. Influence de la pression

Afin d'évaluer l'effet de la pression sur le rendement de l'extraction du produit huileux des graines de chardon Marie par le CO₂ supercritique (avec co-solvant) différentes valeurs de pression ont été choisies : 100 bar, 140 bar, 180bar, 220bar (250bar est la limite de l'appareillage). Différentes expériences ont été menées tout en fixant la température, le diamètre de particules, le débit du CO₂ supercritique et le temps de contact.

La figure II. 9 représente la cinétique d'extraction à 40°C ; avec un temps de contact $T_c=30$ min à partir d'une matière végétale dont le diamètre moyen $D_m=310\mu m$ à deux pressions 180 bar et 220 bar (sans co-solvant).

Les résultats expérimentaux montrent une augmentation du rendement avec la pression. Ceci peut être attribué à l'augmentation du pouvoir solvant du CO₂ à haute pression en raison de l'augmentation de sa masse volumique.

La courbe montre une évolution de la vitesse d'extraction en augmentant la pression. A 180 bar l'extraction est plus lente et le produit extrait est presque constant au fur et à

mesure de temps d'extraction alors qu'à une pression plus élevée (220 bar) le maximum de la masse est extraite à la première vingtaine de minutes et le temps d'épuisement de la matrice végétale est très court et ce qui permet de conclure qu'en augmentant la pression d'extraction, on obtient une meilleure efficacité du solvant.

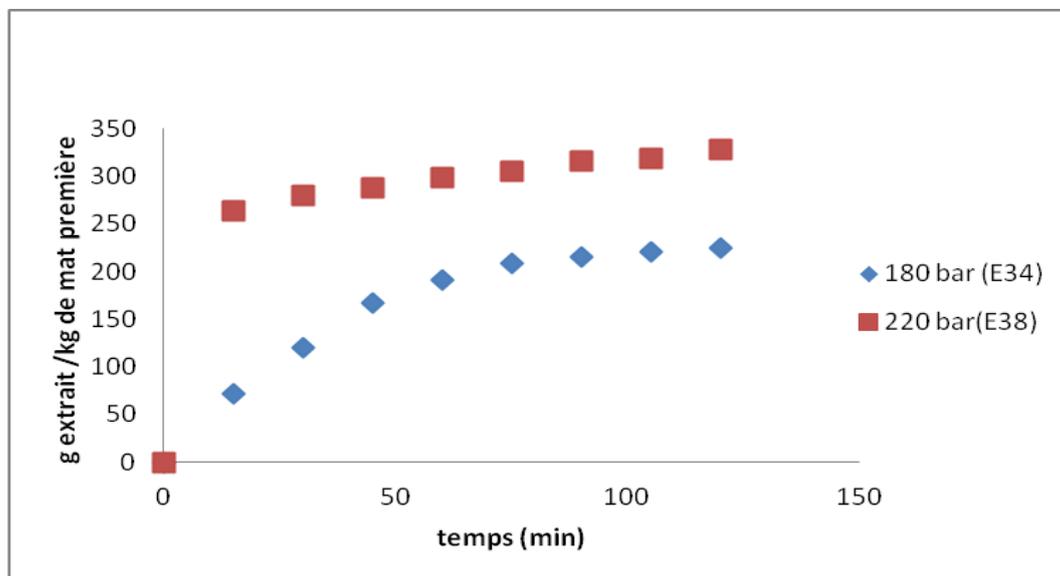


Figure II. 9 Cinétique d'extraction en fonction de la pression (T=40°C ; sans co-solvant)

Même si l'augmentation de la pression conduit à une augmentation de la vitesse d'extraction et donc du rendement, il est peut être préférable de travailler avec des pressions modérées (100 à 140 bar), où une extraction sélective de l'extrait obtenu. Dans ces conditions, plusieurs composés volatils sont préférentiellement extraits et le coût énergétique est moins onéreux.

L'annexe 2 montre les différentes figures de la cinétique d'extraction à différentes températures 40, 50,60,70 et 80°C en fonction des pressions 100, 140,160,180 et 220 bar et en présence de co-solvant.

II.1.2. Influence de la température

Les figures II.10 et II.11 montrent l'effet de la température à pressions fixes (sans co-solvant). Les résultats confirment la tendance générale rapportée dans la littérature Carvalho Jr et al. , (2005), et A. K.Genena et al. , (2008) où quand la température augmente le rendement d'extraction diminue. Par conséquent, pour une pression fixée, le meilleur rendement d'extraction est obtenu à de basses températures. De ces résultats, il peut être conclu que l'effet de la température dépend des valeurs de ce paramètre et peut ne pas être régulier pour certains systèmes.

Pour une pression de 180 bars, le rendement de l'extraction augmente quand la température diminue (figure II.10), car dans ce cas, c'est l'effet de l'augmentation de la masse volumique du solvant qui prédomine, par rapport à l'effet de la tension de vapeur du soluté.

Il faut noter qu'une élévation assez importante de la température présente le risque de dégradation thermique des molécules les plus intéressantes. En général, des températures de l'ordre de 40 à 50 °C suffisent dans l'extraction par CO₂ supercritique.

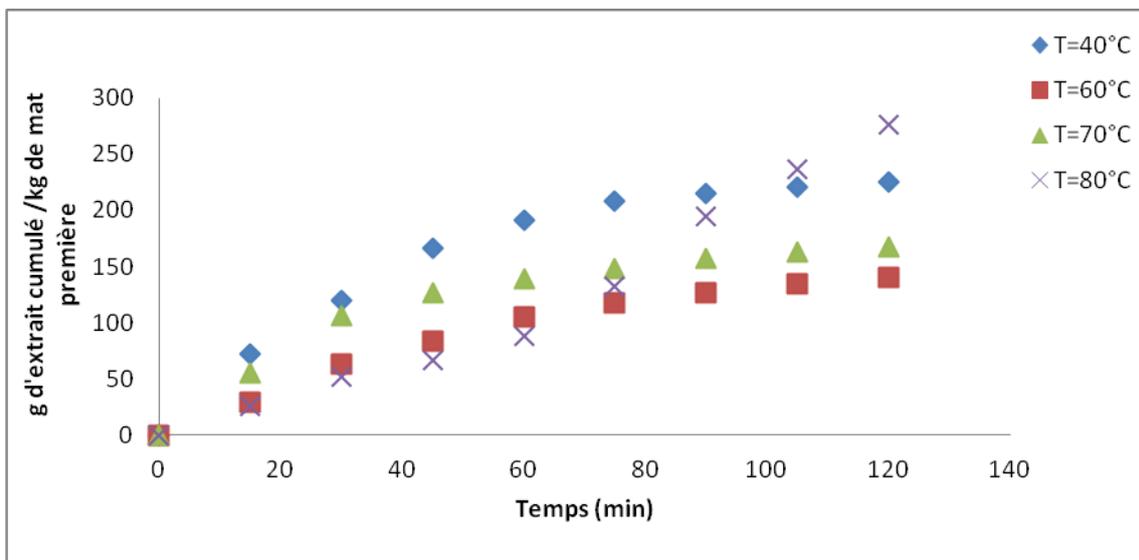


Figure II. 10 Cinétique d'extraction à P=180 bars (sans co-solvant) et à différentes températures T=40°C (E38) ; 50°C (E39); 70°C(E40);80°C (E41)

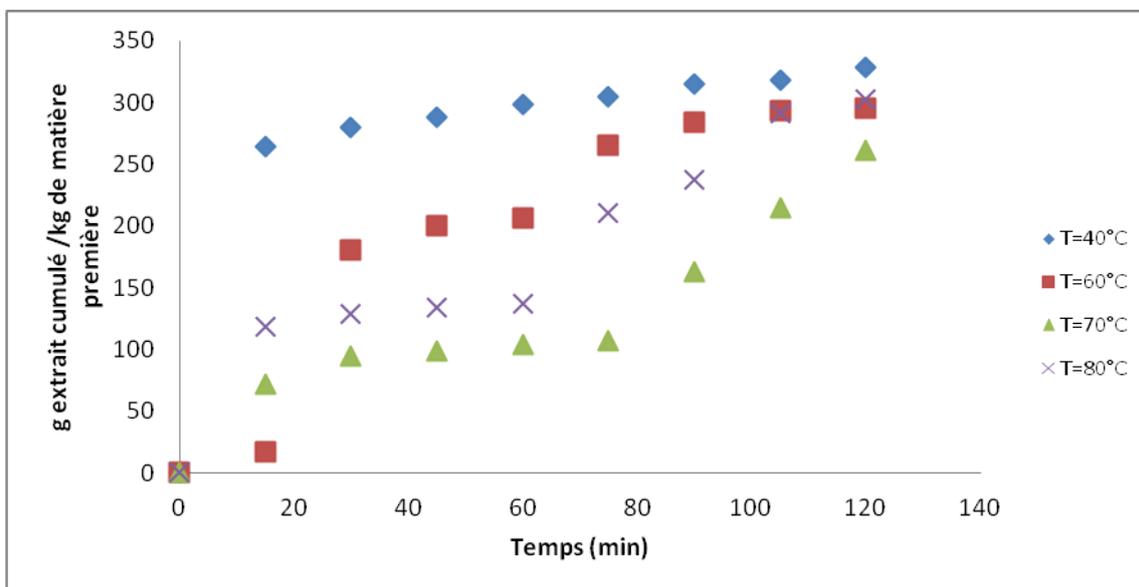


Figure II. 11 Cinétique d'extraction à P=220 bars (sans co-solvant) et à différentes températures T=40°C (E34) ; 50°C (E35); 70°C (E36); 80°C (E37)

L'annexe 1 montre les différentes figures de la cinétique d'extraction à différentes pressions 100, 140, 160, 180 et 220 bar en fonction des températures 40, 50, 60, 70 et 80°C et en présence de co-solvant.

II.1.3. Influence de l'ajout de co-solvant

L'ajout de co-solvant à la matrice végétale a été réalisé par une pompe et a été introduit après une mise en contact du CO₂-SC avec la plante. Le débit d'éthanol est de 5ml/min pendant 15min. L'éthanol est un co-solvant polaire et non toxique et sa présence dans le substrat permet d'extraire en même temps les composés et les molécules cibles (flavonolignanes), cet objectif sera plus développé dans le chapitre suivant.

Les courbes des figures II.12 et II.13 montrent que l'utilisation de l'éthanol comme solvant permet l'augmentation considérable du rendement (dans les expérimentations utilisant le co-solvant, le rendement est calculé après évaporation du co-solvant) du à une amélioration du pouvoir solvant du CO₂. Par contre, dans certaines conditions, cette utilisation est accompagnée par une diminution du rendement. L'ajout d'un deuxième solvant peut poser des problèmes de contamination, mais ceci n'a pas une influence notable dans le cas de l'éthanol.

L'augmentation de la quantité de soluté extrait induite par l'ajout d'un solvant polaire peut être due à des interactions spécifiques avec le soluté ou/et à une destruction de la paroi cellulaire ce qui conduit à une meilleure solubilisation de certains constituants de l'extrait.

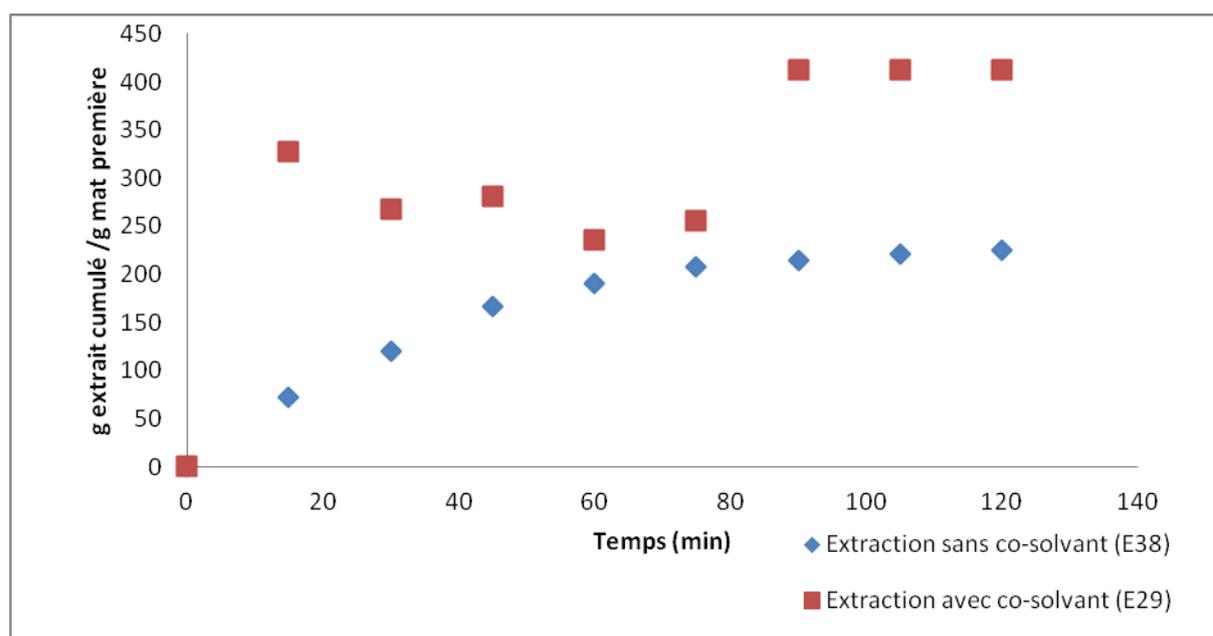


Figure II. 12 Cinétique d'extraction à P=180bar et T=40°C avec et sans co-solvant

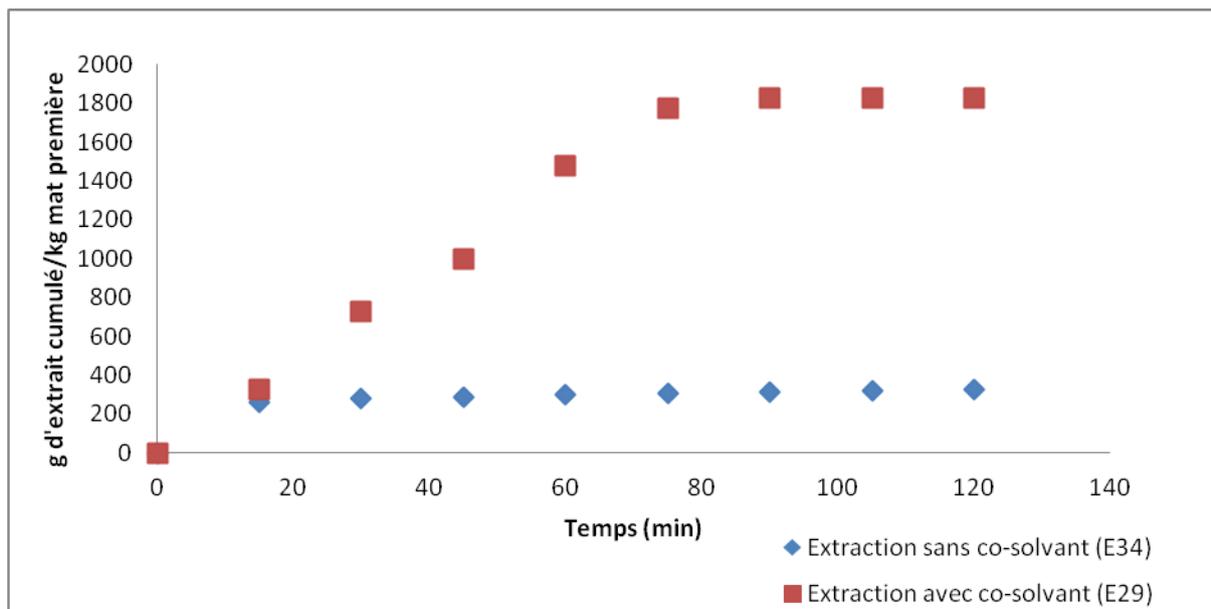


Figure II. 13 Cinétique d'extraction à P=220bar et T=40°C avec et sans co-solvant

II.1.4. Influence du temps de contact

Les courbes des résultats (figure II.14) de rendement d'extractibles obtenus à pression, température et à diamètre moyen fixes ont montré que la vitesse d'extraction est plus importante à $t_c=30$ minutes. Par contre à $t_c=15$ min et à $t_c=60$ min, les courbes sont presque identiques et l'augmentation du temps statique de l'extraction ne donne pas une différence significative de point de vue masse cumulée d'extrait, ce qui est probablement dû à un équilibre établi entre les composés de la matrice de l'échantillon et le fluide supercritique.

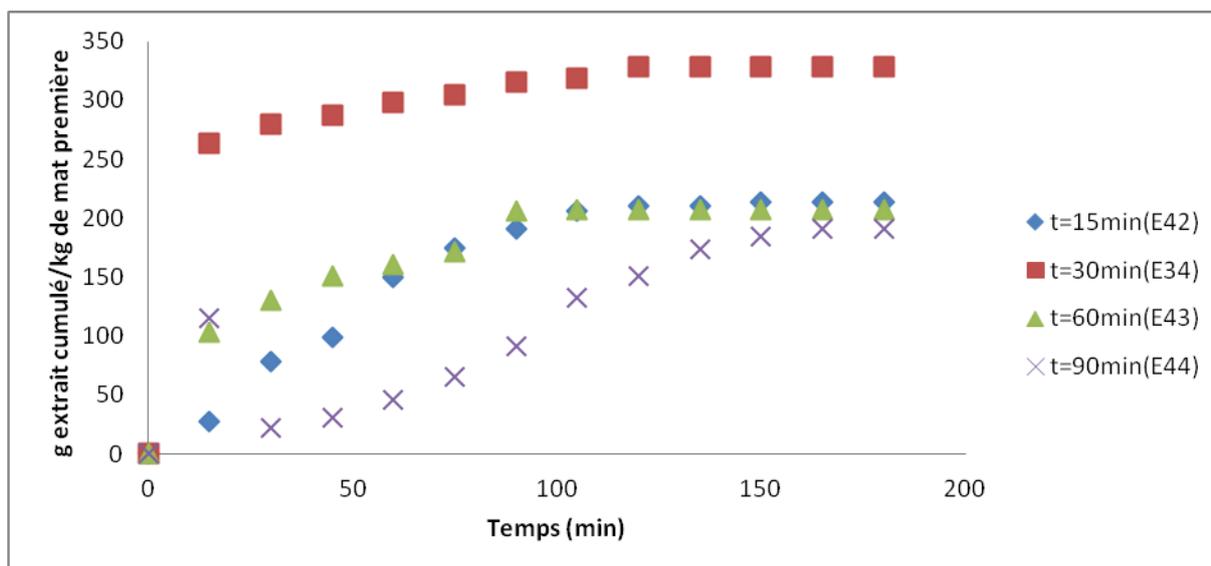


Figure II. 14 Cinétique d'extraction à P=220 bars à T=40°C sans co-solvant en fonction du temps de contact

A $t_c=90$ min, la vitesse d'extraction est faible par rapport aux autres temps de contact pris dans les expérimentations ce qui permet conclure qu'il existe aussi une étroite relation entre la matrice végétale et la force et le temps de diffusion au sein de la particule.

II.1.5. Influence du diamètre moyen

La dimension des particules de la matière végétale influe de manière considérable sur la cinétique de l'extraction. Cette influence est due, d'une part, à l'augmentation de la surface spécifique externe des particules, ce qui augmente la vitesse de transfert de masse et d'autre part, au fait que le broyage du substrat, réduit la distance de migration des molécules et donc le temps de la diffusion interne.

La différence des courbes est remarquable au début de temps dynamique de l'extraction et on observe que le meilleur résultat est obtenu avec des faibles tailles de particules, ceci en raison d'une surface spécifique élevée et par conséquent d'une plus grande surface de contact solvant-solide ; ceci est dû au nombre élevé de cellules végétales ouvertes et localisées plus près de la surface et une libération facile de l'extrait suite à l'éclatement des vacuoles des cellules suite à la succion, ce qui rend le soluté plus accessible au solvant et diminue la résistance interne.

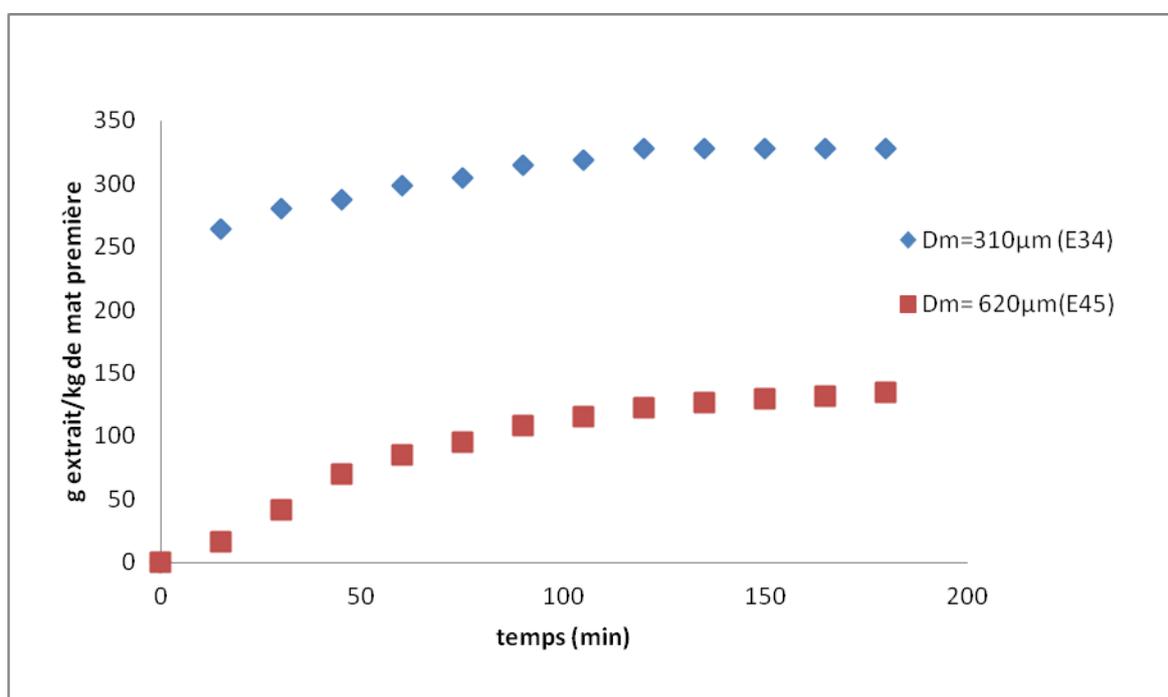


Figure II. 15 Cinétique d'extraction en fonction du diamètre moyen

Les travaux de Subramaniam et al. (2008) ont montré l'importance des opérations de prétraitement de l'extraction (prétraitements avec le H_2SO_4 , $NaOH$, $NaHCO_3$ et avec la cellulase). Ces opérations de destruction du tissu cellulaire de la matière végétale permettent

une meilleure diffusion du solvant au sein de celle-ci et l'accroissement de la vitesse d'extraction.

II.3. Analyse des particules par Microscope Electronique à Balayage MEB

L'un des facteurs qui influence considérablement l'extraction est la granulométrie de la matrice végétale, et de ce fait on a observé un aspect différent de la poudre avant et après extraction (figure II.16)

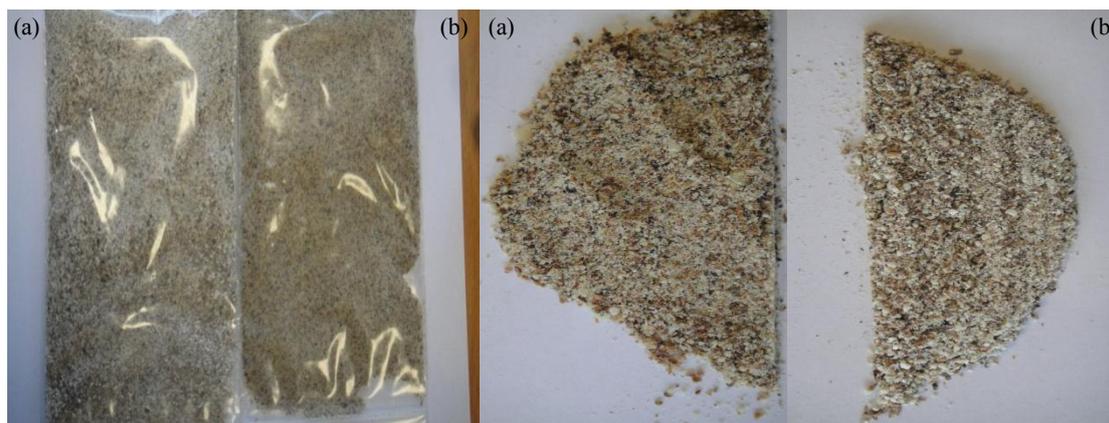


Figure II. 16 Aspects des poudres des graines de *Silybum marianum* (a) avant extraction (b) et après extraction)

Une analyse des particules (graines broyées) au Microscope Electronique à Balayage ((JEOL JSM-6491 LV, Japon), métalliseur (ion sputter : FINE COAT JFC-1100)) a été menée. Cette analyse permet de mettre en évidence l'effet du broyage des graines ainsi que ses conséquences à l'échelle microscopique.

Pour une meilleure compréhension de ces phénomènes et afin d'observer le comportement des cellules sécrétrices de la plante, plusieurs photographies par microscopie électronique à balayage des graines de *Silybum marianum* ont été réalisées.

La graine du chardon Marie a une structure et une forme particulière du fait de la dureté de son enveloppe externe, difficile à rompre et à décortiquer. Les photographies de la figure II.16 montrent la répartition des particules avant et après l'extraction.

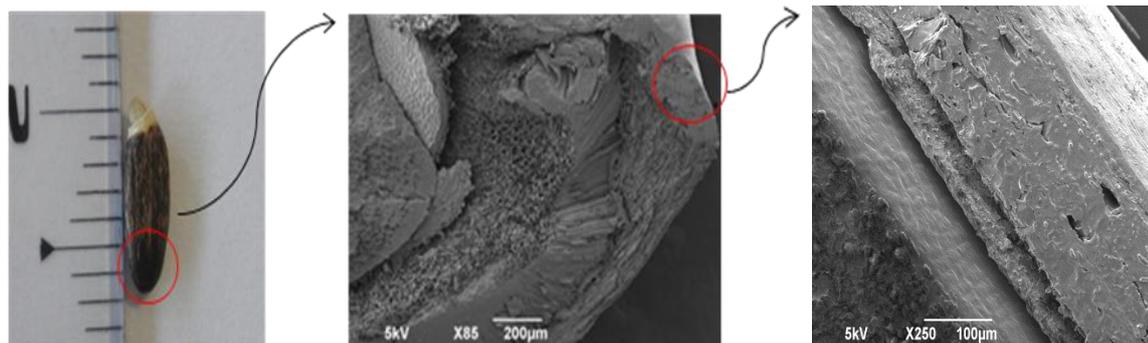


Figure II. 17 Aspects de l'enveloppe externe des graines de *Silybum marianum*

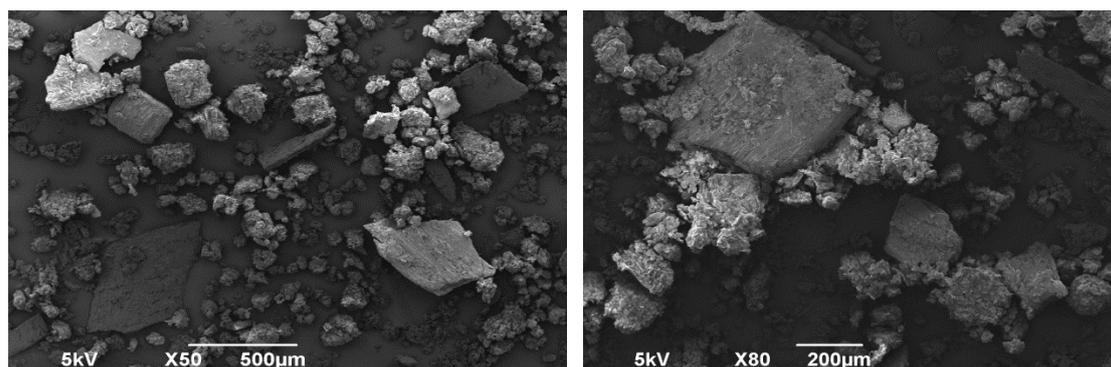
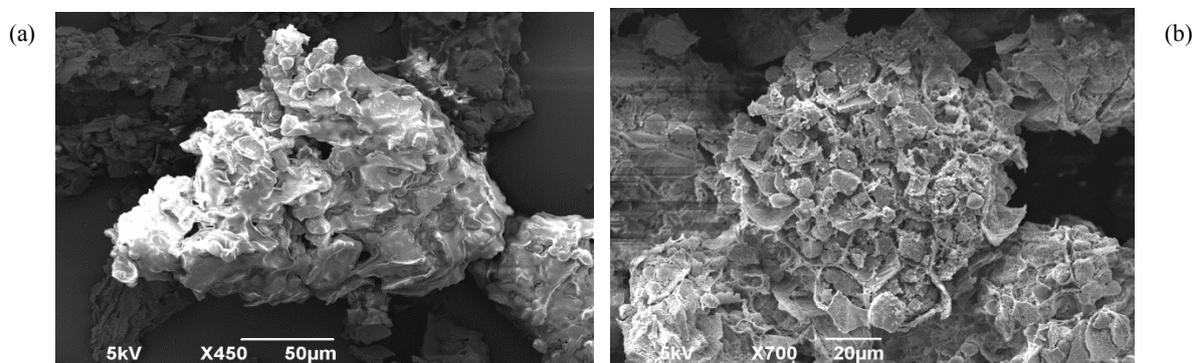


Figure II. 18 Répartition des graines de *Silybum marianum*

Il faut noter que certaines structures sont lumineuses (figure II.118 et figure II.19) à cause de la présence de l'huile dans les particules qui reflètent la lumière. L'aspect compact de ces structures montre qu'il y a eu un fort entassement de la matière végétale et endommagement de la surface des graines et des cellules végétales en raison de l'explosion produite au niveau de la paroi cellulaire conséquence de l'augmentation soudaine de la température. En effet, ces dommages sont générés quand les glandes sont sujettes à un stress thermique très sévère et à de hautes pressions et donc la pression interne dans les glandes peut excéder leur capacité d'expansion extrême.



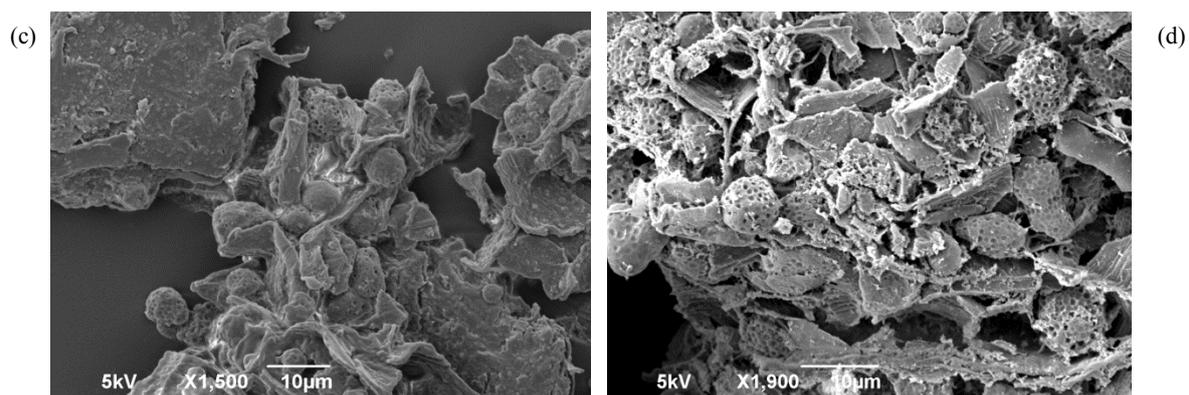


Figure II. 19 Particules des graines de *Silybum marianum* avant (a et c) et après l'extraction (b et d).

Lors de la recherche des structures, contenant les extraits huileux et responsables de leur libération, on a pu observer de nombreux de cristaux à différent agrandissement (Figure II.20).

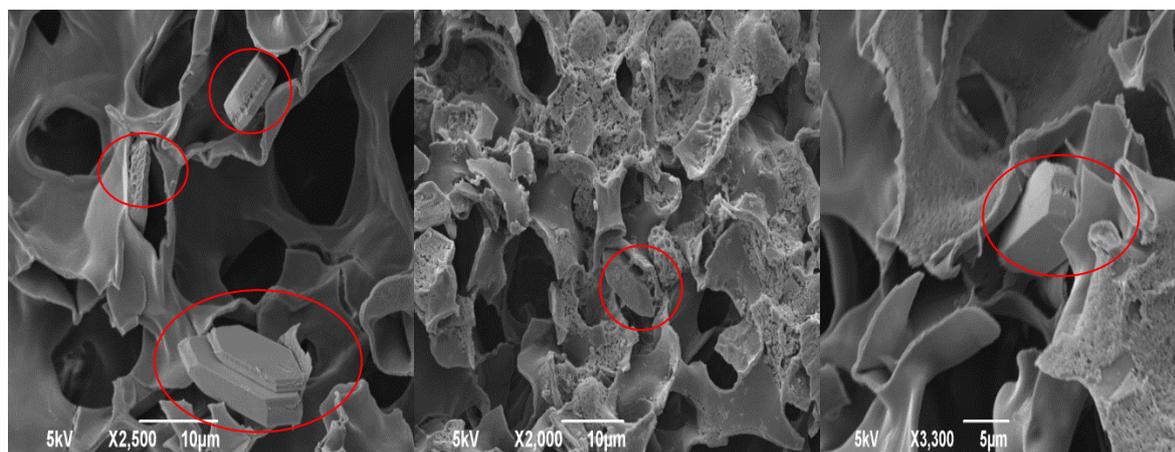


Figure II. 20 Cristaux d'acide ascorbique dans les composés internes de la graine de *Silybum marianum*

Ces cristaux ressemblent fortement à des cristaux d'acide ascorbique (figure II.21). On émet l'hypothèse que ces structures sont des cristaux d'acides ascorbiques à l'intérieure de la graine de *Silybum marianum*.

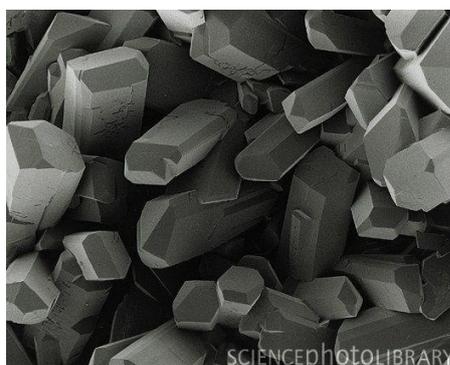


Figure II. 21 Cristaux d'acide ascorbique (Burgess, sciencephotoLibrary)

III. Modélisation

L'objectif de la modélisation est de valider les résultats expérimentaux discutés précédemment par un modèle numérique permettant la modélisation de plusieurs phénomènes qui auront lieu dans un processus d'extraction et qui dépendent essentiellement de la distribution du soluté à extraire dans le solide (matière végétale) d'une part et de la nature des résistances aux transferts de matière dans la matrice solide d'autre part.

Le modèle est un outil mathématique qui permet le développement du procédé par l'extrapolation des valeurs expérimentales à l'échelle pilote pour l'utilisation à échelle industrielle. L'objectif d'un modèle est de permettre d'obtenir des résultats dans des conditions opératoires différentes de celles qui sont expérimentales à partir de celles obtenus pendant les expérimentations.

De plus, le modèle ne doit pas être simplement un outil mathématique, mais doit aussi, refléter une parfaite maîtrise des phénomènes physiques qui interviennent dans le système expérimental et dans ses structures.

Reverchon et Poletto 1996 ont réalisé dans ce contexte la simulation de l'extraction des graines et des fleurs par un bilan de matière différentiel.

Le modèle adopté est le modèle avec extraction uniforme tout au long du lit proposé par Reverchon et Sesti Osseo (1994) : c'est un modèle à deux paramètres (D_i et k_p), qui expriment les effets des différentes résistances aux transferts internes et l'équilibre de partage du soluté entre le solide et le fluide.

On peut résumer les hypothèses de ce modèle de la manière suivante :

- écoulement de type piston, dans le lit ;
- les résistances dues à la dispersion axiale, dans le lit, sont négligées ;
- les résistances au transfert de masse sont localisées dans le solide et caractérisées par le coefficient D_i
- l'équilibre de partage du soluté entre le soluté dans le fluide et à la surface du solide est linéaire et caractérisé par le coefficient k_p
- vitesse interstitielle constante le long du lit.

Nous nous sommes intéressés à la modélisation de l'extraction avec CO₂-SC (sans co-solvant), celle du procédé utilisant l'éthanol étant plus complexe

Les équations de ce modèle sont présentées dans l'annexe 3.

Les résultats représentés dans les figures II.22 et II.23 montrent que les points expérimentaux sont bien représentés par le modèle.

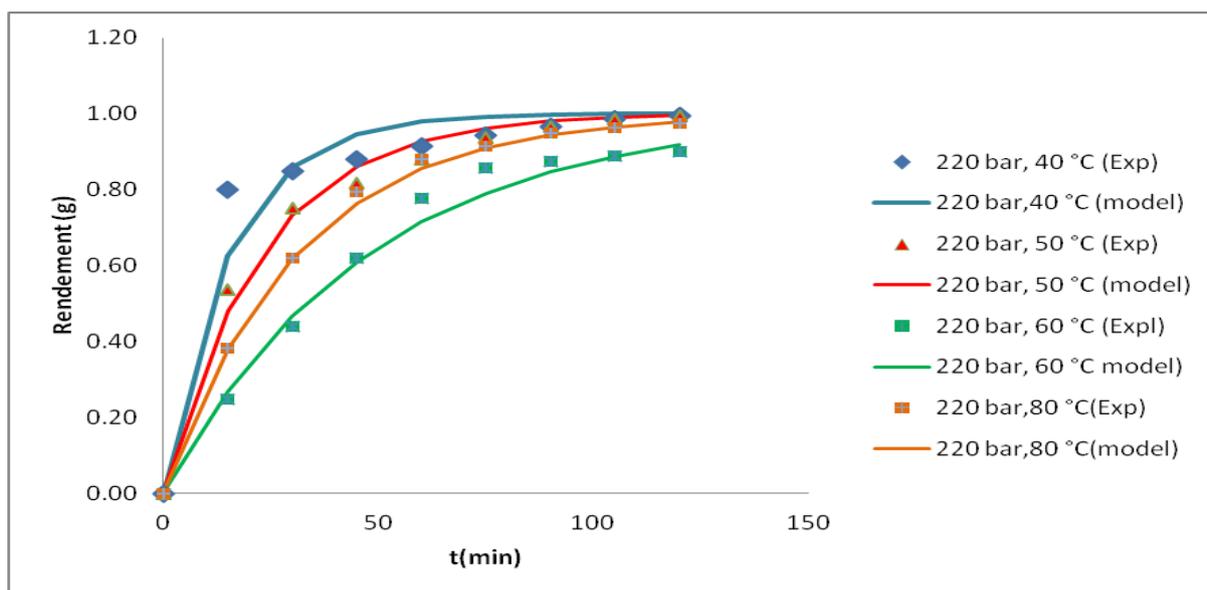


Figure II. 22 Cinétique d'extraction théorique et expérimentale selon le modèle de Reverchon et Sesti Osseo (1994) (180 bar, sans co-solvant à différentes températures)

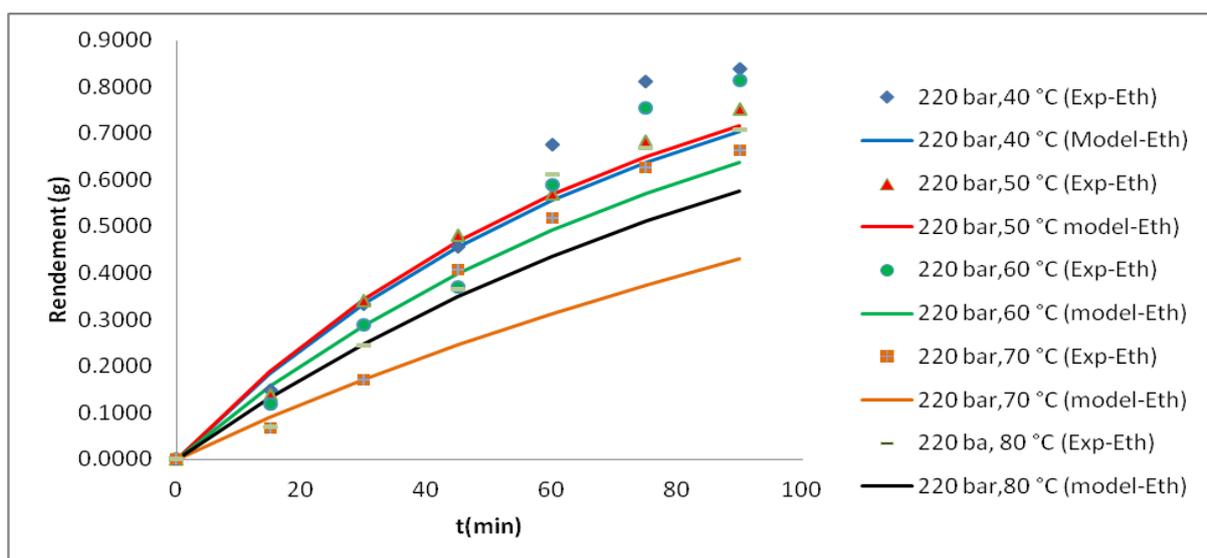


Figure II. 23 Cinétique d'extraction théorique et expérimentale selon le modèle de Reverchon et Sesti Osseo (1994) (220 bar, sans co-solvant à différentes températures)

D'une manière générale les courbes obtenues par le modèle ont la même tendance que celles représentant les valeurs expérimentales ce qui montre la fiabilité du modèle choisi.

L'effet de la température sur le rendement de l'extraction supercritique de l'extrait de graines de chardon Marie a été examiné expérimentalement en considérant différentes valeurs de ce paramètre qui sont 40, 50, 60, 70 et 80°C. A une pression fixe, les mêmes valeurs sont reprises par le modèle pour sa validation.

Dans le cas de la pression le modèle de Reverchon et Poletto 1996 donne des résultats assez cohérents qualitativement où les rendements d'extraction correspondant aux plus

grandes valeurs de pression (220 bar) sont toujours les plus élevés. Ceci est comme mentionné dans la partie expérimentale dû à l'effet de la pression sur la masse volumique qui augmente et générant plus de solvatation.

IV. Conclusion

Afin de répondre aux exigences fondamentales des industries alimentaire et pharmaceutique, de réduire ou d'éliminer les résidus de solvants organiques dans les produits finaux, plusieurs techniques d'extraction ont été testées du point de vue rendement, gain d'énergie et non toxicité du procédé.

L'étude quantitative des deux procédés : extraction par solvants (Soxhlet) et extraction par CO₂ supercritique et contrairement au résultat attendu, a permis de conclure que le meilleur rendement est obtenu pour les extractions par fluide supercritique à forte pression (220 bar) et à basse température (40°C) ; ceci valorise cette technique visant une quantité estimable de produit pur .

D'après les résultats obtenus, on peut affirmer que la pression et la température sont les deux plus importants paramètres physiques pour l'extraction avec fluide supercritique, ayant des incidences théoriques et pratiques sur le processus ; puisqu'une augmentation de la pression entraîne une augmentation du rendement de l'extraction et qu'à des températures entre 40 à 50°C l'extraction par CO₂ supercritique est la plus rentable.

Outre cette observation, plusieurs travaux ont appuyé ces résultats et ont montré que ces deux paramètres ont une grande influence sur la masse volumique du fluide supercritique qui prend une valeur maximale à des pressions très élevées et des températures proches du point critique et où il est admis que la solubilité du soluté est maximale dans le fluide supercritique.

La dimension des particules de la matière végétale influe de manière considérable sur la cinétique de l'extraction. Cette influence est due à l'augmentation de la surface spécifique externe des particules, ce qui augmente la vitesse de transfert de masse. L'addition de l'éthanol comme co-solvant à la charge donne un extrait différent. Ce résultat nous mène à conclure que l'éthanol peut être utilisé comme solvant dans l'extraction. En plus l'adjonction de l'éthanol ne pose aucun problème pour son utilisation dans l'industrie agroalimentaire. Cette addition donne un rendement moins élevé que ceux obtenus sans l'éthanol mais l'objectif est d'étudier l'aspect qualitatif des extraits obtenus du point de vue molécules bioactives.

Références

- Ben Rahal N. Etude des molécules bioactives de la graine de Silybum Marianum. Caractérisation et analyse des extraits huileux. (2008) *Mastère en Substances Naturelles Thérapeutiques Actives-Biochimie*. Faculté des Sciences de Bizerte. Université de Cathage.
- Carvalho Jr R N., Moura LS., Rosa PTV., Meireles M AA. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. (2005) *Journal of Supercritical Fluids*, 35, 197–204.
- Esquivel MM. , Bernardo-Gil MG., King MB. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. (1999) *Journal of Supercritical Fluids*, Volume 16, Issue 1, 43–58.
- Follegatti-Romeroa L A., Piantinoa C R., Grimaldib R., Cabral F A. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. (2009) *Journal of Supercritical Fluids*, 49, 323–329.
- Genena A K., Hense H., Smania Jr A., Machado de Souza S. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. (2008) *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 28(2), 463-469.
- Hadolin M., Mojca S., Knez Z., Davorin B. High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum*. (2001) *Food Chemistry*, 74 355–364 Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section
- Langa E., Della Porta G., Palavra JS., Urieta A., Mainar M. Supercritical fluid extraction of spanish sage essential oil: optimization of the process parameters and modelling. (2009) *Journal of Supercritical Fluids*, 49, 174-181.
- Nguyen K., Barton P., Spencer J.S., Supercritical carbon dioxide extraction of vanilla. (1991) *Journal of Supercritical Fluids*, 4, 40.
- Rajaei H., Amin A., Golchehre A., Esmaeilzadeh F. Investigation on the effect of different supercritical fluid extraction process on the activation of the R-134 catalyst. (2012) *Journal of Supercritical Fluids*, 67, 1– 6.
- Reverchon E. Poletto M. Mathematical Modelling of Supercritical CO₂ Fractionation of Flower Concretes. (1996) *Chem. Eng. Sci.* 51(15), 3741.

- Reverchon E., Senatore F. Isolation of Rosemary Oil: Comparison between Hydrodistillation and Supercritical CO₂ Extraction. (1992) *Flavour. Fragr. J.*, 7, 227-230.
- Subramaniam S., Vaughn K., Carrier D., Clausen EC., Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: An alternative to petroleum ether defatting. (2008) *Bioresour. Technol.*, 99, 2502.
- Sun M., Temelli F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent.(2006) *Journal of Supercritical Fluids*, 37,397–408
- Szentmihályi K., Then M., Illés V., Pernecky S., Sándor Z., Lakatos B., Vinkler P. Phytochemical examination of oils obtained from the fruit of milke thistle (*Silybum marianum* L.Gaertner) by supercritical fluid extraction. (1998)*Zeitschrift fur naturforschung. Journal of bioscinces*, 53 : 779-784
- Skerget M., Kotnik P., Knez Z . Phase equilibria in systems containing α -tocopherol and dense gas. (2003) *Journal of Supercritical Fluids*, 26, 181-191
- Villiermaux J., Chemical engineering approach to dynamic modeling of linear chromatography, (1987) *Chromatogr. J.* , 406, 11.
- www.sciencephotolibrary.com

Chapitre III

I. Analyse des acides gras des extraits de graines de *Silybum marianum*

I.1. Introduction

Le *Silybum marianum* contient une quantité relativement élevée d'huile (20-30 %) (Saller, 1995). Cette huile est un sous-produit de la production industrielle de la silymarine et doit être extraite à partir de graines. L'huile contient des phospholipides essentiels, une teneur relativement élevée en vitamine E (Hadolin et al. , 2001), et une grande quantité d'acides gras insaturés tels que l'acide linoléique ou vitamine F (C18:2 ou ω 6) et de l'acide oléique (C 18: 1 ou ω 9) (Yin et al., 1998). Les premières connaissances sur l'existence des acides gras essentiels et sur les rôles multiples qu'ils remplissent chez l'homme et l'animal proviennent de l'observation de maladies de carences provoquées par un régime totalement dépourvu d'acides gras. C'est ainsi que Burr et Burr en 1929 ont découvert l'importance de l'acide linoléique (C18 : 2 n-6 ou ω 6) en soumettant des jeunes rats à un régime dépourvu de lipides. Les symptômes étaient : retard de croissance, chute de poils, dessèchement de la peau, desquamation, altération de la reproduction, etc.

Les travaux de Li et al. ,2011 et d'El-Mallah et al.,2003 ont concerné l'extraction et l'analyse de l'huile de graines de *Silybum marianum*.

El-Mallah et al. ,2003 ont adopté l'extraction par solvant organique (chloroforme-méthanol) alors que Li et al. ,2011 a étudié l'influence de la durée et le solvant d'extraction (hexane pendant 1.5h , hexane pendant 14h et extraction hydraulique) ainsi que l'effet du prétraitement de la matrice végétale (un prétraitement enzymatique puis une extraction par solvant organique (hexane pendant 1.5h)). Les techniques d'analyse utilisées ont été GC-FID (El-Mallah et al. ,2003) et GC-MS (Li et al. ,2011)

Dans nos travaux, nous procéderons à l'analyse des acides gras des extraits huileux obtenus par solvants organiques (hexane, chloroforme, et éther de pétrole) et par CO₂-SC (avec ou sans co-solvant), dont l'influence des paramètres d'extraction ont été étudiée dans le chapitre précédent, par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme (GC-FID) et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (GC-MS).

I.2. Techniques analytiques

L'extrait est obtenu après extraction des graines de chardon récoltées et conservées à une température $T < 60^{\circ}\text{C}$ sans la présence ni de solvant ni de produits chimiques. L'huile a un aspect liquide de couleur jaune claire avec une odeur bien spécifique caractérisant la plante et la graine. Les propriétés des extraits sont résumés dans le tableau III.1 qui représente l'aspect, l'odeur, la couleur, la densité et les indices de saponification, d'acidité et de réfraction des extraits obtenus par solvants organiques et un seul exemple (E34) des extraits obtenus par CO_2 supercritique puisque tous les extraits obtenus par CO_2 -SC auraient les mêmes propriétés.

D'après le tableau III.1, les valeurs des indices restent dans la moyenne des huiles réputées pour l'utilisation en cosmétique comme celle de l'huile d'argan (indice de réfraction = 1.47) qui reste la meilleure référence en cosmétologie et en industrie cosmétique (Radi, 2003).

	E1	E2	E3	E34
	(Hexane)	(chloroforme)	(Ether de pétrole)	(CO_2-SC)
Aspect	Liquide	Liq.vis	Liquide	Liquide
Odeur	Aroma	Aroma	Absente	Aroma
Couleur	Jaune	Jaune	Jaune f	Trans.j
Densité	0,86	0,99	0,92	0,98
Is	1,24	1,52	3,85	3,35
Ia	43,19	28,97	32,6	22,44
Ir	1,4	1,43	1,46	1,45

Tableau III. 1 Propriétés des extraits huileux

Liq.vis : Liquide visqueux /*Arom* : Aromatique ; *Trans.j* : Transparent vire vers le jaune/ *Jaune f* : jaune foncé ;*Is* : Indice de saponification ($\text{g}^{-1}\text{ml}^{-1}$) ; *Ia* : Indice d'acide (mol g^{-1}) ; *Ir* : Indice de réfraction

I.2.1. Analyse par GC-MS

Une masse de 1 mg d'extrait (extrait cumulée) d'huile diluée dans 10 μL d'hexane sont injectés (0,2 μL à l'aide d'une micro-seringue) dans le dispositif d'introduction directe d'échantillon de l'appareil de GC-MS. Le dispositif permet d'effectuer une désorption thermique des échantillons directement dans l'injecteur programmable en température.

La programmation de température suivante a été appliquée : un plateau d'une minute à une température constante de 70°C , puis un chauffage rapide de $20^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à atteindre 200°C , et un plateau à 260°C .

Les analyses ont été réalisées sur le chromatographe Hewlett Packard 5890 II, équipée d'une colonne capillaire HP-5 ms (30 m[•] de 0.25 mm. , 0.25 μm). Le débit du gaz vecteur (Hélium) a été réglé à 20 mL.min⁻¹ en sortie de la colonne et la durée totale de l'analyse chromatographique est de 25 minutes.

Le spectromètre de masse a été réglé en mode par analyse complète (full scan) entre 50 et 600 unités de masse atomique à une vitesse de scan de 0,5 scan.s⁻¹. Deux modes d'ionisation ont été appliqués : l'impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). En mode IE, l'énergie d'ionisation des électrons était de 70 eV avec un courant d'émission de 10 μA. L'ionisation chimique a été effectuée avec du méthanol comme réactif d'ionisation qui présente une valeur d'affinité protonique compatible avec celle des composés attendus lors de l'analyse. Le courant d'émission a été réglé à 20 μA dans ce cas. Les composants ont été identifiés en se basant sur les données et en comparaison de leur temps de rétention relatif et aux spectres de masse avec ceux des normes de la base de NBS75K du système de GC-MS et des données de littérature (Adams, 2001).

1.2.2. Analyse par GC-FID

Avant l'introduction des extraits huileux dans le chromatographe, les étalons standards (huile de germe de maïs et l'huile végétale de coprah, Sigma Aldrich (99%)) ainsi que les échantillons sont préparés grâce à un procédé de préparation des esters méthyliques à partir d'un acide gras neutre.

Les mesures par GC-FID sont réalisées sur une colonne remplie (1,5 m * 1/8 " * 2mm; 15% CP Sil 84 sur Chromosorb WHP 100-200 mesh; 10% phénylpropylsiloxane +90% cyanopropylpolysiloxane) avec un chromatographe Varian Série 1400 et un détecteur FID, l'intégrateur est un intégrateur Spectra Physics SP 4100. L'azote est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 15 ml min⁻¹. La température de la colonne est de 190 ° C, la température de l'injecteur est de 240 ° C, l'atténuation du détecteur est égal à 1 et celle de l'intégrateur est égal à 16, le volume d'échantillon injecté est de 1 μl. Les constituants de l'huile des graines et des extraits ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux des standards.

1.3. Résultats et discussion

1.3.1. Analyse et identification des acides gras par GC-MS

L'étude chromatographique par GC-MS a révélé la présence de sept acides gras : l'acide myristique (C14), palmitique (C16), stéarique (C18), oléique (C18 :1), linoléique (C18 :2), linoléique (C18 :3), et arachidique (C20) (figure.III.1).

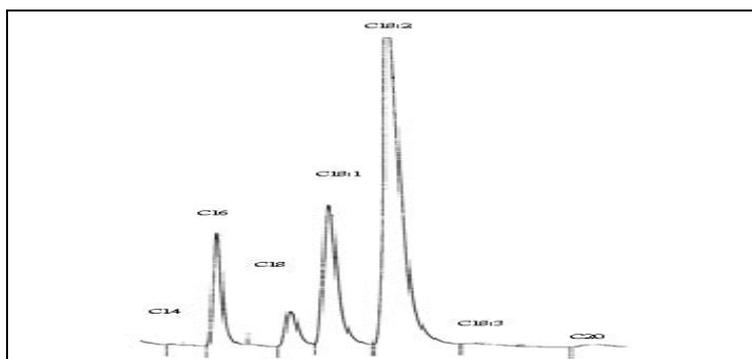


Figure III. 1 Chromatogramme de l'échantillon E1 obtenu par GC-MS

I.3.2. Quantification des acides gras par GC-FID

L'étude chromatographique par GC-FID a révélé la présence de onze acides gras : l'acide laurique (C12), l'acide myristique (C14), palmitique (C16), palmitoléique (C16 :1), stéarique (C18), oléique (C18 :1), linoléique (C18 :2), linoléniq (C18 :3), arachidique (C20) gadoléique (C20 :1), béhénique (C22) (figure III.2).

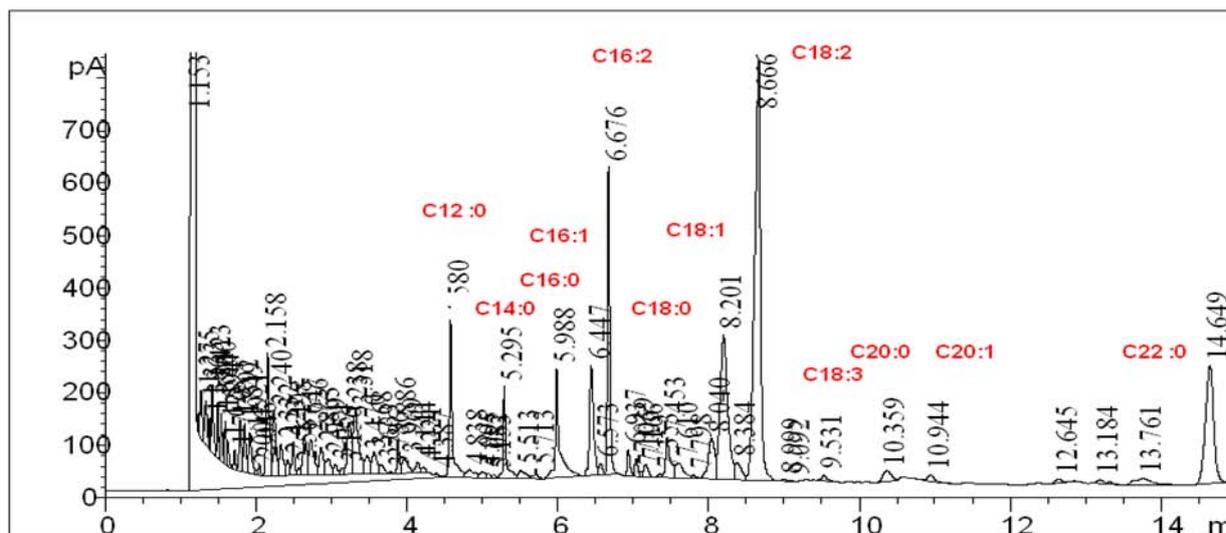


Figure III. 2 Chromatogramme de l'échantillon E1 obtenu par GC-FID

I.3.3. Composition en acides gras

Les résultats de l'analyse des extraits figurent dans les tableaux III.2, III.3 , III.4 et III.5. La différence de l'identification des acides gras entre la technique chromatographique GC-MS et GC-FID est essentiellement liée à la différence du détecteur puisque le détecteur à ionisation de flamme est plus sensible que le spectre de masse.

V (µL)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22
C14 :0	0,071	traces	traces	traces	traces	traces	traces	0,031	traces	traces	traces	0,049	0,038	0,067	traces	0,081	traces	traces	0,061	0,039	traces	0,057
C16 :0	9,707	11,719	10,445	12,67	9,15	10,26	8,37	10,58	11,79	13,01	10,21	12,34	9,69	10,88	8,07	9,16	11,95	12,84	10,63	10,17	12,66	11,31
C18 :0	5,26	2,594	4,855	5,13	4,62	5,94	5,36	3,78	2,11	2,37	5,18	4,22	5,29	4,87	5,91	5,19	5,25	2,18	5,56	6,91	4,75	3,40
C18 :1	21,75	21,093	21,847	20,16	21,45	19,66	21,88	22,51	21,76	20,07	20,61	21,39	21,19	19,55	21,84	21,98	22,67	19,55	21,17	20,19	21,67	21,13
C18 :2	60,36	63,158	60,764	60,21	61,16	60,47	60,45	62,11	60,21	60,09	60,58	60,33	60,72	60,24	60,97	60,40	60,91	61,52	60,17	60,26	60,34	60,66
C18 :3	0,598	traces	traces	0,70	traces	1,21	0,67	traces	traces	traces	0,87	traces	0,69	traces	traces	0,91	traces	traces	0,87	traces	traces	1,07
C20 :0	2,136	1,436	2,08	1,67	1,91	2,12	1,16	1,14	1,47	2,17	2,11	1,37	1,29	1,87	2,24	0,98	1,98	1,67	2,25	1,01	2,21	1,88

Tableau III. 2 Pourcentages en acides gras totaux obtenus par GC-MS (E1 à E22)

V (µL)	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E44	E45
C14 :0	traces	traces	0,061	0,054	traces	0,062	0,058	traces	0,067	0,0532	0,064	0,068	traces	0,039	traces	traces	0,048	traces	traces	0,065	traces	0,051	traces
C16 :0	9,11	8,95	10,84	9,63	12,88	10,34	13,69	11,21	10,01	11,278	9,571	10,845	8,58	10,37	9,26	12,15	11,67	12,66	9,16	10,26	11,33	11,79	10,21
C18 :0	6,22	2,97	7,71	6,52	3,32	2,24	3,16	4,87	5,68	4,9277	5,108	5,033	2,41	5,23	6,55	4,74	2,98	3,16	4,855	2,19	4,87	6,52	5,13
C18 :1	21,91	19,21	21,09	21,15	21,27	21,44	21,41	20,14	19,47	22,016	21,908	22,027	21,71	21,31	19,12	22,68	20,17	20,16	21,88	20,61	21,17	19,66	21,45
C18 :2	61,17	60,84	60,07	60,16	60,39	61,51	60,09	60,21	60,01	59,47	61,665	63,52	60,57	60,62	60,48	60,39	60,51	60,45	60,34	62,29	61,16	60,97	60,47
C18 :3	0,89	traces	0,58	0,087	traces	0,97	1,09	traces	traces	1,252	0,425	0,439	traces	1,051	1,39	traces	1,16	0,89	traces	traces	traces	0,68	0,67
C20 :0	1,63	2,11	1,31	1,95	1,84	1,66	1,17	2,58	2,37	2,116	1,25	1,28	2,26	1,91	1,13	2,67	1,18	2,12	1,39	1,26	1,82	2,27	2,06

Tableau III. 3 Pourcentages en acides gras totaux obtenus par GC-MS (E23 à E45)

V (μL)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22
C12 :0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,07	ND	ND	ND	0,08	ND	ND	ND	0,06	ND	ND	ND
C14 :0	0,014	0,012	0,09	0,011	0,071	traces	traces	0,05	0,06	0,06	0,030	0,011	0,038	0,09	0,19	0,032	0,019	0,036	traces	traces	0,012	0,09
C16 :0	9,41	10,39	8,77	7,49	9,70	11,71	10,44	11,27	9,57	10,84	8,27	10,91	11,37	9,84	13,01	12,74	8,66	10,88	ND	9,41	8,27	8,77
C16 :1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,77	0,24	0,13	0,17	0,78	0,44	0,19	0,69	0,52	ND	ND	0,25
C16 :2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,77	0,50	1,59	ND	1,59	ND	ND	ND	2,14	0,50	ND	ND
C18 :0	6,49	7,84	5,44	6,19	5,26	2,59	4,85	4,92	5,10	5,03	4,94	12,43	5,53	0,79	5,62	5,11	5,09	5,54	6,59	6,49	5,26	5,49
C18 :1	20,66	24,51	21,00	22,65	21,75	21,09	21,84	22,01	21,90	22,02	20,59	12,77	21,29	26,07	27,02	23,51	21,51	20,89	19,84	20,66	21,90	21,84
C18 :2	56,11	55,23	61,57	47,84	60,36	63,15	60,76	59,47	61,66	60,52	46,39	55,13	50,43	57,53	65,16	52,47	55,14	51,03	49,33	60,56	55,23	55,14
C18 :3	traces	traces	0,66	0,49	0,59	traces	traces	1,25	0,42	0,43	0,33	0,60	0,46	0,18	0,35	0,17	0,12	0,15	0,43	0,18	traces	0,35
C20 :0	0,9	1,44	3,61	1,67	2,13	1,43	2,08	2,11	1,25	1,28	1,74	2,37	3,20	2,53	3,33	2,15	3,11	2,01	2,41	2,41	1,44	3,61
C20 :1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,76	0,95	1,07	0,94	2,01	1,79	1,84	0,66	0,75	ND	1,09	ND
C22 :0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,99	1,93	4,50	1,79	4,77	3,85	2,45	2,03	3,89	4,77	ND	3,19

Tableau III. 4 Pourcentages en acides gras totaux obtenus par GC-FID (E1 à E22)

V (μ L)	E23	E24	E25	E26	E27	E28	E29	E30	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E44	E45
C12:0	0,09	ND	ND	ND	ND	0,05	0,08	ND	ND	ND	ND	ND	0,06	ND	ND	0,081	ND	ND	ND	0,07	ND	ND	0,06
C14 :0	0,011	0,071	traces	traces	0,05	0,06	0,08	0,030	traces	0,038	0,012	0,027	0,018	0,019	0,021	traces	traces	0,039	traces	traces	0,022	traces	traces
C16 :0	9,84	9,70	11,71	10,44	10,91	7,82	10,84	13,01	9,46	11,37	9,57	12,12	12,74	10,39	7,45	7,49	11,27	8,54	9,49	11,02	8,56	9,46	10,66
C16 :1	ND	ND	0,26	ND	ND	ND	0,78	0,77	ND	0,13	0,17	ND	0,44	0,19	0,69	0,52	ND	0,55	ND	ND	0,72	ND	ND
C16 :2	ND	1,59	ND	ND	ND	ND	ND	2,54	0,77	ND	ND	1,59	ND	ND	ND	2,14	ND	2,11	2,09	ND	ND	1,77	ND
C18 :0	6,19	4,94	2,59	5,62	4,92	5,10	5,03	4,85	12,43	5,53	0,79	5,09	5,11	5,44	5,54	6,59	7,84	5,26	4,92	4,85	3,99	5,10	2,59
C18 :1	22,65	24,51	21,09	20,59	22,01	21,00	22,02	26,07	12,77	16,94	23,51	27,01	19,84	21,51	20,89	21,29	21,66	21,29	23,51	20,87	22,22	27,04	26,07
C18 :2	47,84	43,93	63,15	57,53	59,47	56,11	55,13	60,36	61,57	50,43	49,97	65,22	52,47	46,39	61,03	60,76	61,66	61,57	63,15	47,84	60,36	55,23	60,86
C18 :3	0,49	0,60	traces	traces	1,25	0,42	0,44	0,17	0,33	0,46	0,39	0,59	0,66	0,12	0,15	0,43	traces	traces	traces	0,42	0,43	1,25	traces
C20 :0	3,33	3,20	1,43	2,08	1,67	1,25	1,94	1,74	3,11	0,9	2,53	2,37	2,15	2,13	2,01	1,28	2,11	1,67	1,43	1,55	2,53	2,13	1,67
C20 :1	0,76	ND	2,01	ND	1,77	ND	ND	ND	0,95	ND	0,94	ND	1,79	1,84	0,66	0,75	ND	1,95	ND	0,97	ND	1,22	1,65
C22 :0	ND	1,94	ND	ND	2,22	ND	ND	1,99	1,93	4,50	1,79	ND	3,85	2,45	2,03	3,89	1,84	ND	4,52	1,77	2,54	3,95	2,45

Tableau III. 5 Pourcentages en acides gras totaux obtenus par GC-FID (E23 à E45)

Actuellement, le détecteur le plus couramment utilisé en analyse organique est le détecteur à ionisation de flamme. Tandis que la spectrométrie de masse est rarement utilisée pour la détection proprement dite des molécules, elle est devenue un outil de travail très précieux en ce qui concerne l'identification des lipides séparés par chromatographie en phase gazeuse (Christie; 1989)

De point de vue quantitatif, la différence entre les deux techniques ne reflète pas un écart remarquable sur les pourcentages en acides gras qu'on a obtenu lors de nos analyses et qui reflète une importance capitale dans la nutrition et le régime alimentaire. Pourtant, certains acides gras sont au-delà des limites de détection.

L'huile de *Silybum marianum* présente une teneur très élevée (de 82,74 à 84,25%) en acides gras insaturés qui sont des valeurs supérieures à celles trouvées par Yin et al. ,1998 comprises entre 69.26 et 74.85% du totale des acides gras et celles trouvées par Li et al. ,2011 (74.251%).

L'étude de la composition de l'huile en acides gras montre que ces acides gras insaturés de type oléique-linoléique varient de 81,48 à 85,43%.

Ces acides gras essentiels confèrent à l'huile de graines de *Silybum marianum* des valeurs nutritionnelles et diététiques certaines et justifient son emploi pour les maladies cardio-vasculaires ainsi que pour le dessèchement et le vieillissement physiologique de la peau (Radi, 2003) .

Cette composition lipidique de l'huile de *Silybum marianum* peut présenter quelques variations pouvant être attribuées à différents facteurs et notamment à la provenance géographique (Radi, 2003) et à l'effet du climat (la pluviosité). Il a été rapporté que le taux d'acide palmitique augmente lorsqu'on passe de la plaine vers les hauts plateaux, que le taux d'acide oléique enregistre une augmentation avec la pluviométrie et que celui de l'acide linoléique s'accroît avec l'altitude (Maurin et al. ,1992). La qualité de l'huile est aussi déterminée par un rapport R calculé selon Ramadan et Mörsel (2006) à partir de la formule suivante.

$$R = \frac{\% \text{ acides gras saturés}}{\% \text{ acides gras polysaturés}}$$

Les résultats de l'analyse chromatographique montrent que ce rapport de l'ordre de 0,302 permet de classer cette huile parmi les huiles offrant des propriétés potentiellement

nutritionnelles et favorise l'allégement cardio-vasculaire et inflammatoire, et agit contre les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, le diabète et d'autres maladies.

L'acide linoléique C18 :2 est l'acide le plus abondant avec des teneurs importantes variant de 59,47 (E32) à 63,52% (E34) pour l'analyse par GC-MS et de 43.93 (E24) à 65.22% (E15) pour l'analyse par GC-FID, ceci nous permet de postuler que l'huile de graines de *Silybum marianum* est l'une des huiles les plus riches en acide linoléique et donc les plus riches en oméga 6 ou vitamine F. C'est un acide gras essentiel indispensable à la structure des membranes de cellules et agit sur l'équilibre des réactions physiologiques dans l'organisme.

Ce sont les précurseurs de certaines molécules qui alimentent les réactions inflammatoires, leur présence en quantité suffisante s'avère capitale et ceci dans le cas où ils ne sont pas suffisamment équilibrés par une présence suffisante d'acides gras oméga-3.

Si on chiffre à 2 % de l'énergie totale du régime alimentaire le besoin en acide linoléique, une personne consommant une ration journalière de 2700 kcal aurait donc besoin de 54 kcal qui provient de l'acide linoléique, ce qui correspond à 6 grammes de cet acide. Cette personne peut donc satisfaire ses besoins en acide linoléique en consommant seulement 9,5 à 10,16g d'huile de *Silybum marianum* par jour, soit un peu plus d'une cuillerée à soupe d'huile ou 29,34 g de graine 3 fois par jours.

La richesse en acide linoléique est l'une des propriétés de l'huile de *Silybum marianum*.

Un autre acide gras de la famille des oméga-3 est présent dans la composition lipidique des extraits huileux mais de plus faible teneur, c'est l'acide linoléique à des valeurs maximales de 1,25 % (E8, E25, E44) pour l'analyse par GC-FID et de 1.39 % (E37) pour l'analyse par GC-MS; pour les autres extraits cet acide gras est présent à de très faibles teneurs et pour certains à l'état de traces.

Ces deux précédents acides gras sont des acides gras polyinsaturés qui ont des effets stimulant sur la fonction cognitive chez les mammifères comme composants majeurs des membranes neurales. Ils améliorent la vision, la neurotransmission et la faculté d'apprentissage. Chez l'espèce humaine, la quantité d'acides gras polyinsaturés disponible durant le dernier trimestre de la grossesse et les premiers mois de la vie (période correspondant à la maturation rapide des photorécepteurs et du synaptogénèse) est

primordiale. Une alimentation riche en ces deux acides gras peut limiter les risques de maladies cardiovasculaires et du cancer.

L'acide oléique est un acide gras mono-insaturé présent à des teneurs importantes allant jusqu'à 22,68% dans E38 (détecté par GC-MS) et 27.04 % dans E15 (détecté par GC-FID) de l'huile extraite et peut être exploité dans des domaines d'industrie et de la cosmétologie.

Les techniques chromatographiques ont permis de détecter la présence de deux acides gras dans l'huile de graines de *Silybum marianum* à savoir l'acide myristique et l'acide linoléique. La présence de ces deux acides gras n'a pas été signalée dans les travaux antérieurs d'El-Mallah et al. ,2003 réalisés sur les graines des plantes poussant en l'Egypte.

L'acide myristique est présent à des taux variant de 0,01 (E1) à 0,09 % (E22). Pour les extraits obtenus par les solvants organiques il est à l'état de traces, indétectables par spectrophotométrie à l'exception de l'extrait à l'éther de pétrole où le taux est de 0,071; ce solvant offre le taux le plus élevé en acide myristique obtenu par GC-MS. Par contre par GC-FID, cet acide gras a été identifié dans tous les extraits obtenus par Soxhlet (0.012 à 0.09%).

L'acide linoléique et l'acide arachidique dans l'huile de graine de chardon Marie présentent aussi des valeurs supérieures à ceux dans l'huile de nigelle, d'argan, et d'olive (Radi, 2003 ; Cheikh-Rouhou et al. ,2007). Ainsi le taux d'oméga 6 est le plus élevé chez l'huile de graines de *Silybum marianum*.

En ce qui concerne l'acide palmitique et l'acide stéarique, l'huile de graine de *Silybum marianum* se trouve dans les moyennes des concentrations trouvés dans la littérature et résumés dans les tableaux I.3.

Li et al. ,(2011) ont étudié l'influence d'un prétraitement enzymatique des graines avant la procédure d'extraction des huiles , la conclusion tirée à partir de cette étude en comparant l'analyse des acides gras par GC-MS que ce prétraitement enzymatique n'a aucun effet notable sur cette composition (tableau III.6) et montre une meilleure détection des acides gras (19 acides gras : myristique, palmitoléique, palmitique, heptadécanoïque, linoléique, oléique, octadécanoïque, 10-nonadécenoïque, nonadécanoïque, oxiraneoctanoïque , 11-eicosénoïque , eicosanoïque , linoléique , heneicosanoïque , 13-docosénoïque , 15-tetracosénoïque, tetracosanoïque). Quant aux travaux d'El-Mallah et al. ,2003 l'analyse par GC-FID a montré des pourcentages inférieurs à ceux trouvés par Li et al. ,2011.

Par contre, les acides gras identifiés dans nos travaux montrent des valeurs supérieures aux travaux antérieurs ceci est peut être du à l'origine des graines et par conséquent aux conditions climatiques et au type de sol dans les quels ces graines ont poussé, aux techniques d'extraction et aux techniques d'analyse chromatographique utilisée.

Acide gras	Obtenus par Li et al, 2011				Obtenus par El-Mallah et al, 2003 Extrait 5	% obtenus dans nos travaux
	Extrait1	Extrait2	Extrait3	Extrait4		
A.Myristique	0,119	0,12	0,107	0,142	–	0,39
A.Palmitoléique	0,107	0,092	0,107	0,125	–	0,78
A,Palmitique	8,492	9,162	8,083	8,639	9,4	13,69
A.Heptadécanoïque	0,110	0,098	0,220	0,131	traces	
A.Linoléique	49,186	47,355	50,107	51,363	53,3	65,16
A.Oléique	20,995	25,947	19,077	15,635	20,8	27,04
A.Octadécanoïque	7,719	8,015	8,035	8,587	6,6	12,43
A.10-Nonadécénoïque	0,042	0,067	0,06	0,113	–	–
A.Nonadécénoïque	0,025	0,057	0,027	0,067	–	–
A.Oxiranéoctanoïque	0,128	0,118	0,176	0,285	–	–
A.11-Eicosénoïque	1,433	1,096	1,477	1,633	0,5	1,95
A.Arachidique	5,212	3,875	5,794	6,431	3,8	3,61
Linoléique	0,080	0,145	0,189	0,185	–	1,39
A.Heneicosanoïque	0,040	0,042	0,053	0,055	–	–
A.13-Docosénoïque	0,036	0,064	0,033	0,046	–	–
A.Docosanoïque	3,868	2,714	4,425	4,776	2,4	4,77
A,Tricosanoïque	0,055	0,039	0,031	0,077	–	–
A.15-Tetracosénoïque	0,037	0,031	0,047	0,075	–	–
A.Tetracosanoïque	1,084	0,738	1,084	1,469	0,7	

Tableau III. 6 Tableau comparatif de la composition en acides gras

Extrait1 : obtenu par extraction par solvant organique (hexane pendant 1.5h) ; Extrait 2: obtenu par extraction par solvant organique (hexane pendant 14h) ; Extrait3 : obtenu avec un prétraitement enzymatique par extraction par solvant organique (hexane pendant 1.5h) ; Extrait4 : obtenu par extraction hydraulique ; Extrait 5: obtenu par extraction par solvant organique (chloroforme- méthanol (2:1 V/V) ;

II. Analyse des flavonolignanes des extraits de graines de *Silybum marianum*

II.1. Introduction

En 2005, les graines de chardon Marie sont classées parmi les principaux suppléments diététiques (Herbalgram, 2006). Ces graines contiennent le complexe de silymarine, qui se compose de six flavonolignanes : la silychristine, la silydianine, la silybinine A, la silybinine B, l'isosilybinin A et l'isosilybinin B comme mentionnée dans le premier chapitre (figure I.10) (Wallace et al., 2003).

Ces composés sont d'intérêt pharmacologique considérable en raison de leur forte activité anti-hépatotoxique et hépatoprotective (Morazzoni et Bombardelli, 1995 ; Valenzuela, 1986) , plusieurs travaux récents ont prouvé que la silymarine agit également en tant qu'agent anti-cholestérolémique (Krecman et al. ,1998) .

De nombreuses études ont prouvé que la silybine est le composant principal du silymarine de point quantitatif et thérapeutique (Morazzoni et Bombardelli ,1995 ; Trost et Halbach, 1978), bien que la silychristine et la silydianine montrent également une activité antioxydante (Morazzoni et Bombardelli ,1995). Les résultats de Krecman et al. ,1998 suggèrent que la silybine est plus efficace une fois lié à d'autres constituants, probablement à cause de sa disponibilité dans le complexe de la silymarine.

Les six principaux principes actifs obtenus à partir du fruit du *Silybum marianum* représentent environ 70 à 80% du complexe silymarine et environ 20% à 30% d'une fraction de polymères oxydés et de composés polyphénoliques (Hagendoorn et al. ,1994)

Différentes activités biologiques ont été attribuées à ces six principaux composés de la silymarine (Dubois et al. ,1956 ; Cacho et al. ,1995). La taxifoline est largement disponible dans les écorces pinus ou Larix et dans les graines du *Silybum marianum* (Daniel et al. , 2006).

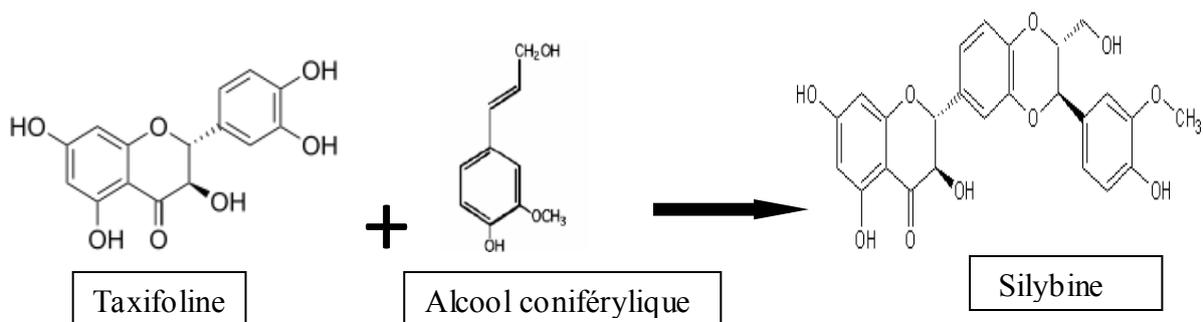


Figure III. 3 Réaction de formation de la silybine

De nombreuses matrices végétales sont employées dans la médecine traditionnelle et clinique grâce à leurs haute concentration en taxifoline et donc elles sont conseillées dans le régime nutritionnel. Plusieurs études se sont intéressées à leur utilisation potentielle dans le développement des médicaments (Vega-Villa et autres, 2009). La taxifoline dilate de manière significative les vaisseaux sanguins, améliore la microcirculation, augmente le flux de sang cérébral, et empêche l'agrégation de plaquette. Elle a été souvent employée dans le traitement de l'infarctus, thrombose cérébrale, maladie cardiaque coronaire et angine de poitrine (Landolfi et al., 1984 ; Shiko et al., 2009).

II.2. Analyse par Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases, stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur. Nous avons choisi d'utiliser un détecteur à barrettes de diodes PDA.

La méthode HPLC est adoptée pour déterminer la concentration en flavonolignanes dans les extraits. Le système chromatographique HPLC utilisé dans nos expériences comprend les éléments suivants :

- Chromatographie liquide sous haute pression Shimadzu LC-10AT VP
- Détecteur à barrettes de diodes PDA (barrettes de photodiode) (Varian)
- Pré-colonne C18, avec la dimension particulière de 5 µm (Alltech)
- Colonne C18, avec le diamètre des particules : 5 µm (poursuite XRs de Varian)
- Débit = 1 ml/min
- Volume injecté = 20 µl

La longueur d'onde est 304 à 330 nm choisie après une analyse en fluorescence obtenue par un fluorolog.

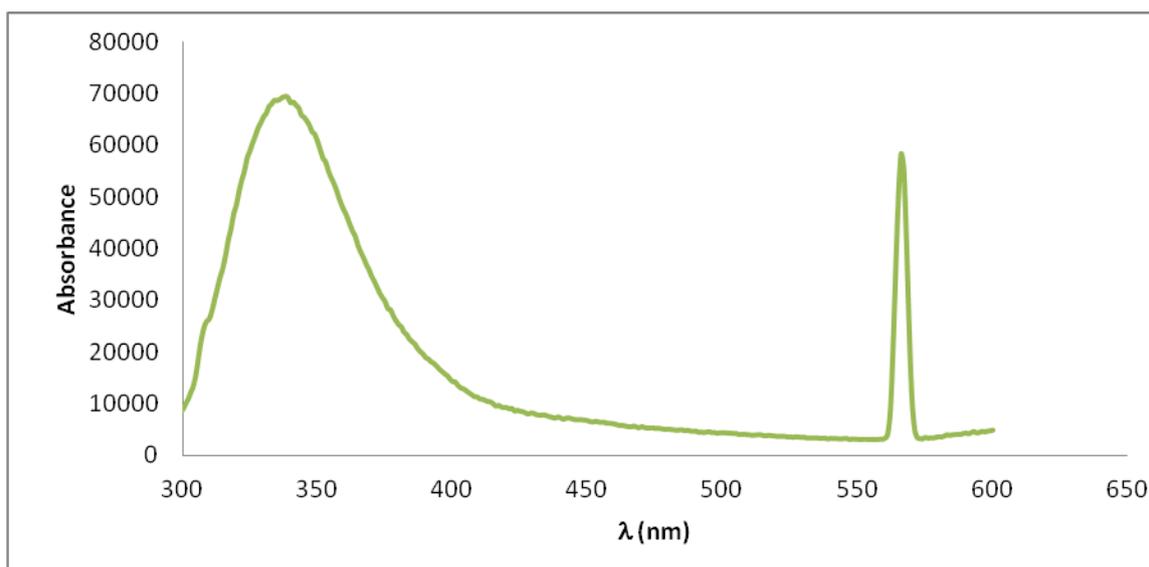


Figure III. 4 Fluorescence de l'extrait obtenu à 100 bar et à 40°C (E4)

D'après cette courbe, on peut conclure :

- Détection et identification de deux familles d'antioxydants dans les extraits (figure.III.4).
- Correspondance et corrélation entre ces résultats et les résultats obtenus dans le tableau III.8 (pic à 570 nm indique la présence des caroténoïdes).
- Nécessité d'autres techniques de pointe pour l'identification et la quantification des espèces antioxydantes d'où l'analyse par HPLC.

Les analyses ont été adaptées des travaux de Quaglia et al. ,1998 et menées suivant le système du tableau III.7. Les solvants sont utilisés selon deux modes :

Mode isocratique : H₂O (acidifiée à pH 2.6 à 10% H₃PO₄) et de l'acétonitrile dans un rapport de 62 :38 (vol : vol).

Mode gradient : Système B : Solvant A : H₂O acidifiée à pH 2.3 à 10% H₃PO₄ ; Solvant B : acétonitrile ; Solvant C : méthanol (débit d'injection de 1 ml min⁻¹).

L'analyse de séparation a été conduite en suivant le gradient de l'éluant du tableau III.7.

Temps (min)	% solvant A	% solvant B	% solvant C
0,0	63	15	22
7,5	63	15	22
8,5	40	20	40
15,0	40	20	40

Tableau III. 7 Conditions d'éluant

Les conditions de détecteur à barrettes de diodes sont : $\lambda = 330$ nm, Taux d'acquisition de spectres= 1600 ms, largeur de bande spectrale pour chaque canal 4 nm.

Toutes les analyses ont été effectuées à température ambiante. Les solutions standards ont été préparées à partir des trois flavonolignanes (Silybine 97.1% ; silychristine 82.2% et silydianine 93.2%) (ChromaDex, France).

Les solutions opératoires ont été préparées en diluant la solution standard avec du méthanol à une concentration de 0,25 mg/ml. La courbe de calibration de la silybine, de la silychristine et de la silydianine est représentée dans Annexe 4 (page175).

II.3. Résultats et discussion

D'après les travaux de Master (Ben Rahal, 2008) , le dosage des antioxydants de la graine et des huiles extraites ont permis de donner une idée générale sur la composition en polyphénols et en caroténoïdes.

Les polyphénols ont été dosés en se basant sur le méthode de Singleton et Rossi, 1965 à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu ; le dosage des caroténoïdes a été suivi selon la procédure de Roussef et al., (1984) .

Dosage des antioxydants	Graine	Huile
Taux de polyphénols(%)	7,9 et 9,2	1,1
Teneurs en polyphénols (mg /g EAG)	14,7 ±0,9	nd
Teneurs en caroténoïdes (mgEβ C100g⁻¹ de MS)	1,9±1,2	13,4±0,7

Tableau III. 8 Dosage des antioxydants (Ben Rahal, 2008)

II.3.1. Identification des flavonolignanes

L'analyse chromatographie a permis de détecter et d'identifier les différents flavonlignanes caractéristiques de la graine et de l'extrait de graines.

Il n'a pas été possible de séparer les pics de différents standards en mode isocratique. La superposition de pics de la taxifoline et de la silychristine rend la quantification qui est une étape nécessaire dans ce type d'analyse impossible.

Dans l'objectif de valoriser les extraits de la graine obtenus aussi bien par solvants organiques et surtout par CO₂ supercritique en antioxydants caractéristiques de la plante, la méthode de Quaglia et al. ,1998 a été améliorée et adaptée au matériel et à l'appareillage disponible au laboratoire. Ainsi seulement le mode gradient a été pris en considération pour l'étude qualitative et quantitative. La phase stationnaire du mode gradient a été choisie dans le

but de séparer un mélange de SBN, SCN, de SDN, et de TXF dont les temps de rétention sont consignés dans le tableau III.9.

Standards	Temps de rétention (min)
Taxifoline	6,44
Silychristine	8,78
Silydianine	9,60
Silybine	12,25

Tableau III. 9 Temps de rétention des standards dans les conditions HPLC

La figure III.5 représente le chromatogramme de l'extrait E4. L'utilisation de la phase stationnaire retenue n'a pas permis la séparation des deux diastereoisomères de la SBN.

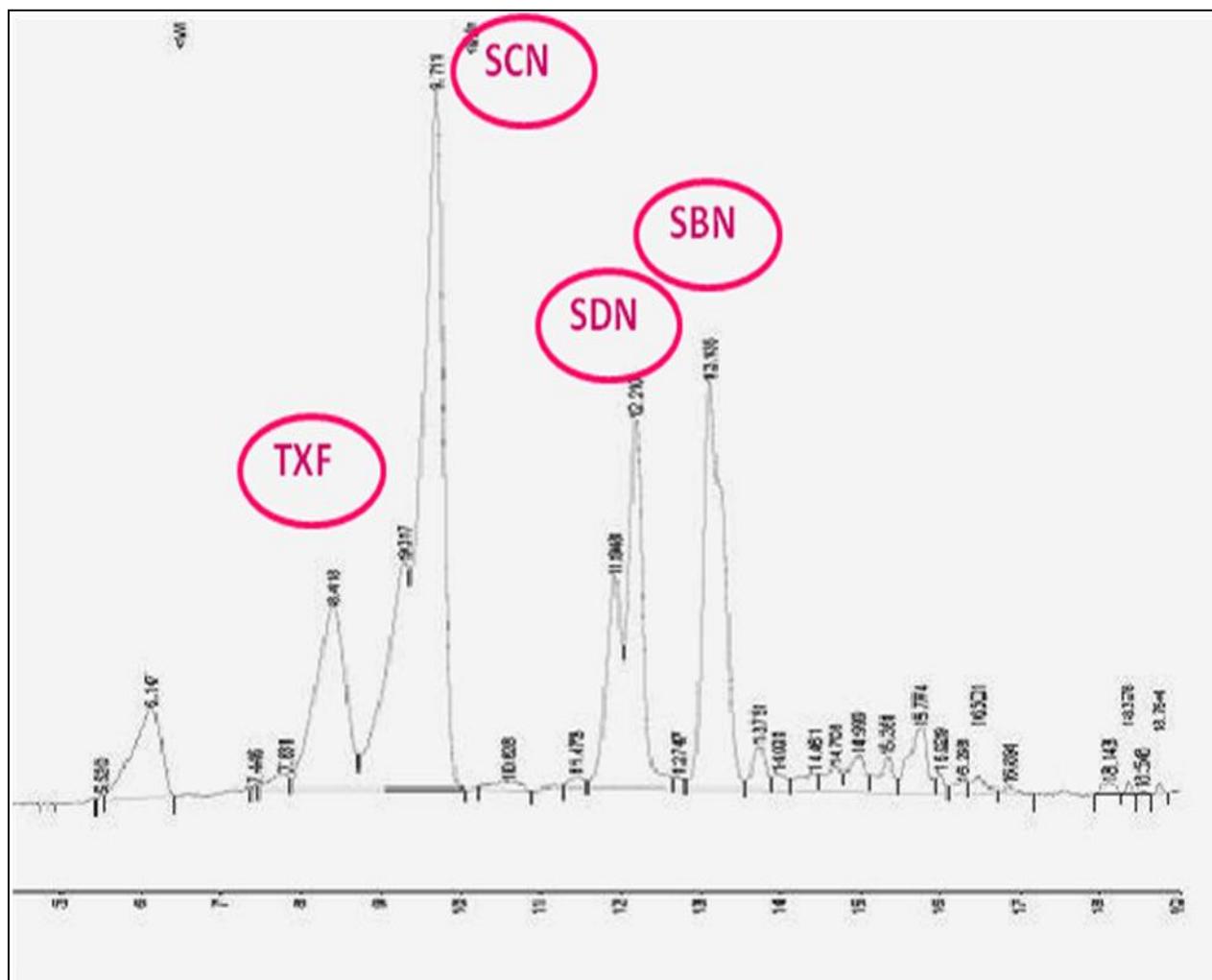


Figure III. 5 Chromatogramme de l'extrait E4 obtenu par HPLC

II.3.2. Quantification des flavonolignanes

Nous avons sélectionné les meilleures conditions chromatographiques pour la quantification des flavonolignanes dans les échantillons obtenus par extraction par solvant organiques (E1 à E3) (tableau III.10), par CO₂ supercritique avec co-solvant (E4 à E33) (tableau III.11). L'analyse des échantillons obtenus avec CO₂-SC sans co-solvant (éthanol) n'a donné que des pics négligeables.

Echantillon	SCN		SDN		SBN		Total	
	µg/ml d'huile	mg/g de MS						
E1	22,31	17,18	62,19	20,03	56,48	18,19	140,98	45,40
E2	27,95	19,00	51,49	16,58	48,72	15,69	128,16	41,27
E3	23,11	17,44	44,14	14,21	50,26	16,18	117,51	37,83

Tableau III. 10 Composition en flavonolignanes des extraits obtenus par solvants organiques (MS : graines en matière sèche)

L'hexane a permis d'extraire le taux le plus élevée à la fois de silydianine (20,03 mg/g) et de silybine (18,19 mg/g) alors que le chloroforme a permis d'extraire le taux le plus élevé en silychristine (19.00mg/g). Ces valeurs peuvent donner des informations pour une meilleure sélectivité des molécules à extraire.

Echantillon	SCN		SDN		SBN		Total	
	µg/ml d'huile	mg/g de MS						
E4	59,22	29,07	53,71	17,29	43,12	13,88	156,05	50,24
E5	39,83	22,83	74,26	23,91	72,12	23,22	186,21	59,96
E6	32,15	20,35	103,35	33,28	113,02	36,39	248,52	80,02
E7	29,59	19,53	43,36	13,96	47,14	15,18	120,09	38,67
E8	24,49	17,89	57,91	18,65	42,84	13,79	125,24	40,33
E9	60,86	29,60	107,78	34,71	109,17	35,15	277,81	89,46
E10	25,22	18,12	54,19	17,45	40,18	12,94	119,59	38,51
E11	33,58	20,81	78,11	25,15	60,97	19,63	172,66	55,59
E12	47,65	25,34	106,74	34,37	62,86	20,24	217,25	69,95
E13	33,55	20,80	51,56	16,60	53,30	17,16	138,41	44,56
E14	23,56	17,59	113,33	36,49	123,70	39,83	260,59	83,91
E15	17,73	15,71	40,82	13,14	47,51	15,30	106,06	34,15
E16	21,45	16,91	95,11	30,63	59,84	19,27	176,40	56,81
E17	49,12	25,82	96,48	31,07	100,80	32,46	246,40	79,35
E18	46,13	24,85	99,16	31,93	74,35	23,94	219,64	70,72
E19	52,48	26,90	111,89	36,03	94,34	30,38	258,71	83,31
E20	49,78	26,03	106,61	34,33	118,16	38,05	274,55	88,41
E21	42,15	23,57	97,82	31,50	104,47	33,64	244,44	78,71
E22	39,45	22,70	68,14	21,94	42,10	13,56	149,69	48,20
E23	41,64	23,41	102,56	33,02	55,13	17,75	199,33	64,18
E24	69,45	32,36	116,33	37,46	132,26	42,59	318,04	102,41
E25	49,13	25,82	105,86	34,09	122,19	39,35	277,18	89,26
E26	66,75	31,49	111,43	35,88	108,88	35,06	287,06	92,43
E27	52,29	26,84	88,34	28,45	87,59	28,20	228,22	73,49
E28	56,44	28,17	91,99	29,62	70,67	22,76	219,10	70,55
E29	68,22	31,97	120,71	38,87	142,59	45,91	331,52	106,75
E30	60,43	29,46	102,33	32,95	133,68	43,04	296,44	95,45
E31	61,12	29,68	96,53	31,08	127,94	41,20	285,59	91,96
E32	57,55	28,53	100,01	32,20	91,46	29,45	249,02	80,18
E33	59,48	29,15	99,76	32,12	49,78	16,03	209,02	67,30

Tableau III. 11 Composition en flavonolignanes des extraits par CO₂-SC (avec co-solvant)

L'extraction par l'éther de pétrole donne des valeurs moyennes des différentes flavonolignanes par contre quantitativement reflète des concentrations plus élevées que celles retrouvées par Quaglia et al. ,1998 (tableau III.12.) . Cette différence peut être expliquée par l'origine de la plante (non mentionnée dans ces travaux).

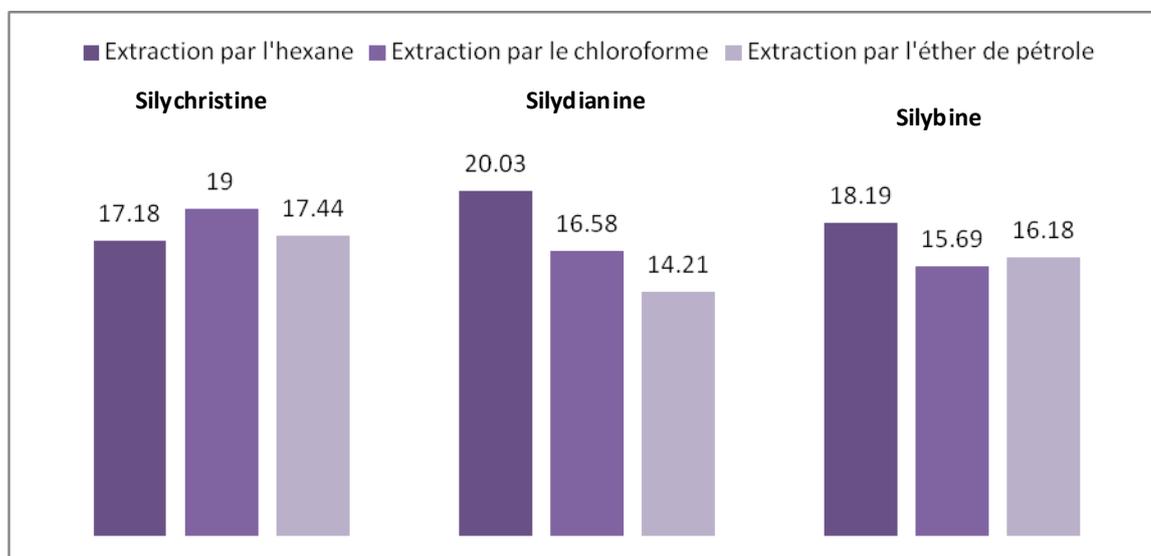


Figure III. 6 Teneurs en flavonlignanes (%) des échantillons extraits par solvants organiques

La recherche des conditions optimums d'extraction par CO₂-SC des flavonolignanes est un domaine d'exploration très intéressant. Ces flavanolignanes du complexe silymarine (silybine, silychristine et silydianine) sont un modèle de flavonoïdes polaires et de poids moléculaire élevé, plus volumineux que celui des aglycones flavoniques simples comme la taxifoline et permettent une première approche pour approfondir l'étude possibilités de l'analyse des flavonoides plus polaires et complexes (Perrut, 2003).

La première difficulté rencontrée est la superposition du pic de la taxifoline sur les pics des autres composés due à sa structure chimique (figure III.3) avec un système se limitant à l'eau comme solvant A et au méthanol comme solvant B. Mais l'ajout de l'acétonitrile a permis de séparer les pics pour une meilleure résolution du chromatogramme et par conséquent une quantification précise.

Les travaux de Quaglia et al.,(1998), dont la méthode chromatographique est la même que celle adoptée dans nos analyses, montrent des valeurs inférieures à celles obtenues pour tous les flavonoïdes étudiés, cette différence est peut être due à la technique d'extraction pour tous les échantillons et à l'origine des plantes utilisées .

Martin et al. ,2006 ont étudié la variation de cette composition en fonction d'une part du pays de récolte (Allemagne et Nouvelles Zélande) de la période du semis de la graine, la partie de la plante, la période de récolte, la sélection des plants selon l'écotype.

Flavonolignanes (mg/g de graines)		TXF	SCR	SDN	SBN
Résultats de Quaglia et al. ,1998	Echantillon a	3,3	6,6	7,5	11,6
	Echantillon b	3,55	6,9	8,1	13
	Echantillon c	0,11	0,47	0,5	1,68
	Echantillon d	0,08	0,52	ND	1,43
Résultats de Subramaniam et al. , 2007	Echantillon e		3,12	19,1	23,15

Echantillon a et b : obtenus par extraction avec soxhlet avec l'éther de pétrole (4h) et avec le méthanol (5h×2) de deux différents lots de graines de Silybum marianum

Echantillon c : obtenus d'un lot de silymarine en tablettes pour des préparations pharmaceutiques (lot 60830)

Echantillon d : obtenus d'un lot de silymarine en tablettes pour des préparations pharmaceutiques (lot 30413)

Echantillon e : obtenus par prétraitement des graines par une solution à 1.5% H₂ SO₄ (v/v)

Tableau III. 12 Tableau comparatif des compositions en flavonolignanes

La différence de composition est notable (18 g /kg de silymarine de graines poussant en Nouvelles Zélande contre seulement 6g /kg de silymarine de graines poussant en Allemagne : entre ces deux environnements de la plante prouve cette répartition est fortement influencée par les conditions climatiques et le type de sol dans lesquels poussent le végétal.

Influence de la température d'extraction sur la composition en flavonolignanes

La figure III.7 représente les taux de flavonolignanes analysés dans les échantillons à différentes pressions et à 40°C, les figures de l'annexe 6 (page 187) illustrent les taux de flavonolignanes à 50, 60, 70 et 80°C.

A 40°C, le maximum des concentrations en flavonolignanes (figure III.7) a été analysé à différentes pressions. Cette température fait l'objet de nombreuses observations.

Les travaux de Reverchon et De Marco 2006 ont conduit à des conclusions générales sur les paramètres en fonction des matrices végétales, la principale d'entre elles est que le choix des conditions d'extraction dépend de la famille des composés ou composé spécifique à extraire. Ainsi le poids moléculaire et la polarité doivent être pris en considération; mais quelques règles générales peuvent être appliquées.

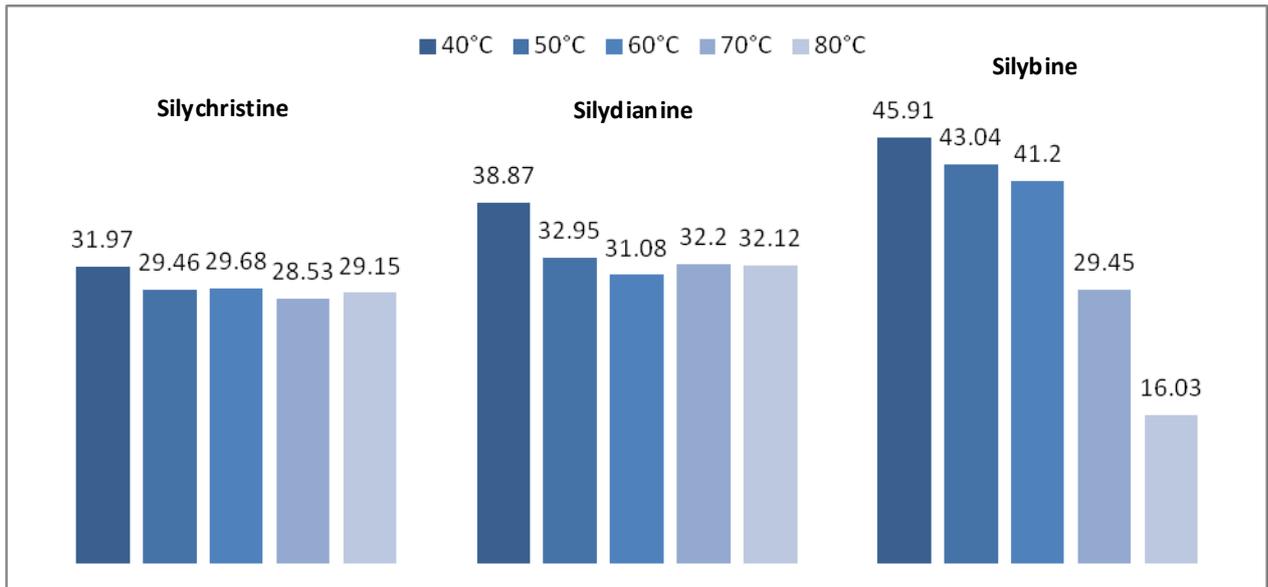


Figure III. 7 Composition des extraits en flavonolignanes exprimées en g/g d'extraits en fonction des températures à 220 bar

La température du fluide supercritique pour extraire les composés thermolabiles doit être fixe entre 35 et 60°C ; par exemple, à proximité du point critique et aussi bas que possible afin d'éviter leur dégradation. L'augmentation de la température réduit la densité de CO₂ supercritique (pour une pression fixe) réduisant de ce fait la puissance dissolvante du CO₂ supercritique; mais il augmente la pression de vapeur des composés à extraire. Par conséquent, la tendance de ces composés de passer dans la phase liquide est accru.

Influence de la pression d'extraction sur la composition en flavonolignanes

La figure III.8 représente les taux de flavonolignanes analysés dans les échantillons à différentes températures et à 220 bars, les figures de l'annexe 6 illustrent les les taux de flavonolignanes à 100, 120, 140,160 et 180 bar.

A 220 bar, le maximum des concentrations en flavonolignanes (figure III.8) a été extrait à différentes températures.

La pression et la température d'extraction sont les paramètres d'expérimentation les plus appropriés employés pour mettre en évidence la sélectivité des fluides supercritiques.

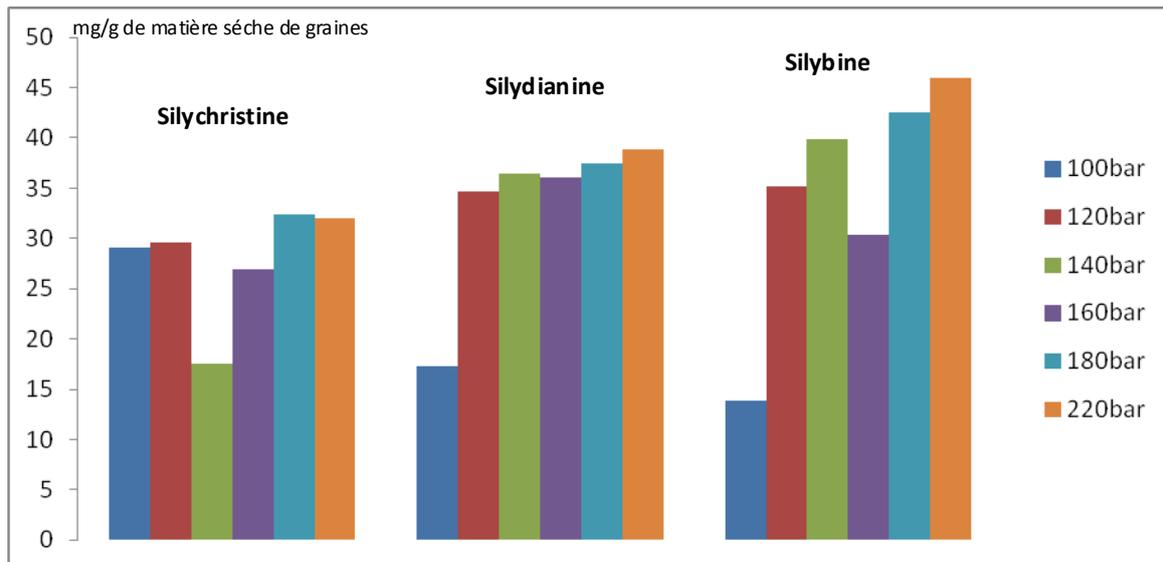


Figure III. 8 Composition en flavonolignanes en fonction des pressions à 40°C

• **Conclusion**

La découverte de nouveaux composés actifs qui ont fait l’objet d’une très basse solubilité dans des matrices biologiques et l’industrie pharmaceutique relève un défi important pour trouver des moyens de formuler et d’extraire de tels composés dans l’ordre pour atteindre une disponibilité biologique appréciable (Liu, 2000).

En conclusion, nous avons mis en place des techniques analytiques basées sur la chromatographie afin de déterminer les principales molécules bioactives dans les extraits huileux des graines de *Silybum marianum*.

Nous avons pu déterminer que les paramètres de température et de pression permettent d’extraire les principaux acides gras et flavonoïdes des graines de chardon Marie. Ainsi nous avons pu opter pour l’extrait qui est composé des concentrations les plus élevées en composés actifs, cet extrait est obtenu à 220 bar et à 40°C et est composé :

D’acides gras { 65.22 % d’acide linoléique ω6
27.01% d’acide oléique ω9
12.12 % d’acide palmitique

De flavonolignanes { 68.22 µg/ml de silychristine
120.71 µg/ml de silydianine
142 µg/ml de silybine

Cet extrait pourrait faire l'objet de l'étude de l'activité antioxydante et cytotoxique afin de valoriser l'extraction des principes actifs par CO₂-SC dans le domaine pharmaceutique et médicale ; ceci constituera l'un des objectifs du chapitre suivant.

Références

- Adams RP. Identification of Essential oils by Gas Chromatography Quadrupole Mass Spectrometry. (2001) *Allured Publishing Corpoartion, Carol Stream, USA*.
- Ben Rahal N. Etude des molécules bioactives de la graine de *Silybum Marianum*. Caractérisation et analyse des extraits huileux. (2008) *Mastère en Substances Naturelles Thérapeutiques actives (Biochimie)*. Faculté des sciences de Bizerte.
- Burr GO., Burr MM. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. (1929) *J. Biol. Chem*, 82, 345-367.
- Cacho M., M. Mora'n, J. Ferná'ndez-Ta'rrago, P. Corchete, Calcium restriction induces cardenolide accumulation in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. (1995) *Plant Cell Reports*, 14, 786–789.
- Cheikh-Rouhou S., Besbes S., Hentati B., Blecker C., Deroanne C., Attia H. *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. (2007) *Food Chemistry*, 101 673–681.
- Christie WW. Gas Chromatography and Lipids. (1989) *Oily Press Ltd*.
- Daniel A., Renaud N., Patrick R., Fabrice L. Water soluble phenolics derivatives with dermocosmetic and therapeutic applications. (2006) *European Patent*, EP1867729.
- Dubois M., Gilles K.A., Rebers P.A., Hamilton J.K., Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. (1956) *Anal. Chem*, 28, 356.
- El-Mallah MH., Safinaz M., El-Shami M., Hassanein M. Detailed studies on some lipids of *Silybum marianum* (L.) seed oil. (2003) *Grasas y Aceites*. 54. Fasc4, 397-402.
- Hadolin M., Skerget M., Knez Z., Bauman D. High pressure extraction of vitamin E-rich oil from *Silybum marianum*. (2001) *Food Chemistry Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section*, 74, 355–364.
- Hagendoorn MJM., Wagner AM., Segers G., Plas van der LHW., Oostdam A., van Walraven HS . Cytoplasmic acidification and secondary metabolite production in different plant cell suspensions. (1994) *Plant Physiol*. 106 723–730.
- Herbal Gram. <http://www.herbalgram.org/herbalgram/articleview> (accessed 08.08.06).
- Krecman ., Skottova N., Walterova D., Ulrichova J., Simanek, V. Silymarin inhibits the development of diet-induced hypercholesterolemia in rats. (1998) *Planta Med*. 64, 138–142.

- Landolfi R., Mower RL., Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure–activity relations. (1984) *Biochemical Pharmacology*, 33, 1525–1530.
- Li F., Liuqing Y., Ting Z., Jiangli Z., Yanmin Zou., Ye Z., Xiangyang W. Optimization of enzymatic pretreatment for n-hexane extraction of oil from *Silybum marianum* seeds using response surface methodology (2011) *Food and bioproducts processing*, 90, 87–94.
- Martin RJ., Lauren DR., Smith WA., Jensen DJ., Deo B., Douglas JA. Factors influencing silymarin content and composition in variegated thistle (*Silybum marianum*). (2006) *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 34, 239–245.
- Maurin R., Fellat-Zarrouk K., Ksir M. Posionnel analysis and determination of triacylglycerol. (1992) *Journal of the American oil chemist's society*, 141-145.
- Morazzoni P., Bombardelli E. *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). (1995) *Fitoterapia*, 66, 3–42.
- Perrut M. Supercritical fluids applications in the pharmaceutical industry. (2003) *STP Pharma Sci*, 13(2), 83-91.
- Quaglia M.G., Bossu E., Donati E., Mazzanti G., Brandt A. Determination of silymarine in the extract from the dried *silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. (1999) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19, 435–442.
- Qifan Y., Sihong W., Jimxi N., Shanyu L., Xuebao D. Analysis of Fatty Acids in *Silybum marianum* Oil by GC-MS. (1998) *Ziran Kexueban*, 24, 26-28.
- Radi N. L'arganier arbre du sud ouest marocain en péril à protéger. (2003) *Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie*.
- Ramadan MF, Morsel JT. Screening of the antiradical action of vegetable oils. (2006) *J. Food Comp. Anal*, 19, 838–842.
- Reverchon E. De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. (2006) *J. of Supercritical Fluids*, 38, 146 – 166.
- Rouseff RL., Martin SF., Youtsey CO. Quantitative Survey of Narirutin, Naringin, Hesperidin, and Neohesperidin in Citrus. (1987) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35 (6), 1027-1030.
- Saller R. *Phytotherapie*. 1995 Haug, Heidelberg, 267-274.

- Shiko A N., Pozharitskaya O N., Miroshnyk I., Mirzab S., Urakova I N., Hirsjavi S. Nanodispersions of taxifolin: Impact of solid-state properties on dissolution behavior. (2009) *International Journal of Pharmaceutics*, 377, 148–152.
- Singleton VL. , Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. (1965) *Am J Enol Vitic*, 16,,144-158.
- Trost W. , Halbach G., Anti-phalloidine and anti-a-amanite action of silybin in comparison with compounds similar to structural parts of silybin. (1978) *Experientia* ,34,1051–1052.
- Tzen, S H., Ko W., Ko F., Teng,C. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. (1991) *Thrombosis Research*, 64, 91–100.
- Valenzuela A., Guerra R., Videla LA. Antioxidant properties of the flavonoids silybin and cyanidanol-3: comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. (1986) *Planta Med*, 52 ,438–440.
- Vega-Villa K R., Remsberg CM., Ohgami Y., Yán' ez JA., Takemoto JK., Andrews PK., Stereospecific high-performance liquid chromatography of taxifolin, applications in pharmacokinetics, and determination in tu fu ling (*Rhizoma smilacis glabrae*) and apple (*Malus×domestica*). (2009) *Biomedical Chromatography*, 23, 638–646
- Wallace S., Carrier, DJ. , Beitle R., Clausen E., Griffis C. HPLC-UV and LC–MS–MS characterization of silymarin in milk thistle seeds and corresponding products. (2003) *JNFMF* 4, 37–38.
- Yin Q., Wang S., Nan J.,Li S. The fatty acid compositions of *Silybum marianum* by GC–MS. (1998). *J. YanbianUniv.(Natural Science)*, 24, 26–28.

Chapitre IV

Introduction

Depuis quelques années, la nécessité et l'intérêt porté à l'étude de l'activité biologique dans les aliments (fruits, légumes et épices...) et dans les végétaux est de plus en plus important et de ce fait l'extraction et l'étude des composés actifs ne cessent d'augmenter surtout dans les industries pharmaceutiques. La littérature mentionne plusieurs méthodes d'évaluation de l'activité biologique qui dépend des structures chimiques des molécules à étudier.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à :

- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante par deux tests (Test DPPH et ABTS)
- ✓ La détermination de l'activité cytotoxique sur des cellules cancéreuses du colon (Caco-2) des flavonolignanes présents dans les extraits obtenus par extraction par solvants organiques et par CO₂-SC.

I. Mesure de l'activité antioxydante

I.1. Introduction

Il existe différentes méthodes qui permettent la détermination du pouvoir antiradicalaire *in vitro* dans les composés purs ou dans les extraits de plantes contenant des antioxydants ayant un effet préventif contre les espèces oxygénées réactives (ROS) à rôle néfaste et responsable de plusieurs processus pathologiques. Ces méthodes sont essentiellement basées sur la mesure d'une propriété physico-chimique dépendant de la concentration d'une espèce ou d'un constituant mis en jeu lors du dosage. La spectroscopie UV est la plus utilisée des techniques et a été mise au point par Miller et al. (1966). Le seul inconvénient de ces méthodes est qu'il est difficile de comparer l'efficacité des différents antioxydants en fonction des méthodes appliquées puisqu'elles sont très éloignées les unes des autres et des conditions naturelles dans lesquelles cette activité biologique s'exerce.

Puisque les processus d'oxydation sont assez complexes, une seule méthode ne permet pas de refléter le profil antioxydant d'un échantillon, d'où la nécessité d'effectuer différents tests de mesure du pouvoir antioxydant.

Donc dans cette partie, en fonction du radical étudié et de ses spécificités, nous allons décrire et expérimenter les tests les plus couramment utilisés qui sont ceux qui mettent en jeu les radicaux de substitution :

- DPPH° : 2,2-diphényl-1picrylhydrazyle
- ABTS^{•+} : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

Les méthodes utilisant les radicaux DPPH et ABTS sont couramment utilisées pour analyser les extraits de plantes, de fruits et des légumes. Ce sont des techniques éprouvées qui une fois standardisées permettent de comparer des résultats obtenus.

I. 2.Généralités sur le pouvoir antioxydant

I. 2.1.Principe de la mesure du pouvoir antiradicalaire par le radical DPPH°

Le radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyl (DPPH°), fut l'un des premiers radicaux utilisés pour étudier la relation structure / activité antioxydante des composés phénoliques (Brand-Williams et al. ,1995). Le (DPPH°) est un radical stable, coloré et centré sur l'azote disponible, commercialement sous la forme d'un solide (Blois, 1958) (figure IV.1).

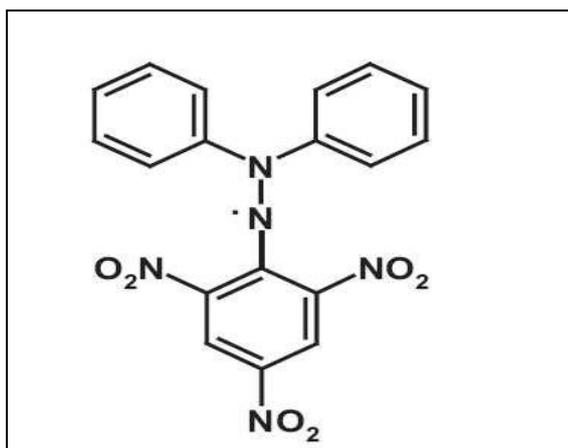


Figure IV. 1 Structure du radical stable DPPH

Lorsqu'il est mis en solution dans le méthanol ou l'éthanol, son maximum d'absorption se situe vers 515 nm (figure IV.2) avec un coefficient d'extinction molaire ϵ ($\lambda=515$ nm) = 11240 L.mo Γ^1 .cm $^{-1}$ (Blois, 1958).

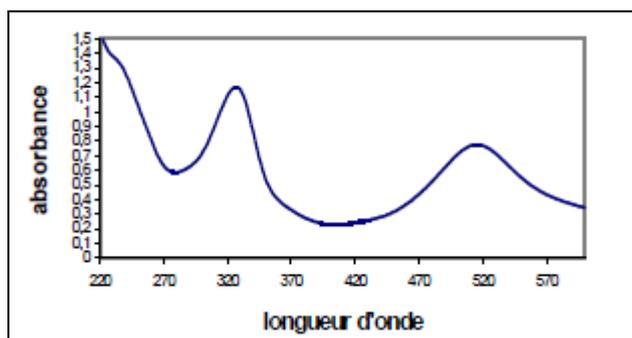


Figure IV. 2 Spectre d'absorption du radical DPPH dans le méthanol $C=1,013.10^{-4}$ mol L^{-1} ($T=25,0\pm 0.2^{\circ}C$) (Dangles et al., 1999)

Ce radical libre en solution réagit par arrachement d'un hydrogène mobile. Cette réduction du DPPH par un donneur d'atome H (RH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore (DPPH-H) qui n'absorbe plus à 517nm dans l'éthanol en radical R (Dangles et al. ,1999).

Ce test antioxydant consiste donc à suivre la variation (décroissance) par spectroscopie visible de la bande d'absorbance à 517 nm. Le nombre de radicaux libres consommés par une molécule d'antioxydant est calculé après établissement de l'état stationnaire de la réaction (Bandoniene et al. ,2002).

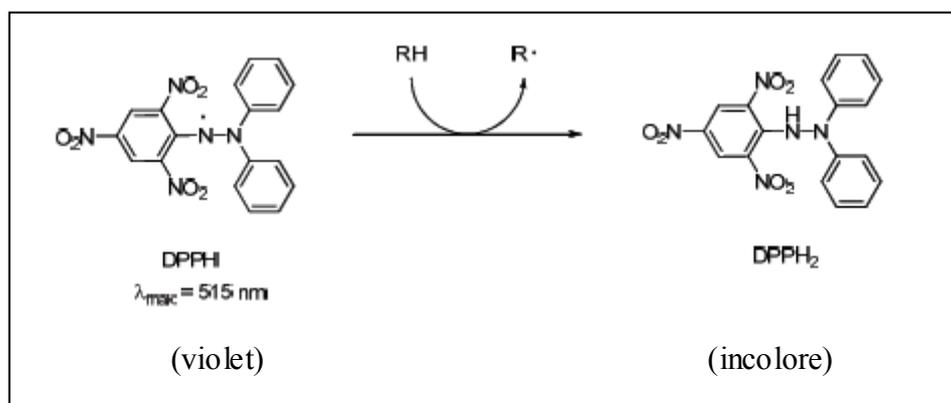


Figure IV. 3 Schéma de réaction du DPPH

Cette méthode d'évaluation du pouvoir antioxydant est simple, rapide et facile à mettre en œuvre permettant de comparer un grand nombre de composés. Brand-Williams et ses collaborateurs (Brand-Williams et al. ,1995) ont montré que certains composés phénoliques réagissent avec le DPPH selon divers mécanismes et différentes cinétiques. D'autre part Bondet et ses collaborateurs (Bondet et al. ,1997) ont montré que certains composés polyphénoliques peuvent réagir très lentement avec le radical DPPH. Cette

disparité de comportement cinétique impose d'établir des règles très strictes afin de pouvoir comparer les pouvoirs antioxydants de chacun des composés (figure IV.4).

Molyneux (2004) a donc décrit les conditions de réalisation de ce test :

- le volume de la réaction doit être compris entre 2 et 4 mL.
- le solvant peut être le méthanol ou l'éthanol.
- il n'y a pas de conditions de pH strictement définies.
- la concentration en DPPH[•] doit être comprise entre 50 et 200 μ M afin d'avoir une absorbance inférieure à 1 (classiquement aux alentours de 180 μ M).
- l'absorbance est mesurée à 518 nm.
- la durée totale de réaction est généralement fixée à 60 minutes

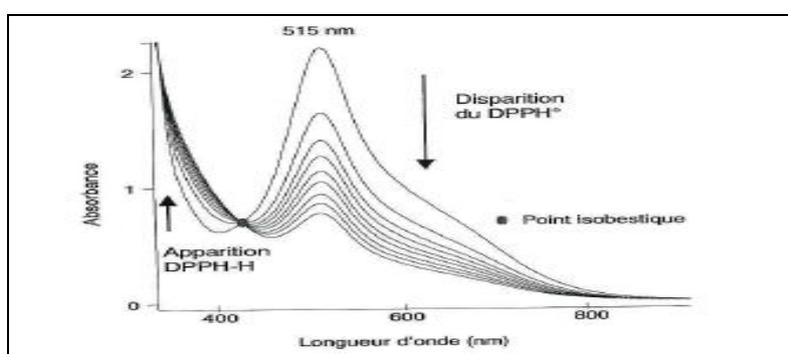


Figure IV. 4 Evolution du spectre du DPPH lors de sa réduction par l'acide dihydrocaféique (Roche et al.,2005).

I. 2.2. Principe de la Mesure du pouvoir antiradicalaire par le radical ABTS^{o+}

Le radical cation de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) est stable sous sa forme libre.

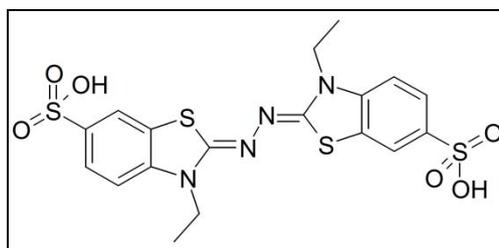


Figure IV. 5 Structure chimique de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ABTS

Ce radical est facilement formé à partir de l'acide correspondant (2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) ou ABTS^{•+} par oxydation en présence de persulfate de

potassium (Re et al., 1999). Le coefficient d'absorption molaire de l'ABTS à 734 nm est $\epsilon_{734} = 15\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

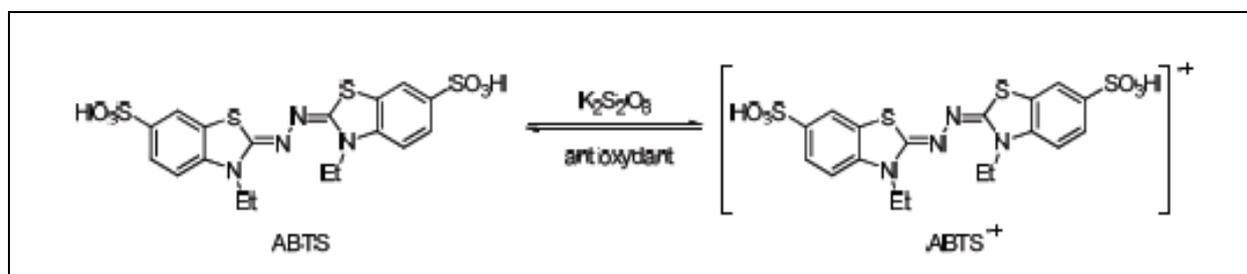


Figure IV. 6 Schéma de la réaction de l'ABTS avec l'antioxydant

Dans la figure IV.7 sont représentés les spectres d'absorption de l'ABTS et de son radical-cation ABTS^{•+} de concentration $1,25 \cdot 10^{-4}\text{ M}$, dans l'eau.

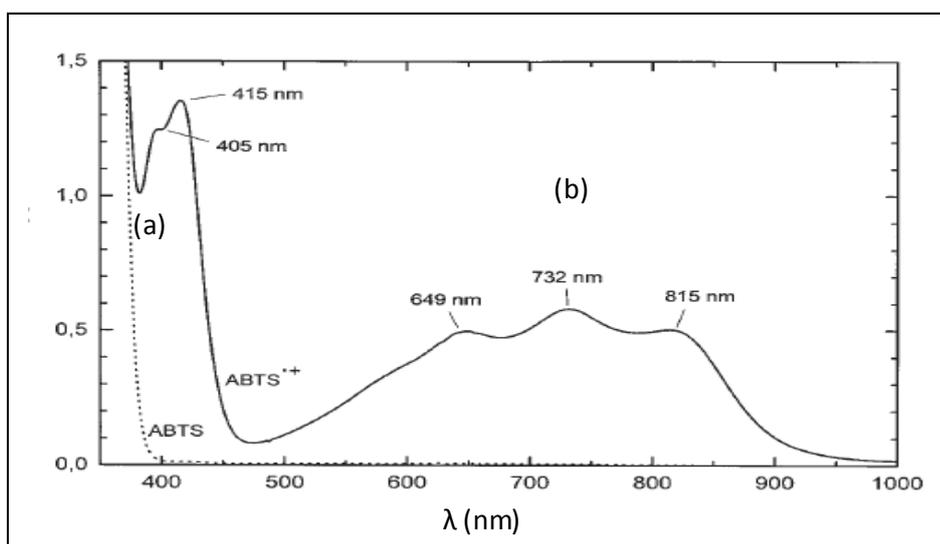


Figure IV. 7 Spectres d'absorption de (a) l'ABTS et de son radical-cation (b) ABTS^{•+} ($1,25 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ dans l'eau) (Pinkernell et al., 1997)

Ce test est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cation ABTS^{•+}, (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique) (Figure IV.8), qui présente un spectre d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm. Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le dioxyde de manganèse (Mille et al., 1996), la metmyoglobine (Mille et al., 1995), le peroxyde d'oxygène (Cano et al., 2002) ou le persulfate de potassium (Re et al., 1999). Le composé à tester est ajouté au radical préformé, l'absorbance résiduelle du radical ABTS^{•+} est mesurée à 734 nm après 1, 4 ou 6 minute(s). C'est une méthode colorimétrique qui consiste en un essai de décoloration afin de détecter le pouvoir antiradicalaire d'un composé donné. La formation de l'ABTS^{•+} se traduit par l'apparition

d'une coloration vert bleu intense. La disparition de cette couleur est un indice du passage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ à sa forme non radicalaire en présence d'un donneur H^{\bullet} . Cette décoloration est mesurée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 734nm.

En présence de Trolox ou acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchroman-2-carboxylique (témoin positif de référence, dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E, figure IV.8), le radical d'azote concerné piège un H^{\bullet} , conduisant à l' ABTSH^+ , ce qui entraîne la décoloration de la solution.

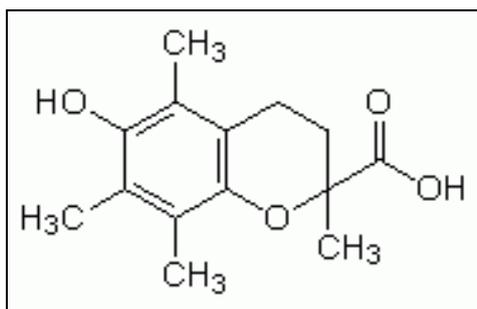


Figure IV. 8 Structure de acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchroman-2-carboxylique

Ce radical est utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant de fluides biologiques, de mélanges complexes ou de composés purs. Il est capable de réagir avec des antioxydants classiques de type phénols et thiols, mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (Rice-Evans et Miller, 1994).

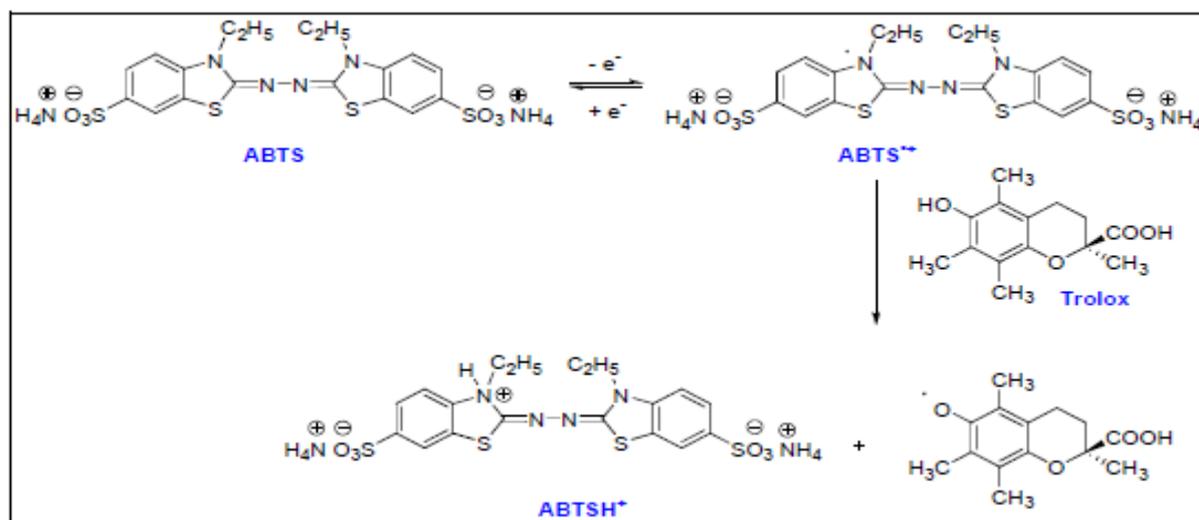


Figure IV. 9 Formation et piégeage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ par un antioxydant donneur de H^{\bullet} (Rice-Evans et Miller, 1994)

Ce radical est caractérisé par un spectre UV avec des maximums d'absorbance à 416, 650 et 734 nm ce qui permet de dire que le test avec $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est plus recommandé que le test DPPH car on peut interpréter les résultats sur la bande 734 ou 815nm, n'interférant plus avec

celle du composé testé. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cation entraîne sa réduction et une diminution de l'absorbance à 734 nm. Cette diminution dépend de l'activité antioxydante du composé testé mais souvent aussi du temps et de la concentration (Re et al., 1999).

L'activité des composés est alors exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la capacité antioxydante d'une solution de Trolox® (1 mM) (analogue hydrophile de la vitamine E). Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace (Schlesier et al., 2002).

Une comparaison entre ces deux tests est résumée dans le tableau IV.1.

Test	Solvant	Conditions	Mesure, Quantification	Antioxydants testés	Références
DPPH	Méthanol	Obscurité	Décroissance du DPPH° à 515 nm EC ₅₀ ; 1/EC ₅₀ ; t(EC ₅₀)	Phénols, vins, diverses molécules...	Blois, 1958 Brand-Williams, 1995 Sanchez-Moreno, 1998 et 1999
ABTS	Milieu tampon phosphate, pH = 7,4	Initiateur : H ₂ O ₂ ou metmyoglobine	Décroissance de ABTS+° à 734 nm Référence : Trolox	Nombreux... Extraits de plantes, jus, vins...	Miller, 1993 Miller, 1995 Simonetti, 1997 Re, 1999

Tableau IV. 1 Tableau comparatif des tests DPPH et ABTS (Frankel et al., 2000 ; Prior et al., 2005)

I. 3. Etude expérimentale

I.3.1. Test DPPH

I. 3.1.1. Préparation de la solution de DPPH°

Le radical DPPH (C₁₈ H₁₂ N₅ O₆, Sigma, 90%) a été utilisé sans purification ultérieure. 2 mg du radical DPPH sont dissous dans 50 mL de méthanol (préalablement dégazé à l'argon), pour obtenir une solution de concentration d'environ 10⁻⁴ M (1,013 10⁻⁴ mol.L⁻¹). La solution rapidement préparée est conservée à + 4°C à l'abri de la lumière. La concentration analytique a été déterminée par une voie spectrophotométrique ($\epsilon_{515} = 12\,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), en plaçant 2 mL de la solution de DPPH dans une cuve en quartz. Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées au moyen d'un spectrophotomètre UV-Visible (Spectrophotomètre : UV-visible (SHIMADZU 1605) ; Cuve en quartz: HELLMA, de trajet optique l = 1 cm).

Le pouvoir antiradicalaire des extraits est évalué en suivant la disparition du radical DPPH[•] par spectroscopie d'absorption UV-visible à 515 nm en fonction du temps. Le nombre de radicaux libres consommés par molécule d'antioxydant est calculé après établissement de l'état stationnaire de la réaction. Une cinétique du radical DPPH[•] traduira également une activité antioxydante efficace.

Pour chaque test, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage du DPPH[•]. En effet pour chaque essai ; une nouvelle solution de DPPH[•] est préparée car ce radical évolue en solution au cours du temps. Il y a une perte d'absorption d'environ 5 % par semaine.

I. 3.1.2. Détermination de concentration de DPPH[•] par spectrophotométrie

La concentration de la solution de DPPH préparée, peut être déterminée par la loi de Beer Lambert :

$$[\text{DPPH}]_t = \frac{A_t^{515}}{l \times \epsilon^{515}}$$

$[\text{DPPH}]_t$: concentration en mol L⁻¹ du radical DPPH[•] dans le méthanol à un instant t .

ϵ_{515} : coefficient d'absorption molaire à 515 nm = 12 500 mol L⁻¹ cm⁻¹

l : trajet optique en cm

A_t^{515} : Absorbance de la solution de DPPH[•] à 515 nm.

A une prise d'essai de 2 mL de DPPH, on procède à des ajouts de 10 µL de l'antioxydant (extraits méthanoliques). Une agitation vigoureuse du mélange est rapidement effectuée suivie d'un enregistrement d'un spectre UV-visible.

I. 3.1.3. Détermination du pourcentage d'inhibition du DPPH[•] par l'antioxydant

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'antioxydant peut être calculé selon la formule accordée à Yen et Duth (1994) (Quian et al., 2004).

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

$\% I$: pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'antioxydant

A_0 : L'absorbance de la solution mère de DPPH sans antioxydants à $t = 0$ min

A_t : L'absorbance à l'établissement de l'équilibre de la solution de DPPH[•] après addition d'un volume d'antioxydant

A un volume V_1 d'une solution mère de DPPH, nous ajoutons un volume V_2 d'une solution d'antioxydant et nous suivons par spectrophotométrie d'absorption UV-vis à $\lambda = 515$ nm, la réduction du radical DPPH[•] coloré. La longueur d'onde (515 nm) est spécifique et aucun autre réactif ne doit absorber à cette longueur d'onde. L'absorbance A_t du mélange (solution mère de DPPH plus antioxydant) n'est prise qu'après établissement de l'état

stationnaire de la réaction. Le temps de la réaction varie selon la nature chimique de l'antioxydant, et dépend de son pouvoir antioxydant.

A une prise d'essai de 2 mL de la solution mère de DPPH, est ajouté un volume V de l'échantillon (extraits méthanoliques). Le mélange est rapidement agité puis la mesure de l'absorbance à $\lambda = 515$ nm est effectuée. L'absorbance est lue lorsque le mélange atteint un état d'équilibre dynamique. L'expérience est répétée pour des volumes croissants d'échantillons (2V, 3V...).

I. 3.1.4. Détermination du pourcentage de DPPH[•] restant

Le pourcentage de DPPH[•] restant après la réaction radicalaire conduite avec un volume V₂ d'antioxydant est déterminé par l'expression suivante :

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet}_{\text{res}} = \frac{A_{\infty}}{A_0} \times 100$$

A₀ : absorbance finale d'une solution témoin de DPPH[•]

A_∞ : absorbance d'une solution témoin de DPPH[•] en présence d'un volume v₂ d'antioxydant.

En présentant la courbe de pourcentage DPPH[•]_{res} en fonction du volume ajouté d'antioxydant, nous pouvons déterminer le CE₅₀ de chaque échantillon (concentration nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH[•]). Toutes les séries d'expériences ont été reproduites trois fois.

I. 3.2. Test ABTS

I. 3.2.1. Préparation de la solution d'ABTS

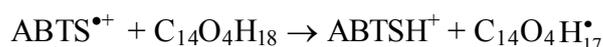
Une solution mère d'ABTS (C₁₈H₁₈N₄O₆S₄; 2NH₃, M = 514,62 g.mol⁻¹, Sigma Aldrich) et de une solution de trolox (C₁₄ O₄ H₁₈, Sigma Aldrich M = 250,3 g.mol⁻¹) ont été préparées par pesée au moyen d'une balance analytique (précision = ± 0,1 mg). 38,4 g d'ABTS sont dissous dans 10 mL d'eau en présence de persulfate de potassium (K₂S₂O₈, M = 270,33 g.mol⁻¹, Fluka) de manière à obtenir une concentration égale à 7.10⁻³ M. Le milieu réactionnel est laissé à l'équilibre pendant toute une nuit à l'abri de la lumière et à température ambiante. La solution est ensuite diluée dans de l'éthanol de qualité spectroscopique (EtOH) jusqu'à l'obtention d'une solution diluée dont l'absorbance à $\lambda = 734$ nm est A₀ ≈ 0,7 ± 0,2. La solution est alors conservée dans l'obscurité à une température de 30°C, de manière à éviter toute réaction photochimique qui pourrait favoriser la formation de radicaux libres ABTS^{+•}.

Une quantité de 15,62 mg de trolox (antioxydant de référence) sont dissous dans 25 mL d'éthanol (EtOH, $M = 46,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Merck $\geq 99\%$) afin d'obtenir une solution de concentration de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Une dilution en cascade de la solution du trolox a été réalisée (de $\frac{1}{4}$ à $\frac{1}{256}$) comme le montre le tableau IV.2.

Solutions	Concentration (mM)	Dilution	Volume de trolox (2,5 mM ; μL)	Volume d'éthanol (μL)
A $\frac{1}{2}$	1,25	$\frac{1}{2}$	500	500
A $\frac{1}{3}$	0,833	$\frac{1}{3}$	333	677
A $\frac{1}{4}$	0,625	$\frac{1}{4}$	250	750
A $\frac{1}{5}$	0,500	$\frac{1}{5}$	200	800

Tableau IV. 2 Dilution de la solution mère de trolox à 2,5 mM.

À 1 mL de solution diluée d'ABTS $^{\bullet+}$ ($A_0 \approx 0,70 \pm 0,2$) sont ajoutés 10 μL de solutions de trolox à différentes concentrations. La réaction est décrite par l'équation suivante :



I. 3.2.2. Mise en évidence de l'activité antiradicalaire

Expérience 1 : réaction d'ABTS et la solution mère de Trolox

Chacune des solutions diluées dans l'éthanol de Trolox, 10 μL sont prélevés et sont ajoutés à 1 mL de solution d'ABTS $^{\bullet+}$ dont l'absorbance à $\lambda = 734 \text{ nm}$ est A_0 a été ajustée à $0,7 \pm 0,2$. La réaction d'oxydation qui se traduit par la décoloration de la solution est suivie par spectrophotométrie à $\lambda = 734 \text{ nm}$ afin d'évaluer le temps nécessaire pour aboutir à l'équilibre réactionnel (Ribereau-Gayon, 1968).

Expérience 2 : réaction d'ABTS et les extraits éthanoliques

Des prises d'essais d'extraits éthanoliques de 10, 20, 30 et 40 μL dilués dans l'éthanol sont ajoutées respectivement à 990, 980, 970 et 960 μL de la solution d'ABTS. La mesure de l'absorbance à $\lambda = 734 \text{ nm}$ est réalisée après chaque 6 minutes.

La capacité des extraits éthanoliques à piéger des radicaux, est déterminée selon le test TEAC (Capacité Antioxydante en Equivalent Trolox).

I. 3.2.3. Détermination de la capacité antioxydante en équivalent trolox (TEAC)

Afin d'évaluer le pouvoir antiradicalaire des extraits éthanoliques, le pourcentage d'inhibition du radical ABTS $^{\bullet+}$ par la source antioxydante est calculé selon la formule suivante pour chacune des solutions considérées :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

A_0 : Absorbance initiale à $\lambda=734\text{nm}$ d'une solution d'ABTS

A_t : Absorbance à $\lambda=734\text{nm}$ du mélange (ABTS+extrait) après $t=6\text{min}$

Ce pourcentage d'inhibition est ensuite tracé en fonction des concentrations finales ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) des différents extraits ou de l'antioxydant de référence trolox. La capacité antioxydante en équivalent trolox (TEAC) correspond alors à la concentration molaire (mmol.L^{-1}) ou massique (mg.L^{-1}) de trolox ayant la même activité qu'une même concentration unitaire d'extrait à tester (Ribereau-Gayon, 1968).

I. 4. Résultats

Dans cette partie nous exposons et discuterons les résultats obtenus de l'étude de l'activité antioxydante des extraits alcooliques des graines de *Silybum marianum* naturelles (silymarine naturelle) , commerciales (silymarine commerciale) , des huiles obtenues par extraction classique (Soxhlet) par différents solvants (hexane, éthanol et chloroforme) et des extraits huileux obtenus par CO_2 supercritique à différentes températures pressions, diamètres moyens de particules et temps de contact, par les radicaux libres stables DPPH \bullet et ABTS \bullet .

I.4.1 Détermination du pouvoir antiradicalaire par DPPH \bullet

I. 4.1.1 Mise évidence du pouvoir antiradicalaire

Le DPPH présente un radical hydrogène libre ce qui lui confère des caractéristiques d'absorption à 517 nm (Mmabo et al. ,2003) (Lin et Chou, 2004). En présence de piègeurs de radicaux libres, la couleur pourpre de la solution de DPPH s'estompe rapidement (Yamaguchi et al. ,1998). De ce fait, nous avons suivi, par spectrophotométrie, la disparition du radical DPPH \bullet entre 425 et 800 nm en fonction du volume ajouté pour chaque extrait méthanolique des différents échantillons. A titre d'exemple, nous présentons la figure IV.10 de l'évolution des spectres d'absorption UV-visible.

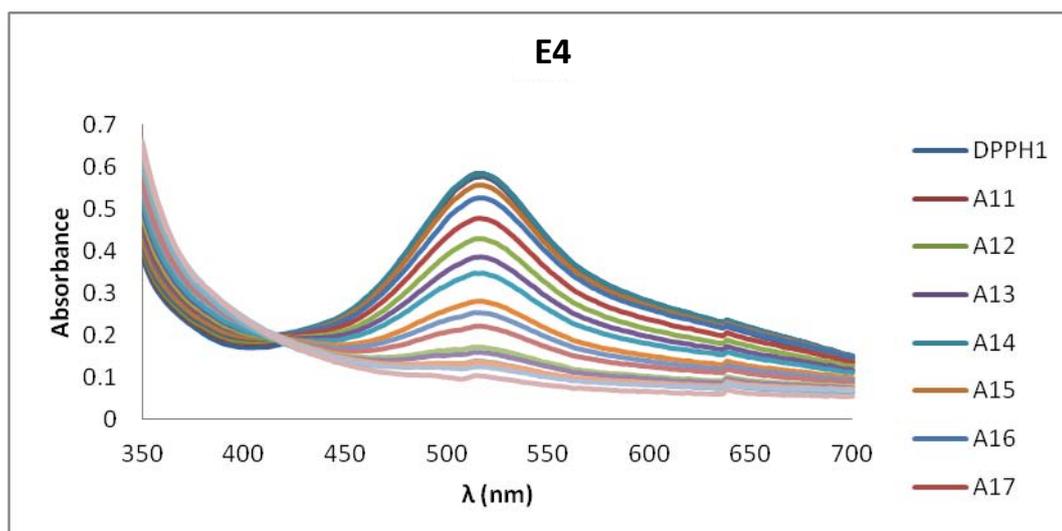


Figure IV. 10 Evolution des spectres d'absorption UV-visible de l'extrait E4 (à P=100bar et T=40°C)

D'après la figure IV.10, nous remarquons que l'absorbance de la solution de DPPH• ($C = 1,013 \cdot 10^{-4} M$) diminue au fur et à mesure que nous ajoutons les extraits, et la couleur passe progressivement du violet au jaune, ceci s'explique par le passage du DPPH• au DPPH-H ce qui prouve une activité anti-radicalaire pour tous les échantillons étudiés. Les figures de l'évolution des spectres d'absorption UV-visible de la silymarine naturelle et silymarine commerciale, des différentes huiles obtenues par solvants organiques (hexane E1, éther de pétrole E3 et chloroforme E2) et des extraits (E4 à E44) obtenus par CO₂ supercritique montrent des allures similaires, nous avons choisi de présenter uniquement les spectres de l'extrait E4.

I. 4.1.2 Evaluation du pouvoir antiradicalaire

L'évaluation du pouvoir antiradicalaire des différents échantillons de graines et d'extraits obtenus, a été déterminée par deux méthodes soit en déterminant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• soit en mesurant le volume V_{50} qui correspond au volume efficace d'un extrait de concentration inconnue nécessaire pour inhiber 50% des radicaux DPPH•. Ce V_{50} est déterminé à partir des courbes représentant la variation du DPPH restant en fonction du volume d'extrait ajouté.

A partir du volume V_{50} , on peut déduire la concentration efficace nécessaire pour inhiber 50% de DPPH• (EC_{50}) (tableau IV.3 et IV.4) pour les différents échantillons en connaissant la concentration initiale de l'extrait méthanolique préparé.

Dans les tableaux VI.3 et VI.4, nous présentons les valeurs du pourcentage du DPPH[•] restant (% DPPH[•]_{rest}) pour les extraits méthanolique des graines et des extraits huileux de graines de *Silybum marianum* par solvants organiques (tableau IV.3) et par CO₂ supercritique (tableau VI.4) dans une solution méthanolique de DPPH[•] de concentration $1,013 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et le volume de DPPH (2 mL).

La figure IV.11 représente les variations des pourcentages en DPPH[•] restant en fonction du volume de l'extrait E4. Cet extrait est pris comme exemple.

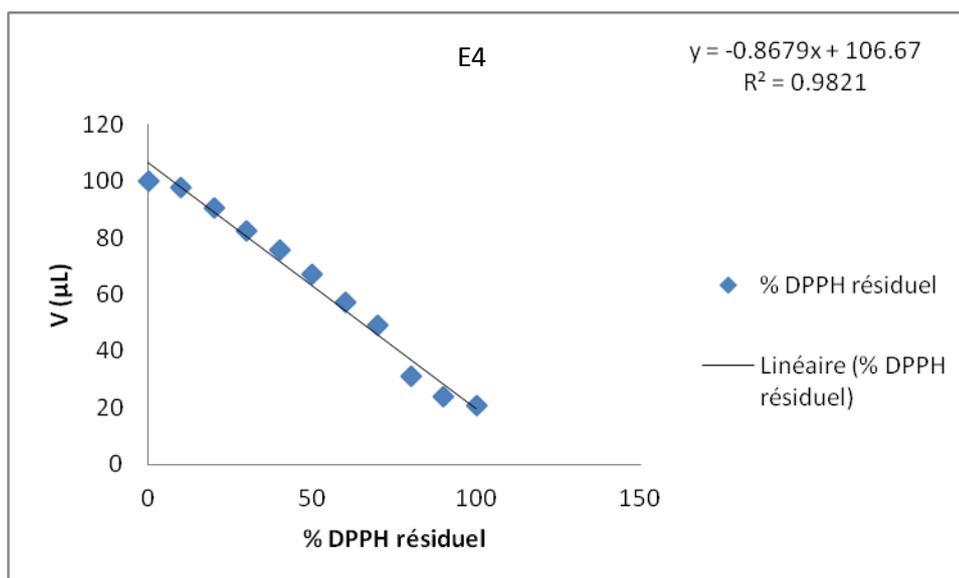


Figure IV. 11 Variation du % DPPH[•]restant en fonction du volume de l'extrait obtenu par CO₂ supercritique (E4).

La détermination du volume V_{50} est un atout majeur, pour pouvoir comparer l'activité antiradicalaire des différents échantillons contre le radical DPPH[•]. Ce volume correspond au volume efficace d'un extrait de concentration inconnue et nécessaire pour inhiber 50% des radicaux DPPH[•] (Syndicat National des Producteurs d'Additifs Alimentaires, 1996). Le V_{50} est déterminé à partir des courbes représentant la variation du DPPH restant en fonction du volume de l'extrait méthanolique ajouté. Nous présentons à titre indicatif les variations du pourcentage en DPPH[•] restant en fonction du volume de l'extrait E4 (figure IV.10)

L'activité antiradicalaire mesurée au moyen du radical DPPH[•] est exprimée en concentration efficace à 50% (CE_{50}). Cette concentration efficace correspond à la concentration en antioxydant pour laquelle la diminution d'absorbance initiale d'une solution de DPPH de même concentration et sans antioxydant. Cette valeur CE_{50} s'exprime en µg/ml et est déterminée graphiquement. Le pouvoir antioxydant d'un composé est d'autant plus élevé que son CE_{50} est petit.

Nous résumons dans le tableau IV.3 les valeurs des volumes efficaces V_{50} et des concentrations efficaces CE_{50} .

	SM Naturelle	SM Commerciale	E1	E2	E3
V_{50} mL	69,05 ± 0,02	62,36 ± 0,09	69,47 ± 0,07	60,99 ± 0,03	63,28 ± 0,05
CE_{50} µg/ml	0,70 ± 0,06	0,64 ± 0,05	0,70 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,63 ± 0,01

Tableau IV. 3 V_{50} et CE_{50} de la silymarine naturelle et artificielle et des extraits par Soxhlet par solvants organiques (hexane (E1), chloroforme (E2) et éther de pétrole (E3))

	E4	E5	E7	E9	E12	E13	E14	E15	E18	E19	E20
V50 mL	54,4 ±0,02	63,74 ±0,01	61,55 ±0,06	65,29 ±0,05	71,26 ±0,07	62,49 ±0,05	69,34 ±0,04	49,32 ±0,08	50,26 ±0,06	66,36 ±0,06	61,74 ±0,03
CE₅₀ µg/ml	0,54 ±0,01	0,61 ±0,03	0,59 ±0,06	0,65 ±0,01	0,73 ±0,01	0,62 ±0,02	0,63 ±0,05	0,52 ±0,03	0,53 ±0,05	0,72 ±0,05	0,61 ±0,05
Echantillon	E21	E22	E23	E24	E25	E28	E29	E30	E33	E34	E35
V50	63,36 ±0,05	56,52 ±0,03	51,77 ±0,05	61,32 ±0,05	42,39± ±0,06	66,11 ±0,05	79,28 ±0,02	78,79 ±0,05	55,99 ±0,05	39,87 ±0,03	54,73 ±0,05
CE₅₀ µg/ml	0,69 ±0,03	0,62 ±0,09	0,72 ±0,01	0,67 ±0,02	0,52 ±0,09	0,72 ±0,01	0,87 ±0,09	0,69 ±0,06	0,57 ±0,09	0,42 ±0,01	0,55 ±0,01
Echantillon	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E43	E44	E45
V50	65,32 ±0,01	66,80 ±0,01	65,32 ±0,09	66,80 ±0,02	62,60± ±0,06	61,53 ±0,09	60,13 ±0,01	77,31 ±0,06	61,72 ±0,03	51,38 ±0,01	72,41 ±0,01
CE₅₀ µg/ml	0,64 ±0,09	0,61 ±0,01	0,65 ±0,03	0,66 ±0,03	0,62 ±0,01	0,61 ±0,01	0,60 ±0,09	0,77 ±0,01	0,61 ±0,09	0,51 ±0,01	0,57 ±0,01

Tableau IV. 4 V_{50} et CE_{50} des échantillons extraits par CO₂ supercritique (E4 à E45 tab.II.8)

La valeur de l'EC₅₀ de l'extrait méthanolique de la silymarine commerciale est plus faible que celle de la Silymarine naturelle (cueillis dans le bassin méditerranéen (nord tunisie)) donc les graines de *Silybum marianum* ont le pouvoir antiradicalaire (PAR) le plus important.

$$PAR_{\text{silymarine naturelle}} > PAR_{\text{silymarine commerciale}}$$

Pour les huiles végétales extraites par Soxhlet, les valeurs se rapprochent nettement ; l'extraction par l'hexane montre par contre un PAR légèrement plus faible par rapport aux huiles extraites par l'éther de pétrole et le chloroforme.

$$PAR_{E2} > PAR_{E3} > PAR_{E1}$$

Les extraits huileux obtenus par extraction supercritique montrent des valeurs très fluctuantes et qui ne dépendent ni de la température, ni de la pression et ni des différents autres paramètres comme le temps de contact, l'ajout du co-solvant et le diamètre moyen des particules.

On peut noter que l'extrait obtenu à une température de 40°C et une pression de 220 bar (E34 tab.II.8) présente la valeur la plus faible de CE_{50} et donc le plus fort PAR, par contre dans ces mêmes conditions de température et de pression, l'extrait avec co-solvant (E29) présente le plus faible PAR, sa valeur est inférieure à celles des huiles obtenues par l'appareil de Soxhlet et avec les graines (commerciales ou naturelles).

On note aussi qu'il n'existe aucune corrélation entre le PAR des échantillons et les conditions d'expérimentation d'extraction par SC-CO₂.

Cependant en écartant l'hypothèse de l'influence du solvant d'extraction on admet que seule la technique d'extraction pourrait trancher sur l'efficacité et la capacité d'une technique ou une autre et de mettre en évidence l'activité antiradicalaire d'un extrait huileux.

En conclusion, l'extraction par CO₂ supercritique est la technique qui en plus de sa capacité à donner un produit pur sans aucune traces de solvant, permet d'obtenir un rendement supérieure par rapport aux autres techniques, et d'autre part un produit ayant un pouvoir antioxydant assez élevé par le test de DPPH.

Les valeurs de CE_{50} des graines naturelles ($27.08 \pm 0.002 \mu\text{g/ml}$) et des graines commerciales ($33.24 \pm 0.007 \mu\text{g/ml}$) sont en accord avec celles trouvées ($33.8 \mu\text{g/ml}$) par Gerhäuser et al., (2003) et celles ($50.4 \mu\text{g/ml}$) trouvées par Šeršeň et al., (2006). Mais comme nous l'avons déjà mentionné plus le CE_{50} est faible plus les graines ont un fort pouvoir antiradicalaire on peut donc en déduire que les graines naturelles provenant du bassin méditerranéen possède le plus fort pouvoir antioxydant.

$PAR_{SM\text{naturelle}} > PAR_{SM\text{commerciale}} > PAR_{SM\text{d'Allemagne}} > PAR_{SM\text{de la République Tchèque}}$

Sachant que nous n'avons aucune indication sur l'origine des graines dans la bibliographie (Gerhäuser et al., 2003 ; de Šeršeň et al., 2006) nous pourrions pas discuter de l'origine et l'influence des climats et de la qualité des sols dans lesquels le *Silybum marianum* a poussé.

Cependant la différence de pouvoir antioxydant que l'on a pu constater entre les différentes graines peut être liée aux différentes méthodes de détection puisque dans les travaux de Gerhäuser et al., (2003) et de Šeršeň et al., (2006) ; la technique de détection est à

EPR (Electron paramagnetic resonance) alors que pour les travaux que nous avons menés le détecteur est la spectroscopie d'absorption.

En comparant les graines du *Silybum marianum* avec d'autres graines comme par exemple les graines de raisins (Parejo et al. ,2003) ($6.9 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$), le PAR de la Silymarine est très faible.

I.4.2 Détermination du pouvoir antiradicalaire par l'ABTS \bullet^+

Le test ABTS mesure l'habilité d'un antioxydant à capturer les radicaux ABTS \bullet^+ générés par la réaction entre un oxydant fort et le sel d'ABTS \bullet^+ . Le pouvoir antiradicalaire a été déterminé selon le test TEAC (Capacité antioxydante en Equivalent du trolox).

A partir du pourcentage d'inhibition d'un milligramme de chaque composé étudié et de la courbe d'étalonnage du trolox (figure IV.12), nous déduisons l'équivalent du trolox ayant le même pouvoir antioxydant qu'un milligramme de composé étudié.

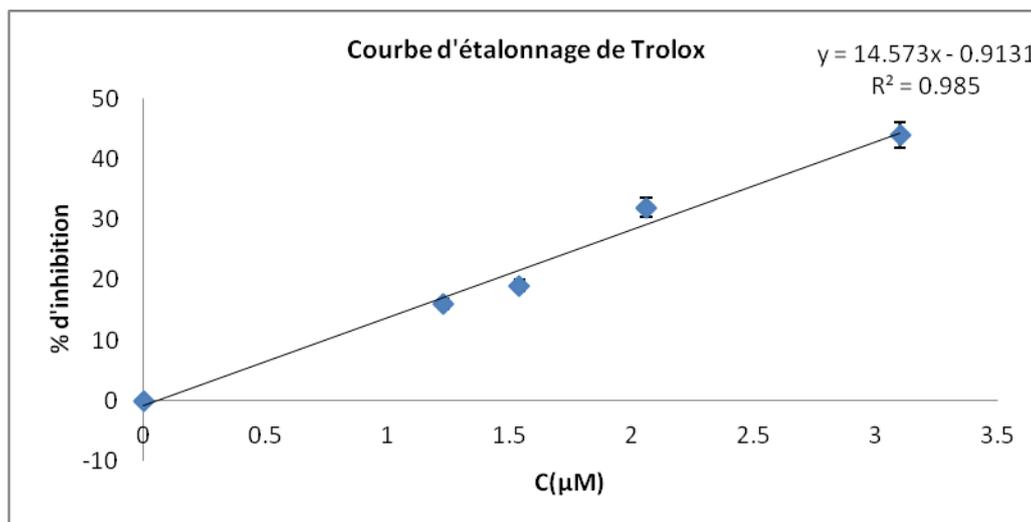


Figure IV. 12 Courbe d'étalonnage du Trolox

En comparant les pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration des échantillons, nous remarquons une augmentation de pourcentage d'inhibition au fur et à mesure que la concentration augmente (tableaux IV.6 et IV.7)

Concentration d'ABTS	Pourcentages d'inhibition (%)				
	SM Nat	SM Com	E3	E1	E3
0,14 10 ⁻³ M	16,35	11,84	14,62	10,34	13,67
0,7 10 ⁻³ M	29,50	28,24	38,25	29,12	20,71
0,035 10 ⁻³ M	59,75	49,62	57,30	49,99	52,95
0,023 10 ⁻³ M	89,27	88,25	73,30	80,28	77,21

Tableau IV. 5 Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'ABTS après l'ajout de la silymarine naturelle (SM Nat) et commerciale (SM Com) et des extraits par Soxhlet par solvants organiques (hexane (E1), chloroforme (E2) et éther de pétrole (E3))

Concentration d'ABTS	Pourcentages d'inhibition (%)											
	E4	E5	E7	E9	E12	E13	E14	E15	E18	E19	E20	
0,14 10 ⁻³ M	12,82	11,79	13,5	28,59	25,74	19,11	12,38	18,58	12,14	12,18	15,5	
0,7 10 ⁻³ M	30,74	23,66	41,13	43,12	60,07	41,04	31,12	38,68	38,24	35,12	32,55	
0,035 10 ⁻³ M	25,64	79,22	70,18	50,47	61,17	72,97	45,21	52,57	62,12	62,37	50,45	
0,023 10 ⁻³ M	72,3	84,03	84,03	74,61	92,51	83,39	76	74,58	87,27	85,6	60,54	
	E21	E22	E23	E24	E25	E28	E29	E30	E33	E34	E35	
0,14 10 ⁻³ M	18,15	27,81	25,47	14,31	11,74	10,87	11,55	10,9	15,57	27,67	24,35	
0,7 10 ⁻³ M	29,85	44,31	54,92	57,82	26,14	16,35	24,01	19,85	29,88	33,92	36,44	
0,035 10 ⁻³ M	43,92	72,84	61,49	69,87	66,92	25,64	36,17	25,11	40,61	84,85	86,35	
0,023 10 ⁻³ M	63,95	80,47	83,34	81,48	75,62	71,28	77,68	85,17	62,98	93,82	95,87	
	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E43	E44	E45	
0,14 10 ⁻³ M	22,12	28,61	23,47	29,09	23,65	20,16	17,88	26,66	28,12	25,37	25,37	
0,7 10 ⁻³ M	29,89	39,12	33,73	31,11	43,08	28,3	26,11	32,32	41,77	49,55	49,55	
0,035 10 ⁻³ M	50,67	78,88	49,51	59,53	69,65	82,17	57,19	64,92	49,11	67,17	67,17	
0,023 10 ⁻³ M	94,06	90,33	71,79	88,17	92,41	93,2	88,78	96,46	91,82	93,87	93,87	

Tableau IV.6 Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'ABTS des échantillons extraits par CO₂ supercritique

La concentration en antioxydant (TEAC) est déterminée à partir de l'équation du trolox (1 µM de trolox ayant le même pouvoir antiradicalaire qu'un µM du composé étudié) et à partir des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait étudié.

	SM Nat	SM Com	E3	E2	E1
V ₅₀	450,85±0,02	355,87±0,06	618,81±0,01	303,81±0,09	347,22±0,02
TEAC	0,82±0,01	1,06±0,02	0,60±0,07	1,24±0,02	1,08±0,08

Tableau IV.7 V₅₀ (mL) et TEAC (μM) de la silymarine naturelle (SM Nat) et commerciale (SM Com) et des extraits par Soxhlet par solvants organiques (hexane (E1), chloroforme (E2)

	SM Nat	SM Com	E3	E2	E1
V ₅₀	450,85±0,02	355,87±0,06	618,81±0,01	303,81±0,09	347,22±0,02
TEAC	0,82±0,01	1,06±0,02	0,60±0,07	1,24±0,02	1,08±0,08

et éthanol (E3))

	E4	E5	E7	E9	E12	E13	E14	E15	E18	E19	E20
V ₅₀	511,24 ±0,02	186,42 ±0,05	150,69 ±0,01	159,4 ±0,02 8	268,0 ±0,02 9	189,42 ±0,08	166,72 ±0,06	463,39 ±0,05	220,65± 0,08	223,6 ±0,02 1	523,44 ±0,03
TE AC	0,73 ±0,01	2,05 ±0,02	2,54 ±0,06	2,37 ±0,06	1,43 ±0,05	2,07 ±0,03	2,24 ±0,09	0,78 ±0,02	1,72 ±0,03	1,69 ±0,03	0,76 ±0,08
	E21	E22	E23	E24	E25	E28	E29	E30	E33	E34	E35
V ₅₀	160,23 ±0,05	161,65 ±0,08	304,32 ±0,06	293,42 ±0,08	361,79 ±0,02	290,52 ±0,03	390,93 ±0,08	231,48 ±0,02	116,063 ±0,03	114,18 ±0,02	162 ±0,01
TE AC	2,38 ±0,02	2,374 ±0,02	1,25 ±0,01	1,29 ±0,01	1,03 ±0,01	1,30 ±0,02	0,97 ±0,06	1,63 ±0,02	3,27 ±0,06	3,32 ±0,08	2,41 ±0,08
	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E43	E44	E45
V ₅₀	167,11 ±0,02	166,80 ±0,08	165,32 ±0,02	166,80 ±0,01	162,60 ±0,09	161,53 ±0,05	160,13 ±0,02	177,31 ±0,01	161,72 ±0,03	151,38 ±0,02	165,32 ±0,05
TE AC	2,62 ±0,09	2,63 ±0,05	2,57 ±0,09	2,63 ±0,01	2,46 ±0,02	2,42 ±0,03	2,36 ±0,02	3,040 ±0,08	2,43 ±0,05	2,00 ±0,08	2,57 ±0,08

Tableau IV. 8 V₅₀ (mL) et TEAC (μM) des échantillons extraits par CO₂ supercritique à différentes températures et pressions

L'extraction par solvants donne la plus faible concentration en antioxydants en équivalent trolox. On obtient une meilleure extraction des antioxydants de la silymarine commerciale par rapport à la silymarine naturelle avec une valeur de 1.06±0.02 μM. Alors que pour les solvants d'extraction, l'éther de pétrole est le plus faible extracteur d'antioxydant alors que le chloroforme est le meilleur extracteur avec une valeur de TEAC égale à 1.246 ±0.001 μM. Plus la TEAC est élevée plus le pouvoir antioxydant de l'extrait est élevé.

$$\text{TEAC}_{E2} > \text{TEAC}_{E1} > \text{TEAC}_{E3}$$

Comme pour le test DPPH, les extraits huileux obtenus par extraction supercritique montrent des valeurs très fluctuantes et qui ne dépendent ni de la température ni de la pression; on peut noter que l'extrait obtenu à une température de 40°C et une pression de 220 bars présente la valeur la plus forte de TEAC par contre à cette même température 40°C et à une pression de 100 bars, l'extrait présente la plus faible valeur de TEAC, sa valeur est plus importante même en comparaison avec les huiles fournies par l'appareil de Soxhlet et avec les graines (commerciales ou naturelles).

I. 5. Conclusion

Expérimentalement, pour estimer leurs propriétés antioxydantes, plusieurs modèles en solution sont employés comme ceux cités dans les travaux de Brand-Williams (Brand-Williams et al., 1995). L'étude du pouvoir antiradicalaire des graines et des extraits huileux de graines de *Silybum marianum* conduite par deux méthodes en utilisant le radical stable DPPH• et l'ABTS•, a permis de mettre en évidence le pouvoir antioxydant et son évaluation.

A titre comparatif, pour les silymarines naturelles et commerciales :

$$\begin{aligned} \text{PAR}_{\text{silymarine naturelle}} &> \text{PAR}_{\text{silymarine commerciale}} \\ \text{TEAC}_{\text{silymarine naturelle}} &< \text{TEAC}_{\text{silymarine commerciale}} \end{aligned}$$

Les deux tests donnent les mêmes résultats ce qui permet de conclure que la silymarine commerciale présente un pouvoir antioxydant plus élevée que celui de la silymarine naturelle ceci peut être dû à plusieurs facteurs qui influencent la composition en flavonolignanes et en autres antioxydants.

Pour les extraits à l'hexane, à l'éther de pétrole, et au chloroforme :

$$\begin{aligned} \text{PAR}_{\text{E2}} &> \text{PAR}_{\text{E3}} > \text{PAR}_{\text{E1}} \\ \text{TEAC}_{\text{E3}} &< \text{TEAC}_{\text{E1}} < \text{TEAC}_{\text{E2}} \end{aligned}$$

L'influence du solvant d'extraction est l'unique réponse aux différences de résultats que présentent les deux tests concernant les extraits obtenus par Soxhlet.

Le DPPH• peut présenter certains inconvénients sur le plan expérimental d'abord parce qu'il possède des propriétés solvatochromes (Le solvatochromisme est la propriété d'un complexe à changer de couleur en fonction du solvant dans lequel il est solubilisé) et il n'est soluble que dans des solvants organiques, en particulier les alcools, et non en milieux aqueux ; ce qui empêche toute analyse d'antioxydants hydrophiles (Arnao, 2000).

De plus toutes les manipulations réalisées avec le DPPH• doivent se dérouler obligatoirement dans l'obscurité puisque ce radical est instable à la lumière et que son

absorbance à 515 nm décroît sans l'intervention d'un antioxydant (Ozcelik et al. ,2003). Le DPPH[•] est aussi un radical stable possédant une bande d'absorption dans le visible vers 515nm qui interfère sur celles des composés testés d'où la difficulté d'interprétation posée par Pior et al. ,(2005) pour ce test. Le test ABTS⁺ est plus efficace au moins pour une meilleure interprétation des résultats puisque sa bande d'absorption (734 à 815 nm) n'interfère pas sur celle du composé à étudier ce qui est le cas du radical DPPH[•] qui ne possède pas d'autres bandes à plus grande longueur d'onde.

L'objectif étant de déterminer dans quelles conditions de température et de pression, l'extrait possède la plus haute activité antioxydante ce qui permet de déduire qu'à 40°C et à 220bar on obtient un extrait pur avec une activité antioxydante importante prouvée par les deux tests DPPH et ABTS. Nous nous proposons à la suite de cette évaluation d'étudier l'activité biologique de cet extrait afin de mettre en évidence les avantages de la technique d'extraction par CO₂-SC sur l'une des activités les plus importantes dans le domaine de la médecine et de la pharmacie ; nous avons choisi dans ce travail de tester l'activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses du côlon de l'extrait (E29) obtenu à 40°C et à 220bar.

II. Activité cytotoxique des flavonolignanes

II. 1.Introduction

De nombreuses recherches ont été menées ces dernières années pour évaluer le potentiel de composés photochimiques présents dans des plantes très variées comme agents chimiopréventifs efficaces contre le cancer. Dans ce but, l'extrait de chardon Marie a été particulièrement étudié pour ses effets bénéfiques généraux sur la santé. (Ramasamy & Agarwal 2008)

Le Chardon Marie (*Silybum marianum*, famille des Astéracées) est l'une des plus anciennes plantes médicinales connues pour ses propriétés hépato-protectrices et a été décrite dans la littérature comme agent thérapeutique contre l'indigestion, les troubles de la bile et de la rate et l'insuffisance rénale (Foster, 1999; Culpeper, 1650).

La silymarine, comme déjà mentionnée dans les chapitres précédents, est un flavonoïde isolé à partir des graines de chardon-Marie; ce constituant actif est un flavonolignane composé chimiquement d'un mélange de quatre isomères tels que les flavonoïdes silybinine, isosilybinine, silydianine et silychristine (Davis-Searles et al. , 2005).

En Europe et en Asie la silymarine et la silybinine sont utilisées en médecine pour le traitement des maladies du foie. Chez les patients atteints de troubles hépatiques, le traitement par la silymarine ou silybinine a montré que ce dernier permettait d'obtenir une nette amélioration de la fonction hépatique plus rapidement que chez ceux recevant un placebo (Salmi & Sarna 1982). Une autre étude a montré qu'une administration quotidienne de 420 mg de silymarine pendant plusieurs années a entraîné une réduction significative de la mortalité des patients atteints de cirrhose alcoolique du foie (Ferenci et al., 1989). En Europe, la silymarine et la silybinine sont utilisées comme toniques du foie. Actuellement certains travaux ont montré que ces deux principes actifs peuvent être utilisés contre divers troubles de la vessie, de la vésicule biliaire et du foie, y compris dans les pathologies d'hépatite et de cirrhose ainsi que de certaines affections dermatologiques (Ely, 1989 ; Luper, 1998). Récemment, la silymarine a été commercialisée aux Etats-Unis et en Europe comme supplément diététique et notamment sous forme de capsule avec une biodisponibilité accrue avec les noms commerciaux : Siliphos®, et Silipide Legalon®.

D'après Wellington et Jarvis (2001), aucune recherche ne mentionne la présence d'une toxicité induite par la silymarine, même si certaines études cliniques ont rapporté des effets indésirables mineurs se résumant à des maux de tête, et des symptômes gastro-intestinaux et dermatologiques.

Ainsi, des études ont suggéré que la silymarine et la silybinine pouvaient présenter un potentiel intéressant comme agents préventifs contre plusieurs cancers humains. Malgré la multitude de travaux menés sur la silymarine et la silybinine et leurs utilisations cliniques, peu d'études se sont intéressées à leurs métabolismes chez les animaux (Zhao & Agarwal 1999).

Dans ce contexte, notre étude a pour objectif d'évaluer l'activité anti-proliférative vis-à-vis de cellules cancéreuses d'extraits de chardon Marie obtenus par extraction en CO₂-SC. L'extrait choisi provient d'une extraction à T= 40°C et P= 220 bar. Le choix de cet extrait est relatif à son activité antioxydante et sa concentration en flavonolignanes.

II.2. Matériels et méthodes

II.2. 1. Matériels

II.2.2.1.1. La lignée cellulaire Caco2

Nous avons choisi la lignée cellulaire Caco2 comme modèle cellulaire *in vitro* des entérocytes. Ces cellules sont issues d'une lignée cellulaire cancéreuse de côlon provenant d'un adénocarcinome colique humain, laquelle a été établie en 1977 par Fogh et Orfeo (Fogh

et Orfeo 1977). L'intérêt de ces cellules réside dans leur capacité à se différencier spontanément en cellules polarisées acquérant des caractéristiques morphologiques et biochimiques d'entérocytes humains (Hidalgo et al 1989; Pinto et al 1983; Rousset 1986).

Elles proviennent du laboratoire URAFPA (Nancy, France), et présentent une phase exponentielle de croissance et entrent en différenciation spontanée dès qu'elles atteignent la confluence. A confluence et au-delà, les cellules forment une mono-couche avec des jonctions serrées.

II.2.2.1.2. Molécules testées

Les flavonolignanes testés sont : la silybine (ou silybinine), la silychristine et la silydianine et sont référencées dans le chapitre II. Chaque molécule est à une concentration de 1 mg/mL (dilution effectuée dans le DMSO à 10% de PBS).

Dans le but de tester essentiellement les extraits purs des graines de *Silybum marianum* obtenus par CO₂ supercritique, le choix de l'extrait s'est fait en prenant en considération l'évaluation du pouvoir antiradicalaire par le radical DPPH et par le radical ABTS, ainsi l'échantillon obtenu à P= 220 bar et à T=40°C. La phase huileuse est séparée de la phase visqueuse et blanchâtre (figure II.29) par décantation. Cet extrait est testé à différentes concentrations 10, 20, 50 et 100 µg /ml (dilution dans le DMSO).

II.2.2.2.Méthodes

II.2.2.2.1.Etude de l'activité cytotoxique

II.2.2.2.1.1. Culture cellulaire

Des cellules Caco2, d'une lignée cancéreuse humaine de colon ont été congelées au 32^{ème} passage à une concentration initiale de 10⁷ cellules /ml. Les cellules ont été décongelées, et cultivées dans des fioles de Roux T75 (75cm²). Le milieu de culture employé est un milieu « Eagle » modifié par Dulbecco (DMEM) (Sigma) supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) source de facteurs de croissance indispensables (Eurobio), 2mM glutamine, (Gibco, France) et 1% (v/v) d'acide aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France). Lorsque les cellules atteignent la confluence, elles sont lavées avec du tampon phosphate PBS (9,6 g/L, pH 7,2) et détachées par trypsination (3mL de solution de trypsine à 0,5% /2,6mM EDTA Gibco, France) pendant 3 min dans un incubateur (37%, 5% CO₂) (Sanyo, MCO-20 AIC). L'action de la trypsine est stoppée par un ajout de milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal (10%) ; les cellules se retrouvent alors en solution. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 800 tours/min pendant 5

min et sont comptées à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique (Zeus, Allemagne). Ce comptage permet de déterminer le nombre de cellules afin d'effectuer le passage suivant. La suspension cellulaire sert à réensemencer d'autres flacons de culture à raison de 10^5 cellules/mL dans des fioles de 25 ou 75 cm². Le nombre de passages ou repiquages des cellules doit être comptabilisé, dans la mesure où il peut influencer le temps de multiplication des cellules et leurs capacités métaboliques : l'utilisation de cellules issues de nombreux repiquages successifs est évitée.

Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité contenant 5% de CO₂. En vue d'assurer l'apport en nutriment aux cellules et d'éliminer les métabolites cellulaires susceptibles d'inhiber la croissance cellulaire, un changement de milieu de culture est nécessaire toutes les 48h. La croissance des cellules est évaluée quotidiennement à l'aide d'un microscope en phase inverse. Les cellules sont cultivées jusqu'à 80% confluence où une concentration de $0,6 \cdot 10^5$ cellules/cm² environ est atteinte. La suspension cellulaire est diluée afin d'ensemencer une microplaque à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules/puits

II.2.2.2.1.2. Conservation des cellules

Décongélation

Pour effectuer une culture cellulaire à partir d'un des cryotubes conservés dans l'azote liquide, on procède à sa décongélation rapide à 37°C dans un bain-marie pour éviter un contact prolongé du DMSO fortement cytotoxique avec les cellules. La suspension décongelée est reprise dans 9mL du milieu préchauffé, DMEM avec 10% SVF pour les cellules Caco2. Après centrifugation à 80 rpm pendant 5 minutes, le surnageant avec le DMSO est éliminé et remplacé par du milieu de culture frais. Après homogénéisation, les cellules sont remises en culture à 37°C. Le milieu de culture est périodiquement renouvelé jusqu'à la confluence des cellules.

Congélation

La congélation des cellules dans l'azote liquide à -196°C s'effectue sur une population cellulaire en phase exponentielle de croissance.

Toutes les étapes de la congélation sont effectuées dans la glace pour limiter l'effet cytotoxique du DMSO (diméthyl-sulfoxyde, Fluka). La suspension de cellules Caco2 est centrifugée (5 tours/min pendant 5 min) et le culot est repris dans un volume de milieu DMEM afin de congeler $7 \cdot 10^6$ cellules Caco2 par cryotube sachant que chaque cryotube

contient 0,9 mL de milieu de culture, il est ajouté 0,1 mL de DMSO, agent cryoprotecteur, goutte à goutte.

Une fois ces étapes réalisées, les cryotubes sont placés dans un « Nicoool® » contenant de l'azote liquide (-196°C) et muni d'un ventilateur. Plusieurs paliers de ventilation sont réalisés pour congeler les cellules progressivement afin de limiter au maximum la mort cellulaire. Les cryotubes sont stockés par la suite dans un cryostat à -196°C.

Etude antiproliférative

L'étude antiproliférative des molécules pures (les flavonolignanes) et l'extrait pur provenant des graines du chardon Marie a été réalisée vis-à-vis de la lignée cellulaire cancéreuse Caco2. Une gamme de concentrations entre 0 et 200 µM a été réalisée. Les différentes concentrations ont été préparées dans du DMSO de façon à ne pas dépasser 1% de DMSO dans chaque puits.

L'activité antiproliférative des extraits a été évaluée vis à vis de cellules Caco2. Différentes concentrations de 10, 20, 50 et 100 mg/mL de chaque extrait ou fraction ont été préparées dans du DMSO avec une concentration finale en DMSO dans le milieu de culture ne dépassant pas 1% (v/v) et diluées dans un milieu de culture.

II.2.2.2.1.3. Suivi de la croissance cellulaire à micro-échelle par le système cellscreen®

Le suivi de la croissance peut être déterminée par des mesures effectuées en microplaques grâce au système cellscreen® (Brinkmann et al. ,2002). Le cellscreen® est un système constitué d'un microscope couplé à un analyseur d'images. Un appareil photo permet de prendre des images de la surface des puits d'une microplaque laquelle est positionnée sur un support motorisé. Les images sont analysées puits par puits par le processeur et la surface du tapis cellulaire au fond de chaque puit est mesurée (figure IV.13). Le développement cellulaire est évalué par analyse d'images par la détermination du pourcentage de surface des puits recouverts par les cellules.

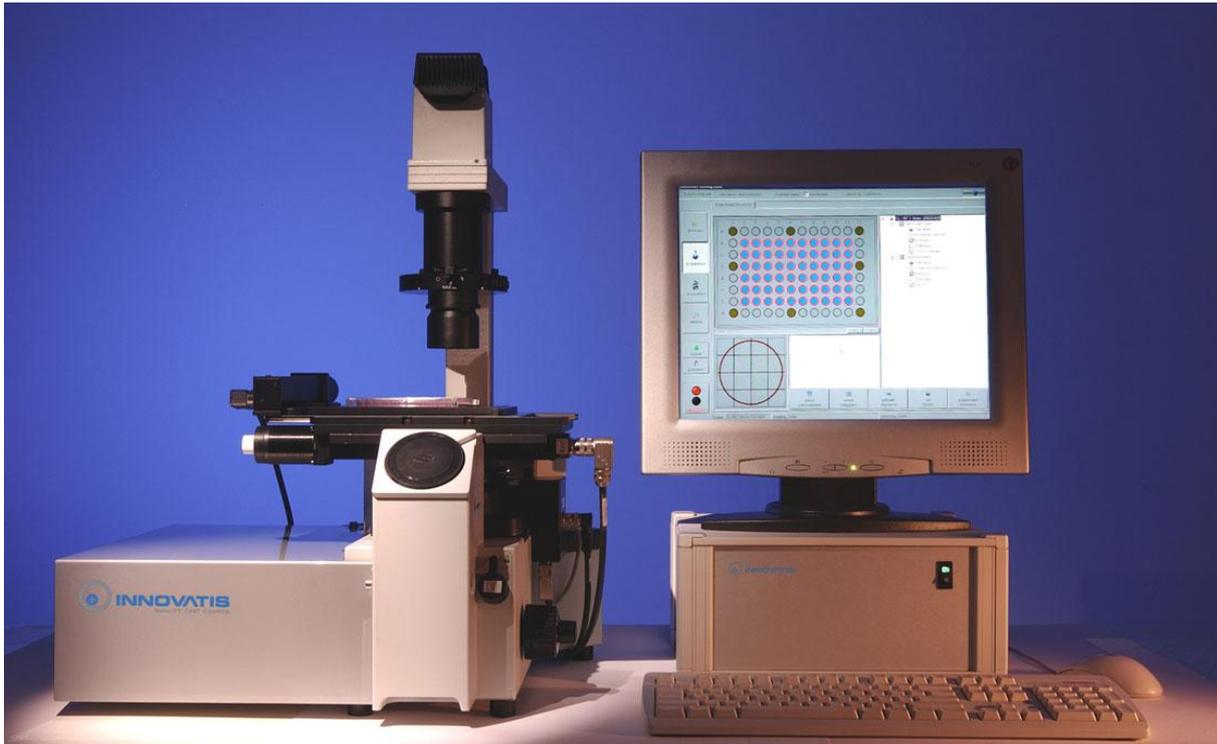


Figure IV. 13 Cellscreen® : Système automatisé d'analyse de la croissance cellulaire

Ainsi, dans le cas de culture de cellules adhérentes (Caco2), c'est le pourcentage de recouvrement des cellules à la surface de chaque puits qui est déterminé. Cette mesure permet de réaliser des cinétiques de croissance cellulaire et d'évaluer l'effet potentiel de différentes molécules sur la croissance des cellules. Dans le cas de cellules en suspension, le nombre total de cellules est déterminé.

Le suivi de la croissance est basé sur la comparaison du pourcentage de recouvrement des puits témoins où les cellules sont placées dans un milieu dénué de la substance à tester et des puits où les cellules sont soumises à différentes concentrations de la molécule.

Au préalable, il a été vérifié que la surface de recouvrement est proportionnelle à la concentration cellulaire. Les mesures sont effectuées aux temps 0, 24h, 48h et 72h. Le temps t_0 représente le temps d'ensemencement des cellules, alors que le temps t_{24} représente le temps d'ajout des molécules. Les mesures réalisées permettent le calcul de la vitesse spécifique de croissance μ (en h^{-1}), est calculée comme suit :

Au temps t_0 la concentration de cellules dans le milieu de culture est x_0

$$\mu = \frac{r_x^m}{x} \quad \Rightarrow \quad \mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

$$r_x^m = \frac{dx}{dt} \quad \Rightarrow \quad \mu x = \frac{dx}{dt} \quad \Rightarrow \quad \mu dt = \frac{dx}{x}$$

$$\mu \int_{t=0}^t dt = \int_{x_0}^x \frac{dx}{x}$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu \times t$$

avec μ correspond à la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}) et r_x^m la vitesse volumique de croissance (g/l.h)

Au temps t , la concentration cellulaire dans le milieu est x

Ainsi en tracant $\ln x/x_0$ en fonction du temps, la pente qui est déterminée à partir de la partie linéaire représentée la vitesse spécifique apparente de croissance μ (h^{-1}).

Le temps nécessaire au doublement de la population de cellules (t_d) est donné par :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

II.2.2.2.1.4. Test rouge neutre

La cytotoxicité éventuelle des molécules étudiées vis-à-vis des cellules Caco2 en culture est déterminée en utilisant le test rouge neutre ou NRU (Neutral Red Uptac).

Le rouge neutre (figure IV.14) est un colorant qui peut pénétrer dans les cellules à travers la membrane cellulaire par diffusion ionique. Le colorant se fixe alors sur les membranes intactes des lysosomes intracellulaires.

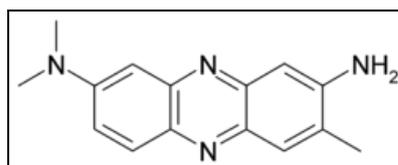


Figure IV. 14 Structure chimique du rouge neutre

Cette fixation du rouge neutre témoigne de l'intégrité cellulaire et elle est relative à la viabilité (Chailloux, 2004). Ainsi, en cas de mortalité, la membrane dégradée des lysosomes ne permet pas la fixation du rouge neutre. L'absorbance à 540 nm mesurée par spectrophotométrie est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (Mingoa et al., 2006)

En pratique, les cellules sontensemencées comme décrit précédemment à raison de 1.10^4 cellules /puit dans une microplaque (Nunc) de culture à 96 puits et incubées pendant 24h à 37°C et 5% de CO₂. Après 24h, les différentes concentrations de molécules à tester sont ajoutées à raison de 6 puits pour chaque condition. Après 48h de culture, le milieu est éliminé,

les cellules adhérentes sont lavées au PBS, puis 200 µl/ml d'une solution de Rouge Neutre sont ajoutés dans le milieu de culture et la microplaque est incubée pendant 3 heures à 37°C. Le milieu est à nouveau éliminé et les cellules sont lavées au PBS. Le rouge neutre est extrait des cellules en les soumettant à une solution de solubilisation (éthanol/acide acétique /eau, 50/1/49) sous agitation pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance peut enfin être mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le nombre de cellules vivantes après traitement à la concentration choisie de molécules par rapport au nombre de cellules témoins non traitées, permet d'évaluer la cytotoxicité de ces molécules.

Le pourcentage de mortalité est calculé d'après cette équation :

$$\% \text{ mortalité cellulaire} = 1 - (\text{Abs}_{\text{essai}} / \text{Abs}_{\text{témoin}}) \times 100$$

Abs_{essai} = Absorbance de l'essai témoin non traité par les molécules

Abs_{témoin} = Absorbance de l'essai traité par les molécules

II.2.2.3. Résultats et discussion

II.2.2.3.1. Evaluation de la cytotoxicité

La lignée cellulaire Caco-2 (adénocarcinome colique) est un des modèles cellulaires les plus employés pour modéliser in vitro l'épithélium intestinal où les molécules étudiées peuvent être libérées de la matrice alimentaire grâce à la microflore colique (Couteau et al., 2001) et ainsi étudier la biodisponibilité d'un grand nombre de molécules (Doehmer et al., 2008). D'autres études se sont intéressées à l'étude de la toxicité des différentes biomolécules sur ces cellules, ce qui représente l'objectif de notre étude et plus précisément l'effet des flavonolignanes sur la toxicité des cellules Caco-2.

Le suivi par le système Cellscreen[®] des cellules incubées soit avec la silychristine, la silybine, la silydianine ou l'extrait des graines de *Silybum marianum* est réalisé au cours du temps afin d'observer la morphologie des cellules Caco2 (figure IV.15) par analyse d'images.

L'évolution de la surface des puits recouverts par les cellules est suivie au cours du temps (de 0 à 72h) de la surface colonisée par les cellules.

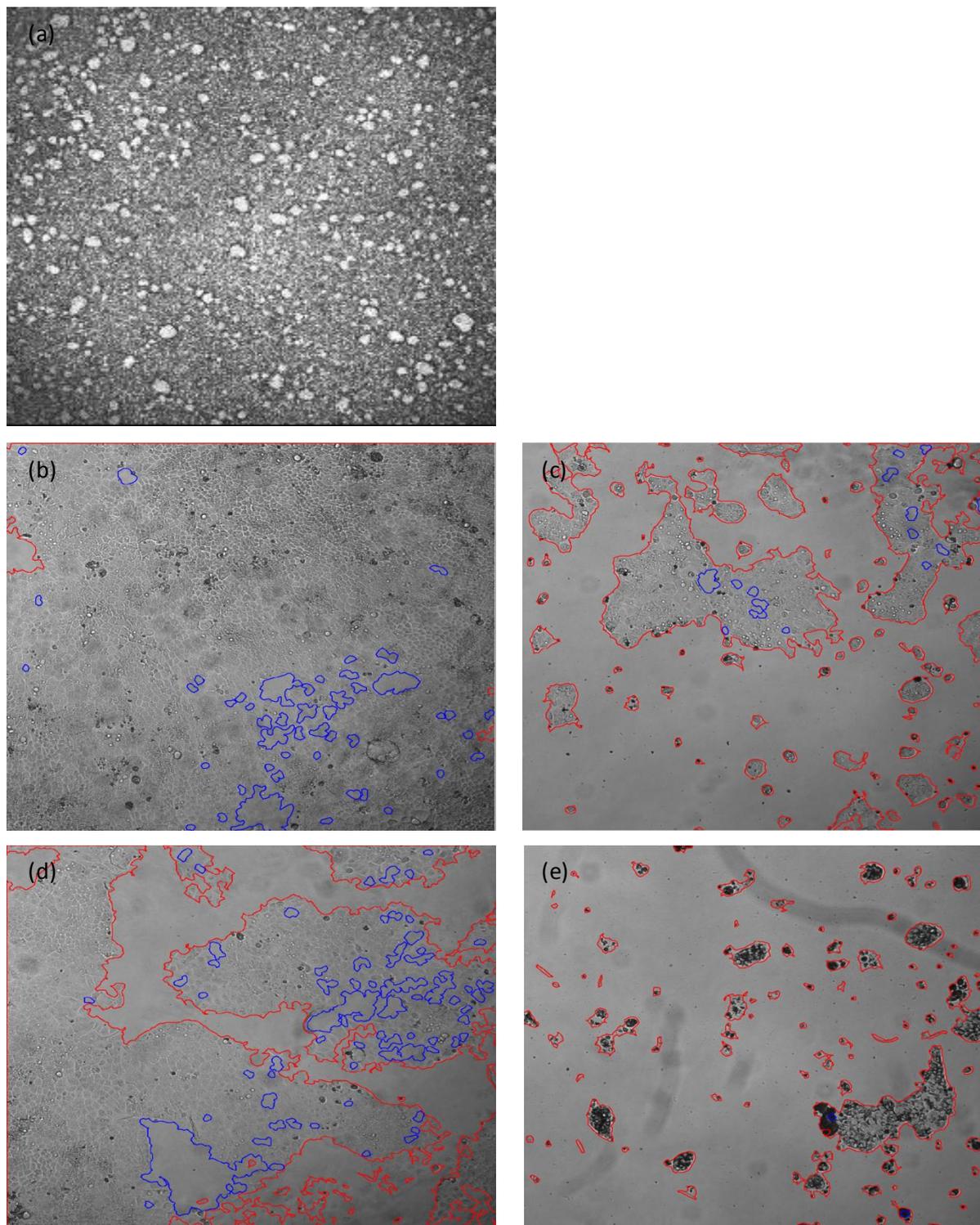


Figure IV. 15 Analyse d'image par le Cellscreen du témoin (sans ajout de flavonolignanes(a)) et après 24h de l'ajout des flavonolignanes : silychristine (b) ; silydianine (c) ; silybine (d) et de l'extrait obtenu par CO₂-SC (e).

Les clichés de la figure IV.15 montrent que la surface du tapis cellulaire est délimitée par un trait rouge alors que l'espace non colonisé par les cellules est délimité par un trait bleu. En comparant les figures du témoin avec celles représentant l'ajout des flavonolignanes, on observe une nette différence de surface du tapis cellulaire.

Il peut être clairement observé que les surfaces des tapis cellulaires en présence de la silybine et de l'extrait obtenu par CO₂-SC sont moins étendues par rapport à ceux de la silychristine et de la silydianine ce qui indique une plus forte cytotoxicité de la silybine et de l'extrait vis-à-vis des cellules Caco-2.

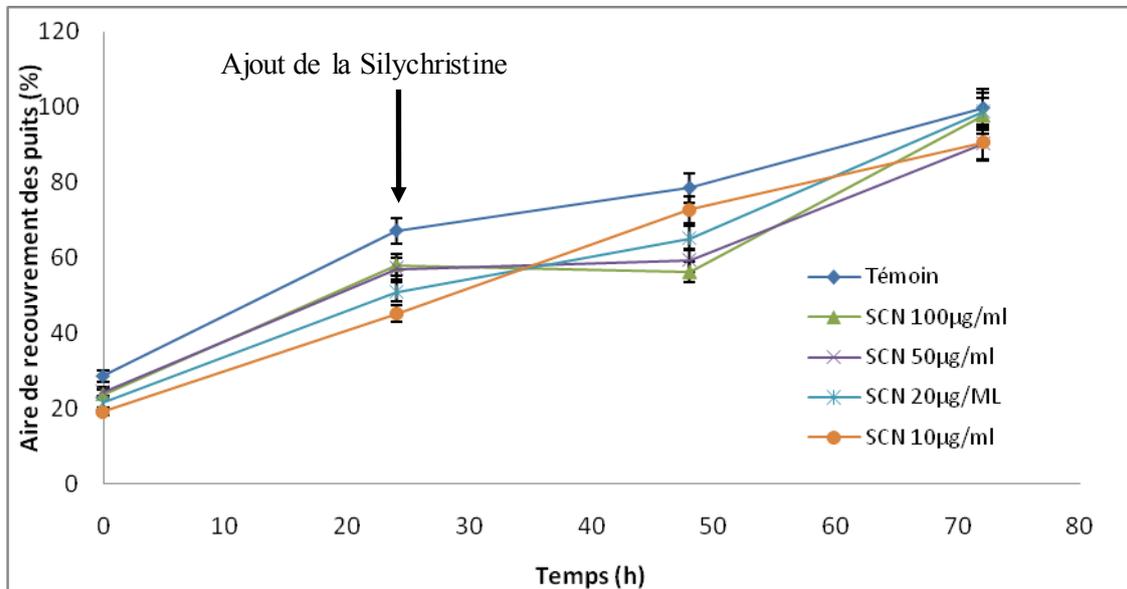


Figure IV. 16 Cinétique de croissance des cellules Caco-2 (Surface de recouvrement des puits en fonction du temps en présence de la silychristine)

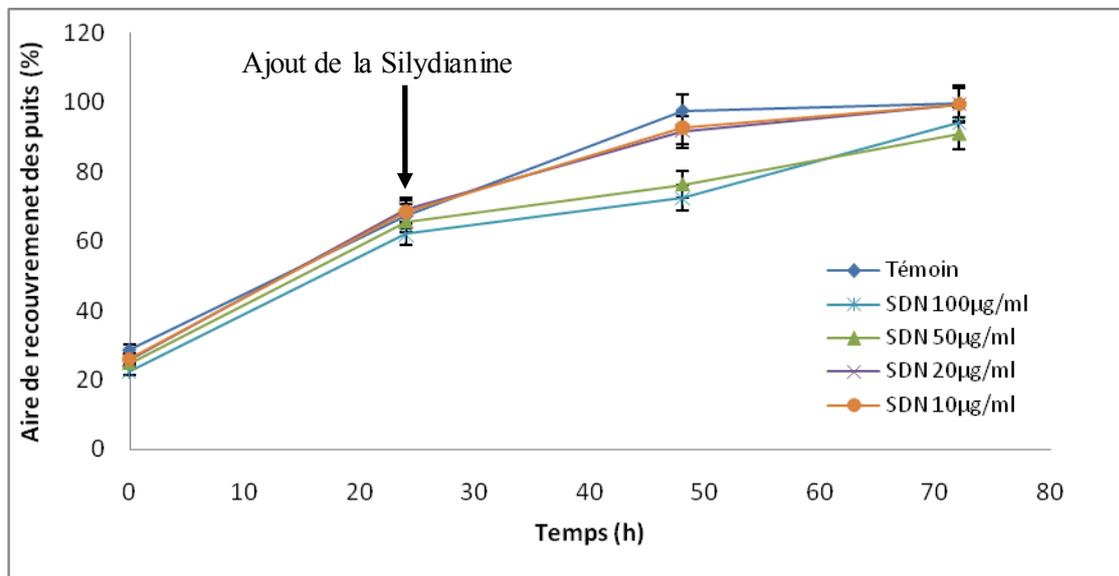


Figure IV. 17 Cinétique de croissance des cellules Caco-2 (Surface de recouvrement des puits en fonction du temps en présence de la silydianine)

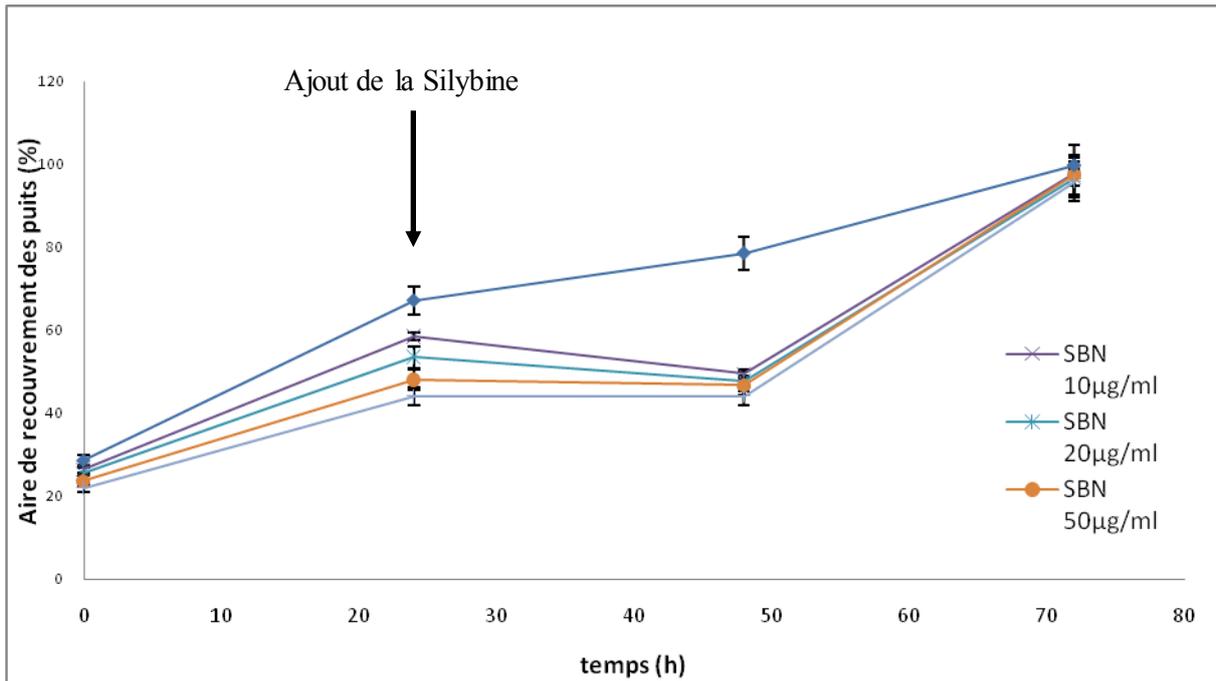


Figure IV. 18 Cinétique de croissance des cellules Caco-2 (Surface de recouvrement des puits en fonction du temps en présence de la silybine)

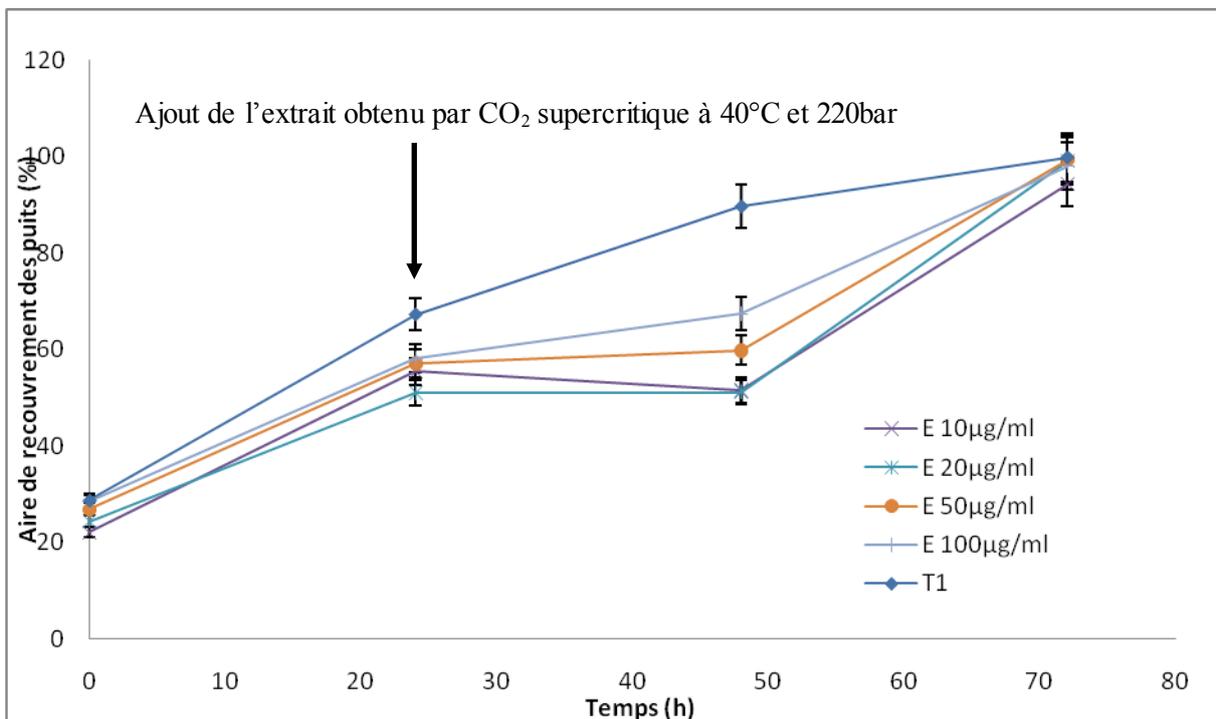


Figure IV. 19 Cinétique de croissance des cellules Caco-2 (Surface de recouvrement des puits en fonction du temps en présence de l'extrait obtenu par CO₂ supercritique à 40°C et 220 bars)

Les courbes de cinétique de croissance des cellules Caco-2 en présence des flavonolignanes (figure IV.17, 18, 19) montrent que l'effet cytotoxique est significatif dès l'ajout des molécules et surtout durant les 24h qui suivent cet ajout. On peut noter cependant une reprise de la croissance entre 24 et 48h après l'ajout des flavonolignanes à certaines concentrations.

Ainsi, aux fortes concentrations 50 et 100 µg/ml, les deux flavonolignanes Silybine et silychristine sont les plus actives du fait d'un arrêt de la croissance des cellules dans les 24h qui suivent l'ajout. Par contre, à une concentration de 10 µg/ml, on ne remarque aucun effet de l'ajout de la silychristine. A 20 µg/ml et 50 µg/ml, on observe une inhibition de la croissance des cellules Caco-2 ; il y a un arrêt de la croissance des cellules. Ceci dure uniquement durant les 24 premières heures qui suivent l'ajout de la molécule.

Dans le cas de la silydianine, à faibles concentrations (10 et 20 µg/ml) la molécule n'a aucun effet alors qu'à de fortes concentrations 50 et 100 µg/ml, il y a un faible effet d'inhibition de la croissance cellulaire.

D'après la bibliographie (Hogan et al. ,2007), la silybine est le flavonolignane le plus actif de la silymarine. Dans nos travaux (figures III.7 et III.8), les résultats montrent que de faibles ou de fortes concentrations induisent une inhibition de la croissance cellulaire importante conduisant à un arrêt de la croissance cellulaire en comparaison aux autres flavonolignanes.

D'après l'analyse chromatographique, l'extrait obtenu par CO₂-SC (à 220 bars et à 40°C) contient 32 µg/ml (d'huile) de silychristine, 39 µg/ml (d'huile) de silydianine, 46 µg/ml (d'huile) de silybine ; d'après la figure 19, on observe une inhibition à faibles concentrations et un arrêt de la croissance cellulaire ce qui peut être expliqué par le fait que cet extrait est un mélange de trois flavonolignanes et de la taxifoline. On peut aussi émettre l'hypothèse d'une interaction entre ces quatre molécules qui serait la cause de cet effet cytotoxique contre les cellules Caco-2. Ces observations sont toutes réalisées au cours des 24h qui ont suivi l'ajout des molécules et de l'extrait par contre entre 24 et 48 h qui ont suivi l'ajout des molécules, nous avons observé comme une reprise voire même une activation de la croissance cellulaire ; plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Cette reprise peut être due au développement d'une résistance contre l'effet cytotoxique des flavonolignanes (hypothèse peu probable dans un temps aussi court) ou à la dégradation des molécules à cause du changement de certaines

conditions du milieu comme par exemple le pH qui s'acidifie au cours du temps. Cette augmentation de la surface est peut être également liée à la précipitation des molécules qui entraînerait la présence de particules au fond de la boîte qui seraient comptabilisées ou encore une présence importante de débris cellulaires formant un tapis au fond de la boîte.

Les vitesses spécifiques ont été calculées pour chaque concentration de flavonolignanes entre 0 et 24 h après l'ajout des molécules et sont représentées dans la figure IV.20. Les résultats montrent que la silychristine et la silydianine ont peu d'effet significatif quelle que soit la concentration. Par contre, la silybine et l'extrait étudié montrent une diminution importante pour des concentrations de 50 à 100 µg/ml.

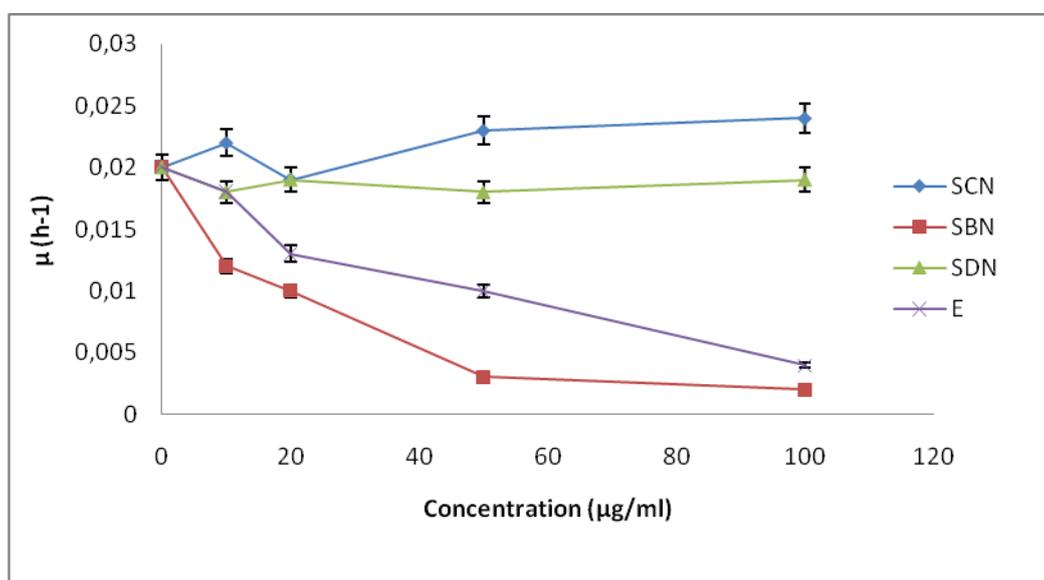


Figure IV. 20 Vitesses spécifiques de croissance (μ, h^{-1}) de cellules Caco2 en présence des flavonolignanes et de l'extrait obtenu par CO_2 supercritique.

D'après la figure IV.20, les résultats obtenus montrent que la silybine et l'extrait obtenu par CO_2 supercritique ont des propriétés cytostatiques mais que la silychristine et la silydianine ne présentent aucune de ces propriétés aux concentrations étudiées.

II.2.2.3.2. Mortalité cellulaire

La cytotoxicité est ici déterminée par le pourcentage de mortalité qui est mis en évidence par un test rouge neutre après 48 h de culture en présence des molécules d'intérêt. Ce test est basé sur la diffusion du rouge neutre à l'intérieur des cellules et son accumulation sur les membranes des lysosomes des cellules vivantes. Le dosage par spectrophotométrie

après addition du colorant permet de déterminer le pourcentage des cellules vivantes après 48h d'incubation avec ou sans ajout des flavonolignanes. Pour vérifier si l'arrêt de la croissance est effectivement limité à 24 h avec reprise ensuite de la croissance ou si l'arrêt de la croissance est accompagné d'un décès cellulaire. La mortalité est évaluée après 48 h de contact avec les flavonolignanes.

La figure IV.21 représente les pourcentages de mortalité des cellules Caco2 en fonction des différentes concentrations des flavonolignanes et du mélange pur obtenus par CO₂ supercritique. La vitesse apparente de croissance des cellules en présence de la silychristine et de la silydianine est sensiblement similaire aux cellules témoins ce qui prouve que ces deux flavonolignanes n'ont pas d'effet important sur les cellules avec des taux de mortalités inférieures à 20%.

Pour ce qui est de la silybine, qui le flavonolignane le plus actif, l'effet cytotoxique est significatif avec 42 % de mortalité et 52 % de mortalité respectivement à 50 et 100 µg/ml. Ces résultats montrent que la reprise de croissance qui semblait avoir lieu entre 24 et 48h n'a en fait pas lieu et que les hypothèses d'un artéfact lié à la présence importante de débris cellulaires ou d'agrégats moléculaires sont davantage fondés.

L'extrait obtenu à 40°C et à 220 bars est celui ayant la plus importante activité antioxydante, il induit également le pourcentage de mortalité le plus élevé (43 à 71% pour des concentrations de 10 à 100 µg/ml). Ceci s'explique par le fait que cet extrait contient l'ensemble des flavonolignanes (silychristine 68 µg/ml, silydianine 121 µg/ml, et la silybine 143 µg/ml). On peut aussi supposer qu'il existe un effet de synergie des molécules ou que cet extrait contient d'autres antioxydants, à part les flavonolignanes, ayant une activité cytotoxique supérieure à celles des flavonolignanes. Ces antioxydants peuvent être des caroténoïdes qui ont été dosés lors des travaux de master.

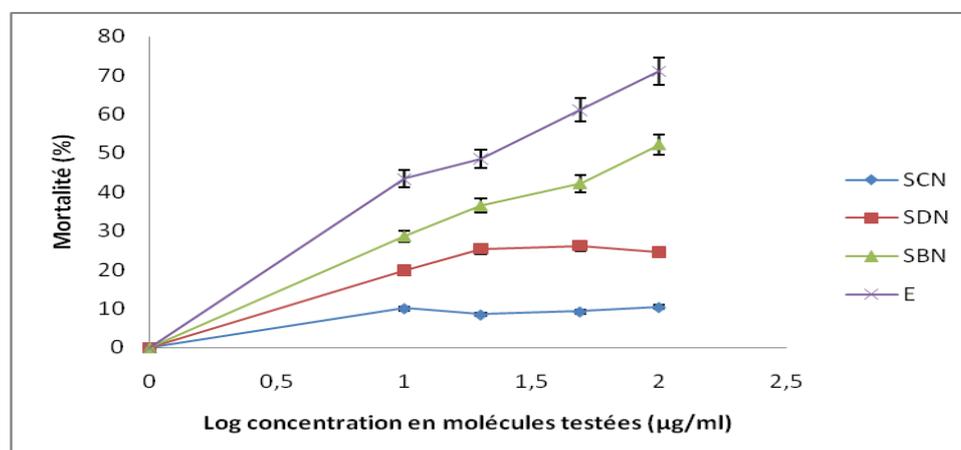


Figure IV. 21 Pourcentage de mortalité des cellules Caco2 après 48h d'exposition déterminé par le test au rouge neutre en fonction de différentes concentrations des flavonolignanes.

Ces résultats nous ont également permis de déterminer la concentration induisant 50% de mortalité appelée CI_{50} . La CI_{50} est de 96 $\mu\text{g/ml}$ et de 70 $\mu\text{g/ml}$ pour la silybine et l'extrait de graines respectivement. C'est à ces concentrations que les flavonolignanes sont les plus toxiques.

Nos résultats sont concordants avec ceux de Hogan et al., 2007 qui ont présenté l'effet cytotoxique de la silybine sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses du colon Fet, Geo, et HCT116. Leurs résultats ont permis de conclure que la silybinine limite de manière significative la prolifération en inhibant le facteur promoteur du cycle cellulaire et le test MTT a permis de déterminer que la CI_{50} est de 75 $\mu\text{g/ml}$ pour la silybine pour la lignée Geo et Fet et de 38 $\mu\text{g/ml}$ pour la silybine pour la lignée HCT116.

Certaines études menées sur d'autres cellules cancéreuses ont évalué la cytotoxicité de la silymarine et ont déterminé la concentration à laquelle elle serait la plus efficace. Les travaux d'Ahmad et al., 1998 réalisés sur les cellules épidermiques humaines A431 ont montré que l'administration de doses de silymarine dépend de la dose administrée et du temps. Le traitement des cellules A431 avec la silymarine a eu comme conséquence une inhibition significative de la croissance des cellules et a permis de montrer qu'à des concentrations beaucoup plus élevées de silymarine (75, 100 et 150 mg/ml), aucune croissance de cellules n'a été observée après 24h de traitement dans toute l'étude, avec une réduction du nombre initial de cellules indiquant une lyse cellulaire.

Zi et al., 1998 ont étudié l'effet inhibiteur du traitement par la silymarine en évaluant l'effet antiprolifératif des cellules cancéreuses du sein MDA-MB468 et ont montré qu'à une concentration de 75 $\mu\text{g/ml}$, la silymarine a un degré important de toxicité contre ce type de carcinome.

Nos résultats présentent un grand intérêt dans l'évaluation de l'activité antioxydante et cytotoxique des flavonolignanes extraits par CO_2 supercritique. D'autres expériences peuvent être envisagées sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses pour étudier la capacité des flavonolignanes extraits par CO_2 supercritique à inhiber leurs proliférations.

Afin d'évaluer une potentielle spécificité de ces molécules vis-à-vis de cellules cancéreuses, il serait intéressant de réaliser une étude cinétique et d'évaluer la toxicité de ces flavonolignanes sur des cellules saines comme par exemple sur des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells).

Références

- Ahmad N., Gali H., Javed S., Agarwal R. Skin Cancer Chemopreventive Effects of a Flavonoid.(1998) *Biophysical research communication*. 248, 294–301.
- Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case.(2000) *Trends in Food Science and Technology*,11,419-421.
- Bandoniene D., Murkovic M., Pfannhauser W., Venskutonis PR., Gruzdiene D. Detection and Activity Evaluation of Radical Scavenging Compounds by Using DPPH Free Radical and on-line HPLC-DPPH Methods. (2002) *European Food Research and Technology*,214, 143-147
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable radical. (1958) *Nature*, 4617. 1200
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. (1995) *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
- Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. (1997) *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 30,609-615
- Brinkmann M., Lütkemeyer D., Gudermann F, Lehmann J. Cytotechnology. New technologies for automated cell counting based on optical image analysis ;The Cellscreen!. (2002) *Institute of Cell Culture Technology, University of Bielefeld, Bielefeld, Germany*,38 (1-3),119-27.
- Cano A., Alcaraz O., Acosta M., Arnao M. B. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{o+} assay. (2002) *Redox Report*,7, 103-109.
- Chailloux N. Synthèse et propriétés amphiphiles des carboxylates de sodium des monoesters des acides α ω dicarboxyliques (2004). Thèse Université de Lille.
- Couteau D., Mc Cartney ,A.L., Gibson, G.R. Williamson, Gibson, G.R., Williamson , G.& Faulds, C.B (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyze chlorogenic acid. *J. Appl. Microbiol*,90,873-881.
- Culpeper N.,. A Physical Directory: Or a Translation of the Dispensatory Made by the College of Physicians of London. (1650) London. Peter Cole, England.
- Dangles O., Fargeix G., Dufour C. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. (1999) *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*, 1387-1395.

- Davis-Searles PR., Nakanishi Y., Kim NC., Graf TN., Oberlies NH., Wani MC., Wall ME., Agarwal R., Kroll DJ.. Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. (2005) *Cancer Res.* 65, 4448–4457.
- Di Mambro VM. , Azzolini AECS, Valim YML., Fonseca MJV. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. (2003) *International Journal of Pharmaceutics*, 262, 93-99.
- Doehmer J., Tewes B. , Klein KU., Gritzko K., Muschick H., Mengs U. Assessment of drug–drug interaction for silymarin. (2008) *Toxicology in Vitro* 22, 3, 610–617.
- Ely H.. Dermatologic therapies you’ve probably never heard of. (1989) *Derm. Clin.*, 7, 19-35
- Ferenci P., Dragosics B., Dittrich H., Frank H., Benda L., Lochs H., Meryn S., Base W., and Schneider B.. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. (1989) *J. Hepatol.*, 9: 105-113.
- Fogh JM., Orfeo T. Cultures human colon cell lines producing tumors in nude mice. (1977) *J.Natl.Acad.Sci*, 59, 221-226.
- Foster S. Milk Thistle: *Silybum marianum*, Rev. ed. (1999) *American Botanical Council, Austin, Tex.*
- Frankel E. N., Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. (2000) *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 1925-1941.
- Gerhäuser C., Klimo K., Heiss E., Neumann I., Gamal-Eldeen A., Knauft J., Liu G.Y., Sitthimonchai S., Frank N. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. (2003) *Mutat . Res*, 523, 163–172.
- Halliwell B., Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. (1990) *Methods Enzymol*, 186, 1-85.
- Hidalgo LJ., Raub TJ., Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. (1989) *Gastroenterology*, 96, 736-749.
- Hogan F S., Krishnegowda N K., Mikhailova M., Kahlenberg M S. Flavonoid, Silibinin, Inhibits Proliferation and Promotes Cell-Cycle Arrest of Human Colon Cancer (2007) *Journal of Surgical Research*, 143, 1 58–65.
- Lin HY., Chou CC. Antioxidative activities of water-soluble disaccharide chitosan derivatives. (2004) *Food Research International*, 37, 883-889.

- Luper,. A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. (1998) *Alternative Medicine Review*, 3, 410–421.
- Miller N J., Sampson J., Candeias LP, Bramley PM., Rice-Evans C A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. (1996) *FEBS Letters*, 384, 240-242.
- Miller NJ., Diplock AT., Rice-Evans CA. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. (1995) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 1794-1801.
- Mingoa RT., Nabb DL., Yang CH., Han X. Primary of rat hepatocytes in 96-well plates: effects of extracellular matrix configuration on cytochrome P450 enzyme activity and inductibility, and its application in vitro cytotoxicity screening. (2006) *Toxicity In Vitro*, 21, 165-173.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakrin*. (2004) *J Sci Technol*, 26, 211-216.
- Ozcelik B., Lee JH., Min DB. Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. (2003) *Journal of Food Science*, 68, 487-490.
- Quian H., Nihorimbere V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. (2004) *J. Zhejiang Univ. Sci.* 5, 6, 676-683.
- Ramasamy K., Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. (2008) *Cancer letters*, 269(2), 352–362.
- Re R., Proteggente N., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. (1999) *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-7.
- Ribereau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux, 1968.
- Rice-Evans C., Miller N. J. *Methods Enzymol.* 1994, 234, 279-293.
- Roche M., Dufour C., Mora N. Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. (2005) *Organic Biomolecular Chemistry*. 3, 423-430.
- Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. (1985) *Biochimie*, 68, 1035-1040.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Saavedra G., Murcia MA., Jimenez A M., Codina C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. (2003) *Life Sciences*, 73, 1667–168.
- Pinkernell U., Lüke HJ., Karst U. Selective Photometric Determination of Peroxycarboxylic Acids in the Presence of Hydrogen Peroxide. (1997) *Analyst*, 122, 567 - 571.

- Pinto M., Rabine-Leon S., Appray MD., Kedinger., Tradou N., Dussaulx E., Louroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. (1983) *Biology.Cell*, 47, 323-330.
- Prior RL. , X. Wu, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. (2005) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Prior R. L., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. (2005) *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Salmi HA. , Sarna S. Effect of silymarin on chemical, functional, and morphological alterations of the liver. A double-blind controlled study. (1982) *Scand J Gastroenterol.* 17(4), 517-21.
- Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. (2002) *Free Radical Research*, 36, 177-187
- Šeršeň F., Vencel T., Annus J. Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. (2006) *Fitoterapia* ,77 ,525–529
- Syndicat National des Producteurs d'Additifs Alimentaires, Les additifs autorisés dans les produits alimentaires. SYNPA. (1996), 276.
- Wellington K., Jarvis B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders. (2001) *BioDrugs* 15, 465–489.
- Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T., Terao J. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. (1998) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 1201-1204.
- Yen GC. , Duth PD. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active-oxygen species. *J. of agric. And food chem.* 42, 1994,629-632.
- Zhao J., Agarwal R. Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implications in cancer chemoprevention (1999) *Carcinogenesis*, 20 (11), 2101-2108.
- Zi, X., Feyes, D. K., Agarwal, R. , 1998. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin. Cancer Res.* 4,p1055–1064.

Conclusion Générale

L'un des objectifs de notre travail est d'expérimenter deux techniques d'extraction à partir des graines de *Silybum marianum.L.*

Après une étude bibliographique visant à mettre en évidence les avantages et les inconvénients des deux procédés d'extraction, nous avons pu mettre en place une technique d'extraction par solvant organique selon la méthode de Soxhlet et un procédé plus récent qui est l'extraction dynamique par CO₂ supercritique.

L'extraction par solvants organiques met en évidence l'influence du solvant d'extraction (trois solvant ont été utilisés : l'hexane, l'éther de pétrole et le chloroforme) alors que l'extraction par CO₂ supercritique met en évidence plusieurs paramètres parmi les quels figurent la pression, la température, le temps de contact entre la matrice végétale et le CO₂-SC, le diamètre moyen des particules et l'ajout d'un co-solvant.

Du point vue rendement, cette expérimentation a permis de :

- ✓ déterminer le solvant d'extraction par Soxhlet le plus efficace tout en prenant en compte le degré de toxicité du solvant dans la suite des analyses,
- ✓ déterminer les conditions opératoires les plus favorables à l'extraction par CO₂-SC,
- ✓ étudier expérimentalement les effets des variables opératoires sur la cinétique d'extraction,
- ✓ déterminer expérimentalement les meilleures conditions de récupération de l'extrait.
- ✓ comparer les deux procédés d'extraction,
- ✓ comparer les résultats expérimentaux avec ceux obtenus avec le modèle de Reverchon et Sesti Osseo (1994).

De point de vue quantitatif l'extraction par CO₂-SC donne le meilleur rendement d'extraction ; ce rendement est obtenu à haute pression (220 bar) et à basse température (40°C), cette température est proche de celle du point critique du CO₂-SC ce qui limite les coûts de ce procédé. La température et la pression sont les paramètres les plus influents de cette technique ; la granulométrie reste une condition opératoire non négligeable puisque plus la taille des particules de la matrice végétale sont élevée plus la masse de l'extrait est faible.

Nous pourrions donc déduire qu'avec le chloroforme, le procédé offre le rendement le plus élevé (28,85%) mais reste inférieure à celui obtenu par CO₂-SC et qu'à 220 bar et de 40 à 50 °C on obtient la masse la plus élevée d'extrait (32,37%).

La cinétique d'extraction est influencée par la pression qui en augmentant donne une meilleure efficacité du solvant et une élévation de la vitesse d'extraction, par contre elle diminue lors d'une élévation de la température.

L'ajout du co-solvant a été une étape cruciale dans les analyses chromatographiques des extraits afin d'identifier les flavonolignanes puisque l'extraction au CO₂-SC n'a donné aucune détection de ces antioxydants et dans les mêmes conditions de température de pression et avec ajout de co-solvant (éthanol) ces flavonolignanes sont identifiées par leurs spectres de fluorescence et par leurs temps de rétention.

L'analyse chromatographique a permis d'identifier et de quantifier les flavonolignanes dans les extraits de graines obtenus par solvants organiques et par CO₂-SC avec co-solvant. L'identification des 3 principales flavonolignanes par HPLC a été menée selon deux gradients proposés par Quaglia et al. (1998) et ce qui nous a permis de détecter la silychristine ($t_r = 8.78$ min), la silydianine ($t_r = 9.60$ min) et la silybine ($t_r = 12.25$ min), aussi la taxifoline ($t_r = 6,44$ min) qui est aussi un flavonoïde de la graine. La nécessité d'identifier la taxifoline dans l'extrait pur a été nécessaire dans les gradients et les conditions d'analyse chromatographique.

L'étude quantitative nous ont permis de mettre en évidence ces résultats :

Pour l'extraction aux solvants organiques :

- ✓ Le chloroforme a permis d'extraire le taux le plus élevé de silychristine (17.18mg/g).
- ✓ L'hexane a permis d'extraire le taux le plus élevé de silydianine (20,03 mg/g) et de silybine (18,19 mg/g).

Pour l'extraction par CO₂-SC avec co-solvant :

- ✓ La concentration la plus élevée est obtenue à une pression de
 - 180 bar pour la silychristine (32,36 mg/g)
 - 220 bar pour la silydianine (38,87 mg/g)
 - 220 bar pour la silybine (45,91 mg/g)

- ✓ La concentration la plus élevée est obtenue à une température de 40°C
 - pour la silychristine (31,97mg/g)
 - pour la silydianine (38,87 mg/g)
 - pour la silybine (45,91 mg/g)

Les extraits huileux obtenus à 220 bar et à 40°C des graines de *Silybum marianum* sont riches en acides gras dont les principaux sont :

- Acide linoléique : oméga 6 65,22%
- Acide oléique : oméga 9 27,01%
- Acide palmitique 12,12%

L'outil analytique apporte les réponses nécessaires à l'exploitation des extraits dans différents domaines surtout cosmétique et pharmacologique mais des précisions restent à apporter et à compléter dans le but de valoriser cette plante en antioxydants.

De ceci découle l'un des objectifs principaux de nos travaux qui consiste à tester biologiquement les extraits de graines obtenus et pour ceci on a :

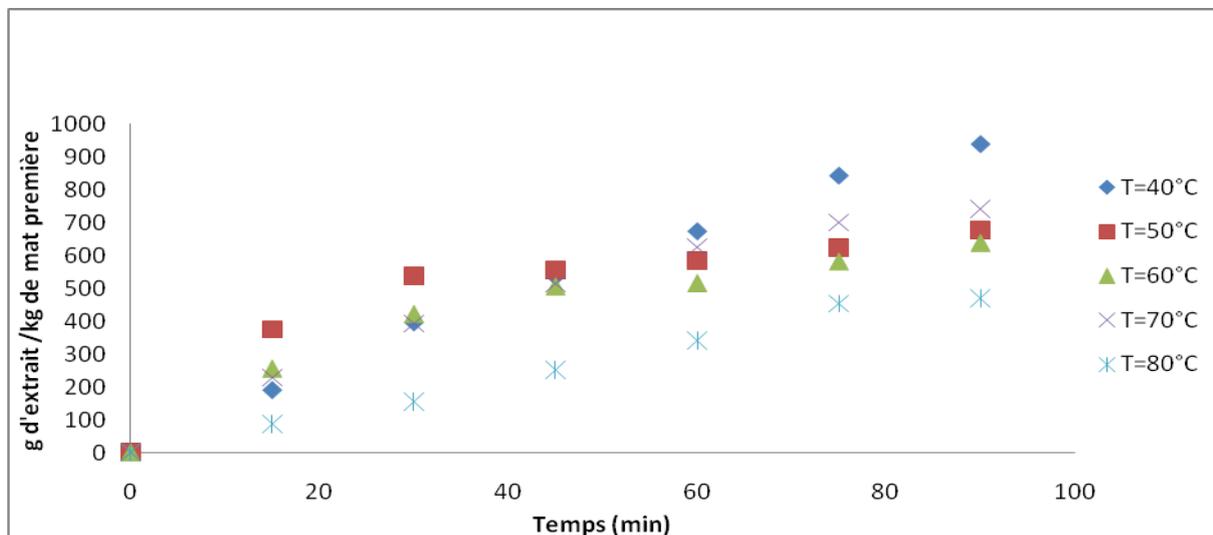
- ✓ Evalué l'activité antioxydante par deux tests : test DPPH et test ABTS ; ces deux tests sont complémentaires et ont permis de conclure que les deux tests affirment que l'extrait ayant un effet antioxydant le plus important est l'extrait obtenu par CO₂-SC à 220 bar et à 40°C.
- ✓ Testé l'extrait sur une lignée cellulaire cancéreuse du colon Caco-2. La silychristine, la silydianine et la silybine ainsi que l'extrait obtenu par CO₂-SC avec co-solvant (éthanol) à 220 bar et à 40°C ont été testés en présence de cette lignée cancéreuse. Les résultats de ces expérimentations in vitro reflètent la concentration en flavonoïdes et l'activité antioxydante des extraits obtenus par CO₂-SC et prouvent que l'extrait a une activité cytotoxique estimable équivalente et supérieure (dépendant de la concentration de la molécule et de l'extrait) à la silybine qui est un antioxydant ayant un pouvoir anticancéreux important par rapport à cette lignée et par rapport à de nombreuses autres lignées cancéreuses.

Ainsi nous pouvons résumer la nature des perspectives de recherche de la manière suivante :

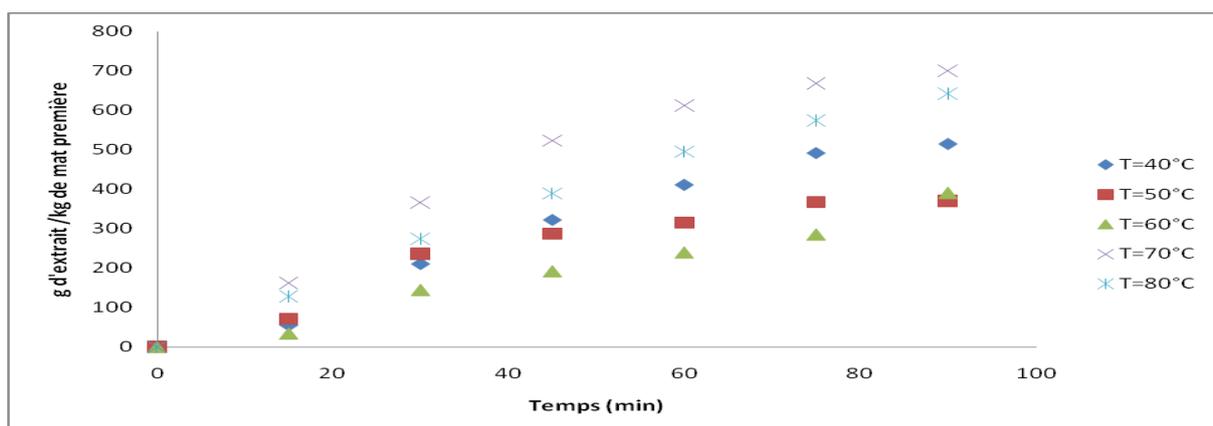
- Séparation des flavonolignanes sur le pilote d'extraction par CO₂ supercritique par une meilleure utilisation des séparateurs.
- Etude de la possibilité de couplage d'une chromatographie supercritique au pilote d'extraction supercritique (réalisation du montage)
- Etude de l'activité antioxydante par le test de FRAP (Ferric reducing ability of plasma)
- Etude des activités antibactérienne et antifongique (par exemple : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*) des flavonolignanes extraits des graines de *Silybum marianum*.
- Etude de l'activité antivirale et plus précisément celle contre le VIH
- Etude de l'activité antitumorale des flavonolignanes sur les cellules cancéreuses hépatiques et rénales et autres...

ANNEXES

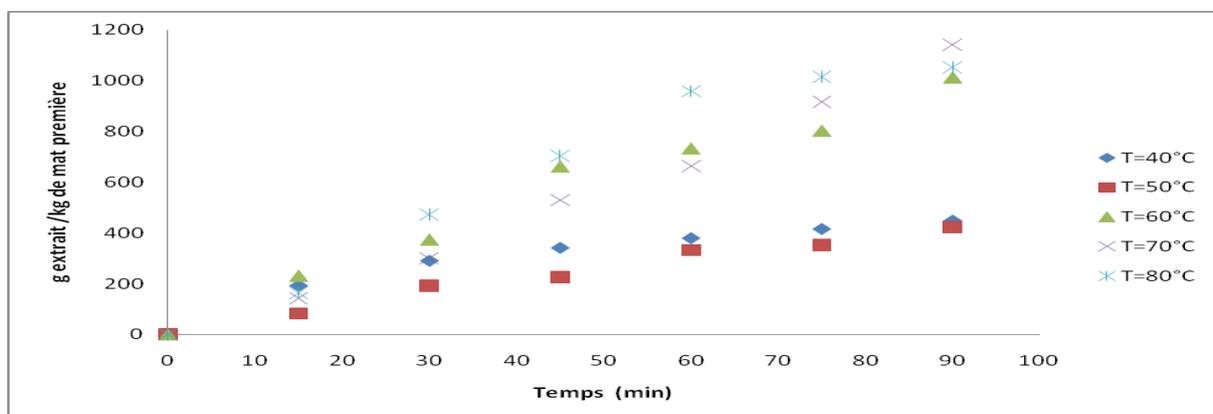
Annexe 1 Cinétique d'extraction en fonction de la température



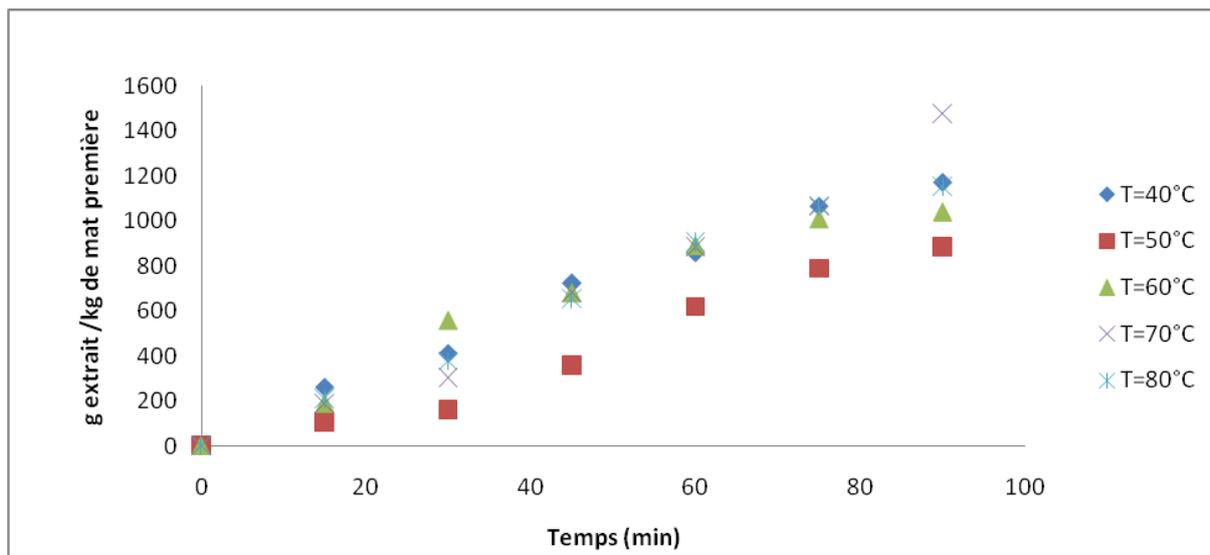
Cinétique d'extraction à P=100 bar (avec co-solvant)



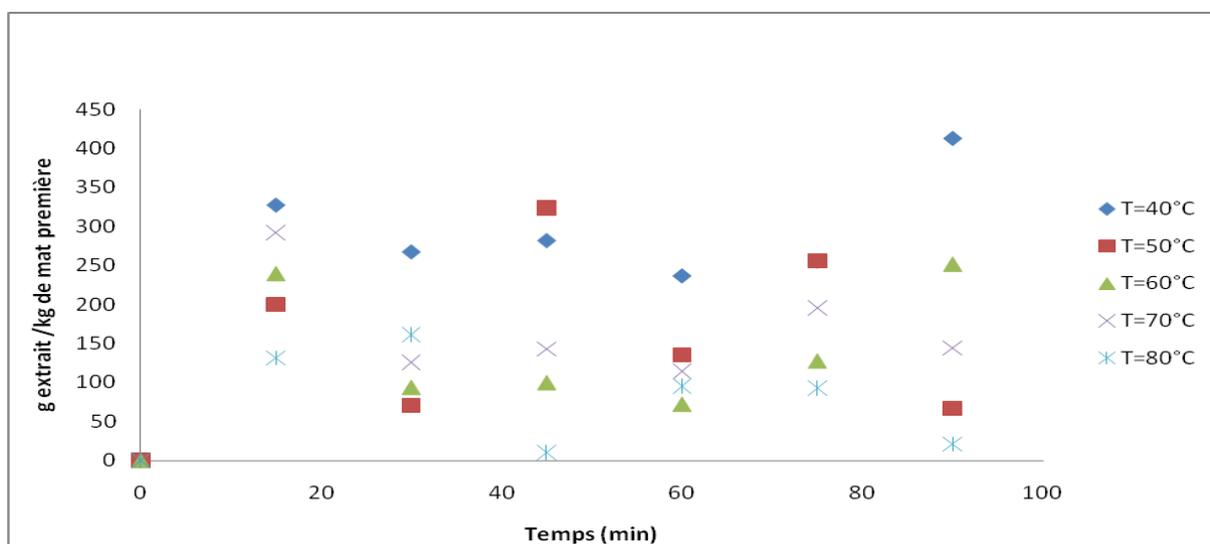
Cinétique d'extraction à P=120 bar (avec co-solvant)



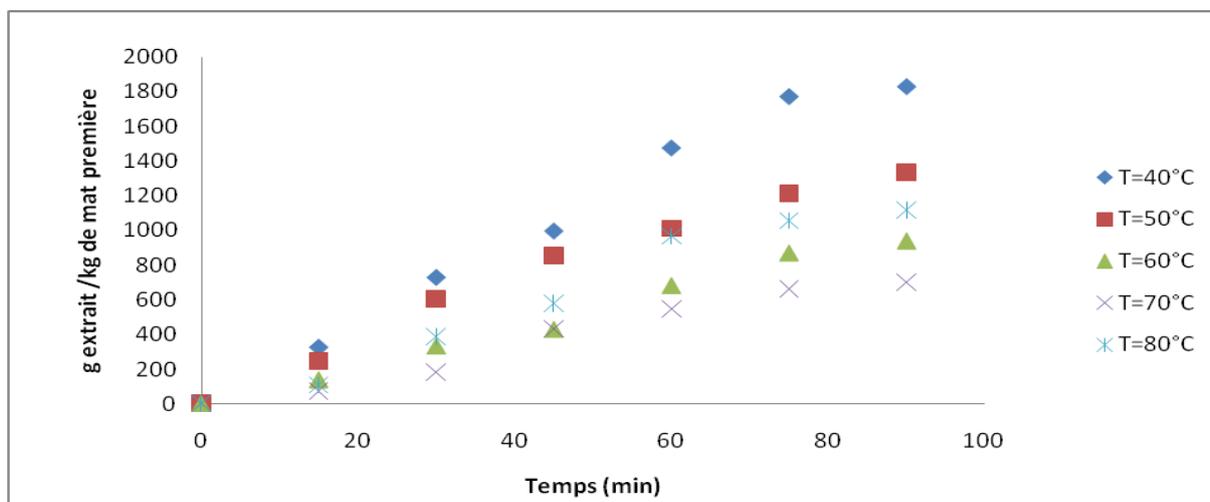
Cinétique d'extraction à P=140 bar (avec co-solvant)



Cinétique d'extraction à P=160 bar (avec co-solvant)

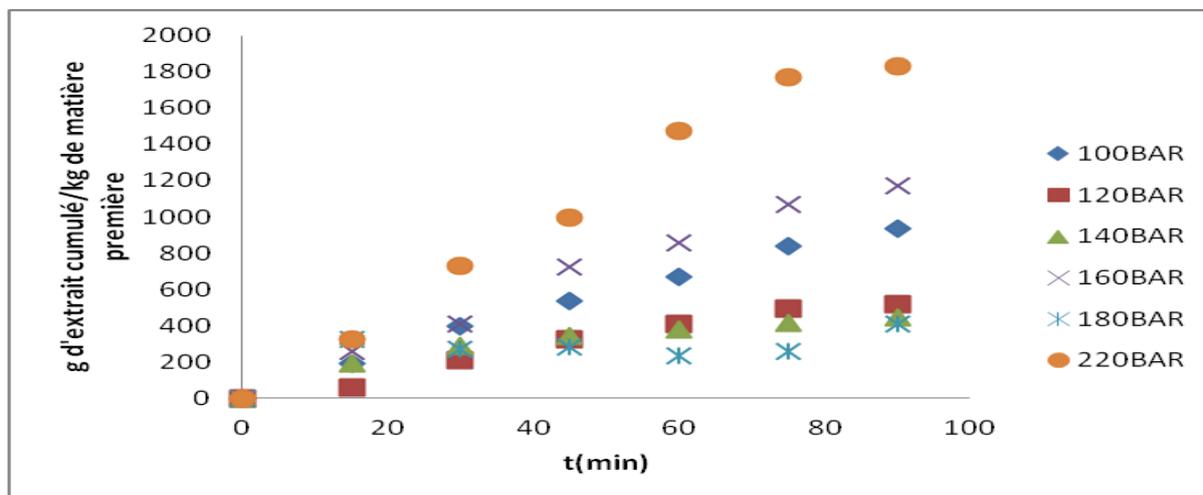


Cinétique d'extraction à P=180 bar (avec co-solvant)

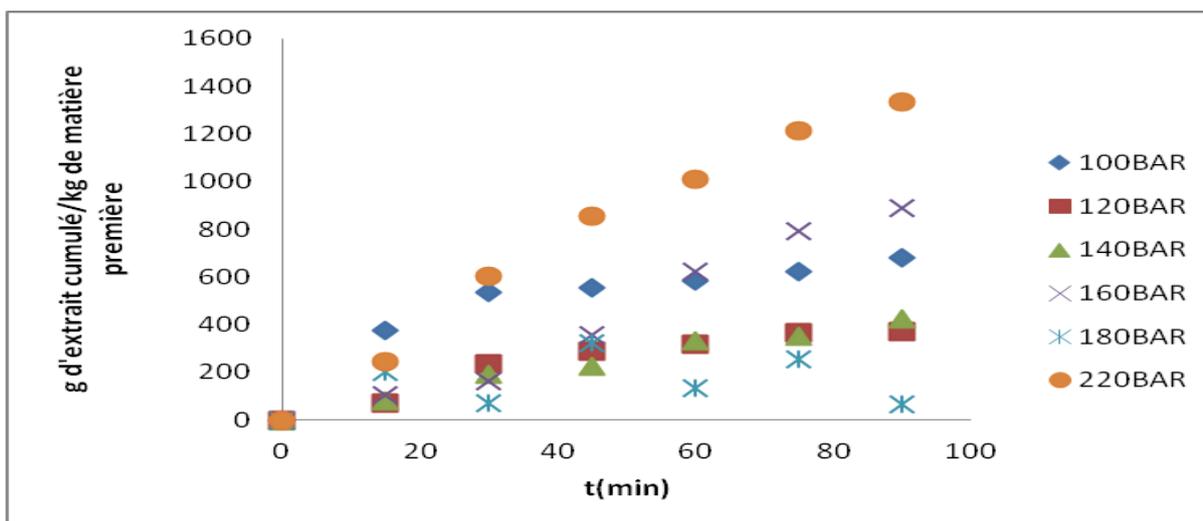


Cinétique d'extraction à P=220 bar (avec co-solvant)

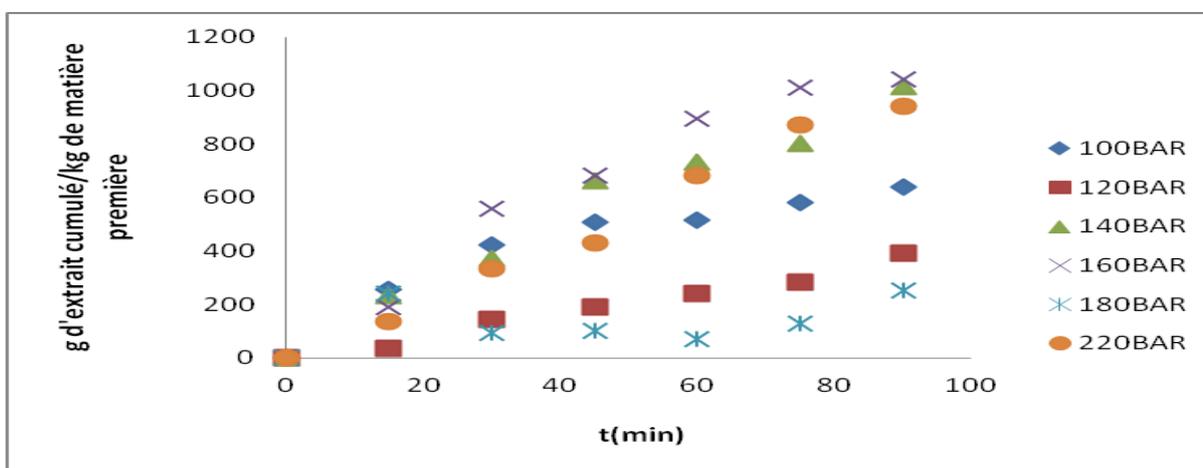
Annexe 2 Cinétique d'extraction en fonction de la pression



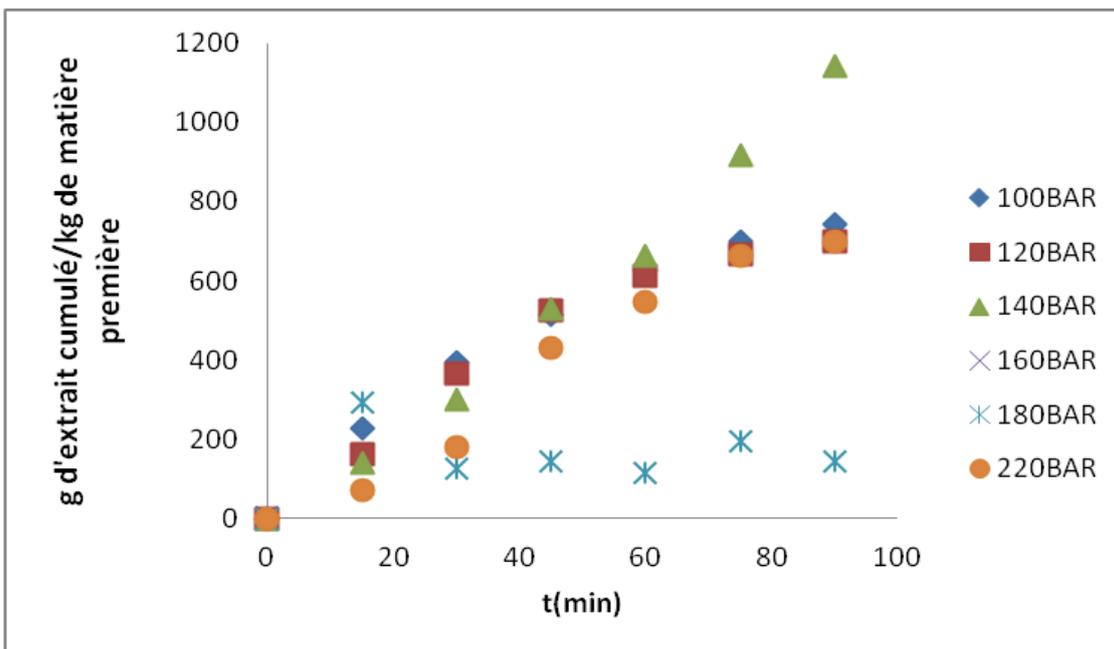
Cinétique d'extraction à T=40 °C (avec co-solvant)



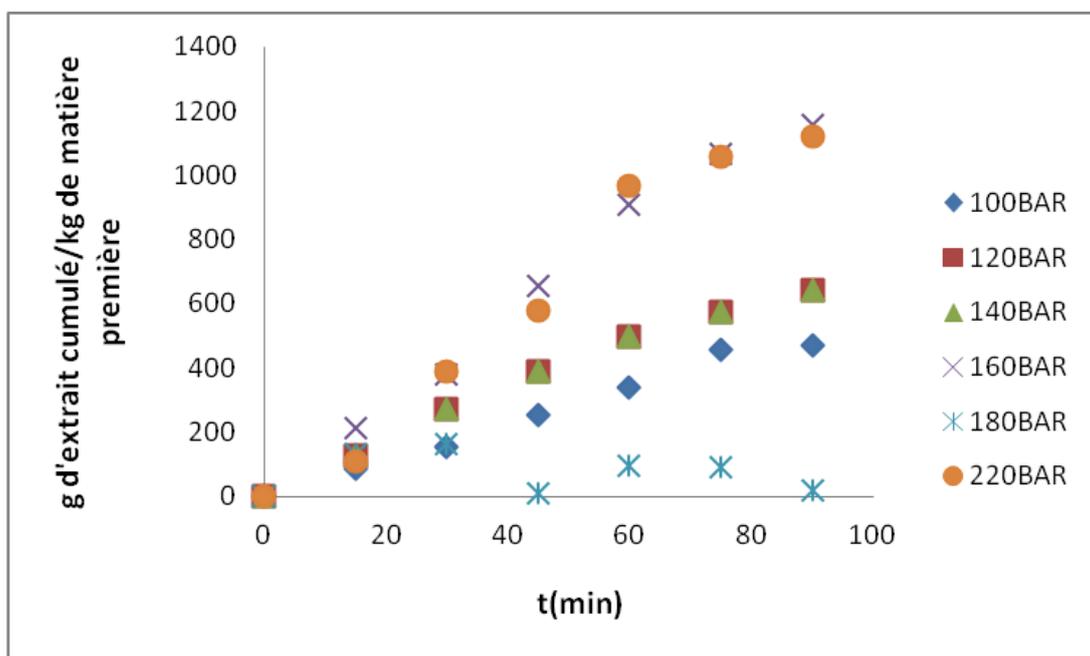
Cinétique d'extraction à T=50 °C (avec co-solvant)



Cinétique d'extraction à T=60 °C (avec co-solvant)



Cinétique d'extraction à T=70 °C (avec co-solvant)



Cinétique d'extraction à T=80 °C (avec co-solvant)

**Annexe 3 Modèle avec extraction uniforme tout au long du lit
(Reverchon et Sesti Osseo 1994)**

Equations du modèle et solutions

Avec les hypothèses du modèle, le bilan de matière à travers un élément de l'extracteur de longueur dz , se traduit par la relation suivante :

$$-\varepsilon_1 U_z \frac{\partial C_f}{\partial z} = \varepsilon_1 \frac{\partial C_f}{\partial t} + (1 - \varepsilon_1) \frac{\partial C_s}{\partial t} \quad \text{Equation 1}$$

En exprimant la vitesse de transfert en (kg/s), les auteurs proposent la relation suivante

$$UV \frac{\partial C_f}{\partial z} + \varepsilon_1 V \frac{\partial C_f}{\partial t} + (1 - \varepsilon_1) V \frac{\partial C_s}{\partial t} = 0 \quad \text{Equation 2}$$

où U est la vitesse superficielle en (m/s) ; V le volume de l'extracteur en (m^3) ; C_f et C_s les concentrations en phase fluide et solide respectivement en (kg/m^3). En supposant un gradient de transfert linéaire, le bilan en phase solide s'écrit :

$$(1 - \varepsilon_1) V \frac{\partial C_s}{\partial t} = A_p k'_s (C_s - C^*) \quad \text{Equation 3}$$

où : A_p est la surface de la particule (m^2) ;

k'_s est le coefficient de transfert dans le solide (m/s) ;

C^* est la concentration à l'interface du solide (kg/m^3).

En supposant que l'extraction est uniforme tout au long du lit, le terme $\frac{\partial C_f}{\partial z}$ désignant le gradient de concentration dans le lit, devient constant et l'équation 2 est alors réduite à une équation différentielle ordinaire (EDO) :

$$UV \frac{C_f}{z} + \varepsilon_1 V \frac{dC_f}{dt} + (1 - \varepsilon_1) V \frac{dC_s}{dt} = 0 \quad \text{Equation 4}$$

En introduisant le débit volumique Q_v , cette équation peut être écrite d'une manière plus simple :

$$\frac{Q_v}{\rho_f} C_f + \varepsilon_1 V \frac{dC_f}{dt} + (1 - \varepsilon_1) V \frac{dC_s}{dt} = 0 \quad \text{Equation 5}$$

L'hypothèse d'une extraction uniforme est justifiée en considérant le lit d'extraction constitué de n étages théoriques. Ainsi pour chaque étage on peut écrire le bilan de la manière suivante :

$$\frac{Q_V}{\rho_f} (C_{fn} - C_{f(n-1)}) + \varepsilon_1 \frac{V}{n} \frac{dC_{fn}}{dt} + \left((1 - \varepsilon_1) \frac{V}{n} \right) \frac{dC_{sn}}{dt} = 0 \quad \text{Equation 6}$$

où : C_{fn} est la concentration dans la phase fluide du n ème étage ; C_{sn} est la concentration dans la phase solide du n ème étage ; n est le nombre d'étage du lit.

Les auteurs ont montré que la résolution du système pour $n = 2$ ne produit aucun changement sur la modélisation des résultats expérimentaux réalisée lors de l'extraction.

Le terme $\frac{A_p k'_s}{(1 - \varepsilon_1 V)}$ de l'équation 3 est constant et à une dimension de s^{-1} , donc on peut le

substituer par le temps caractéristique, $1/t_i$, où t_i représente le temps de diffusion interne défini par Villermaux (1987).

Le paramètre k'_s ne représente que le transfert interne, et l'équation 3 est réécrite de la manière suivante :

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{1}{t_i} (C_s - C^*) \quad \text{Equation 7}$$

Les équations 5 et 6 ainsi écrites peuvent être résolues en introduisant la relation d'équilibre suivante :

$$C_f = k_p C^* \quad \text{Equation 8}$$

Les conditions initiales et au limites pour le modèle sont traduites par les expressions suivantes :

$$C_f(z, t = 0) = 0 \quad \text{Equation 9}$$

$$C_s(z, t = 0) = C_{s0} \quad \text{Equation 10}$$

$$C_f(z = 0, t) = 0 \quad \text{Equation 11}$$

Dans de telles conditions, le système d'équations 6 à 11 admet une solution analytique donnant le profil de concentration du soluté dans le solide.

$$C_s = C_{s0} \exp \left(\frac{-k_p t}{\frac{(1-\varepsilon_1)V\rho_f}{Q_v} + k_p t_i} \right) \quad \text{Equation 12}$$

Dans le cas général, il apparaît d'après l'équation 12, que les paramètres du modèle sont k_p et t_i qui est lié à la diffusivité D_i . Dans notre cas, on peut mettre en évidence que le terme $k_p t_i$ est plus important comparé au terme $\frac{(1-\varepsilon_1)V\rho_f}{Q_v}$ ce qui aura pour conséquence d'obtenir un modèle à un seul paramètre.

En effet, en introduisant le rendement normalisé $Y_N(t)$, on obtient la relation :

$$Y_N(t) = 100 \left[1 - \exp \left(\frac{-k_p t}{\frac{(1-\varepsilon_1)V\rho_f}{Q_v} + k_p t_i} \right) \right] \quad \text{Equation 13}$$

qui dans le cas où la diffusion interne est l'étape limitante du transfert, le terme $k_p t_i$ est plus important comparé au terme $\frac{(1-\varepsilon_1)V\rho_f}{Q_v}$, de telle manière qu'il peut être négligé et l'équation 13 est réécrite de la manière suivante :

$$Y_N(t) = 100 \left[1 - \exp \left(\frac{t}{t_i} \right) \right] \quad \text{Equation 14}$$

Villiermaux (1987) a démontré l'équivalence entre le temps de diffusion interne t_i (s) et le coefficient de diffusion D_i (m^2/s) pour différentes formes géométriques des particules. Il propose la relation suivante :

$$t_i = \mu \frac{l^2}{D_i} \quad \text{Equation 15}$$

Pour des particules sphériques de rayon « r », μ est égal à $3/5$ et $l = V_p / A_p$, l'équation 15 devient :

$$t_i = \frac{3}{5D_i} \left(\frac{r}{3} \right)^2 \quad \text{Equation 16}$$

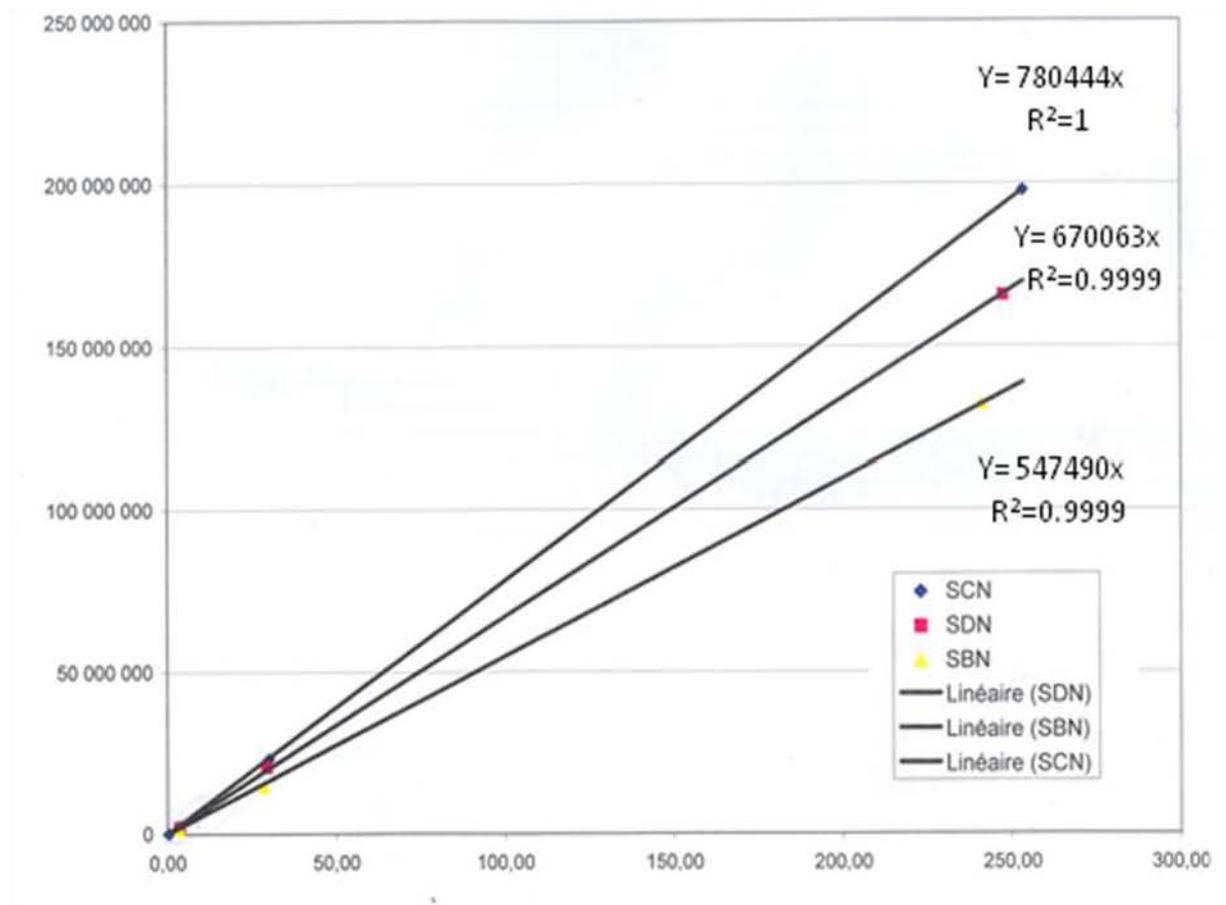
Le paramètre du modèle, c'est-à-dire le coefficient de diffusion D_i (tel que défini par l'équation 15) est ajusté en minimisant l'erreur relative moyenne sur les rendements expérimentaux et théoriques. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau Coefficient de diffusion (D_i) du modèle avec extraction uniforme.

Co-solvant	Sans co-solvant							
	180 bar				220bar			
Pression (bar)								
Température (°C)	40	60	70	80	40	60	70	80
$D_i \times 10^{13}$ (m ² /s)	1,13	7,53	1,34	4,10	3,05	2,048	9,75	1,50

Les résultats montrent que le coefficient de diffusion D_i augmente toujours avec la pression, par contre, l'effet de la température est différent selon la pression. L'ordre de grandeur de D_i ainsi que son évolution avec la pression et la température sont analogues à ceux de D_{app} .

Annexe 4 Courbe d'étalonnage des flavonolignanes (silychristine (SCN) ; silybine (SBN) ; silydianine (SDN))



Annexe 5 Fiches techniques des flavonolignanes

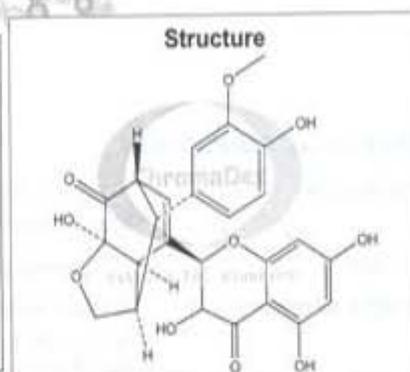
Fiche technique de la silydianine (SDN)

ChromaDex™

setting THE standard

Certificate of Analysis

PRODUCT	Silydianin
PART NUMBER	00019245
STANDARD TYPE	Primary (P)
LOT NUMBER	00019245-0364
REPORT NUMBER	CDXA-RSS-3322-00
CDXA NUMBER	CDXA-09-0364
DATE OF SAMPLE	01/23/2009
DATE OF REPORT	02/11/2009



NAME	Silydianin
OTHER NAME	Silidianin; Silybum substance E5
CHEMICAL FORMULA	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀
MOLECULAR WEIGHT (MW)	482.44
PUBLISHED MELTING POINT	191 °C
CAS NUMBER	[29782-68-1]
EINECS	249-848-5
CHEMICAL FAMILY	Flavonoids
FROM	<i>Silybum marianum</i>

ANALYTICAL RESULTS

TEST	METHOD	SPECIFICATION	RESULT
Adjusted Purity	NA	NA	93.2%
HPLC	CDXA-CPM-056-00	NA	96.9%
NMR	99.1-CD-1.0-000122	Conforms	Conforms
Mass Spectrum	Direct Infusion, ESI (-)	Conforms	Conforms
Residual Solvent	99.1-CD-2.0-000115	NA	Methanol - 1.6%
Water	99.1-CDXA-1.0-000094	NA	2.2%
Appearance	NA	NA	Off-White Powder

ADJUSTED PURITY: 93.2% IS BASED ON (100% - 2.2% WATER - 1.6% SOLVENTS) X 96.9% HPLC

STORAGE CONDITIONS

STORAGE	-20 °C in a dry place.
EXPIRATION DATE	01/2014 under the above conditions.

Sylesh
Venkataraman, Ph.D.

Digitally signed by Sylesh Venkataraman,
Ph.D.
DN: cn=Sylesh Venkataraman, Ph.D.,
ou=ChromaDex Analytics, Inc.,
email=sylesh@chromadex.com, c=US
Date: 2009.02.11 17:11:58 -0800

ChromaDex

Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

Page 1 of 4

ChromaDex™

setting THE standard

Certificate of Analysis

ANALYTICAL CONDITIONS

INSTRUMENT	AGILENT 1100 HPLC UV-VIS (DAD) DETECTOR (YOUNG), FINNIGAN LCQ-DECA (CURIE)
COLUMN	Phenomenex Luna C18(2) 150 x 2.00 mm, 5 µm particle size; S/N 457709-18
MOBILE PHASE	A - Mill-Q water, B - Acetonitrile; Isocratic 5% B for 5 minutes, then increasing to 95% B over 20 minutes. Hold at 95% B for 5 minutes.
COLUMN TEMP.	60 °C
FLOW RATE	0.4 mL/minute
INJECTION VOL.	0.2 µL
INJECTION CONC.	1.5 mg/mL in Methanol
DETECTION	205 ± 4 nm

HPLC CHROMATOGRAM OF SILYDIANIN (CDXA-09-0364)



 ChromaDex

Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

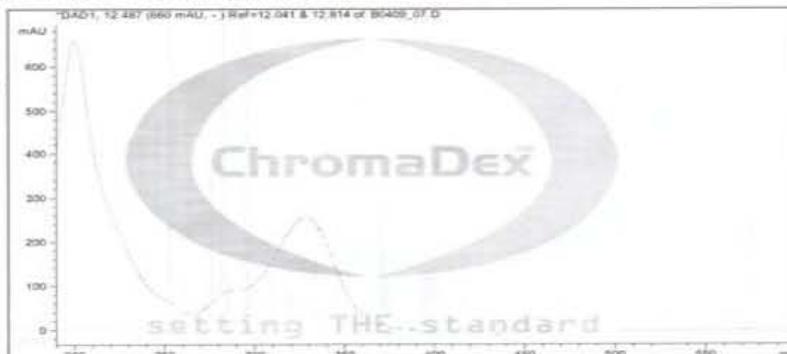
Page 2 of 4

ChromaDex™

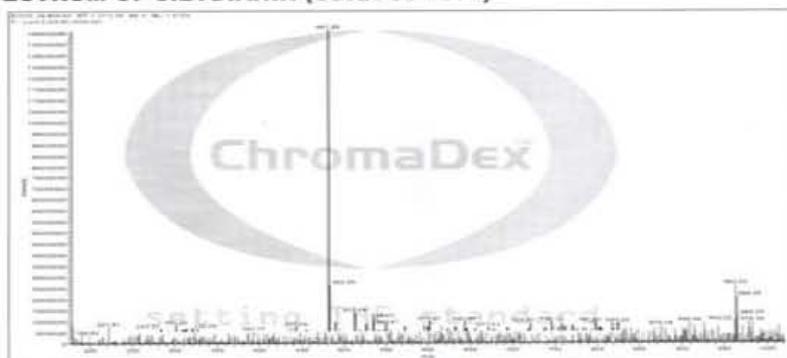
setting THE standard

Certificate of Analysis

UV SPECTRUM AT RT = 12.5 MINUTES



MASS SPECTRUM OF SILYDIANIN (CDXA-09-0364)



ChromaDex

Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

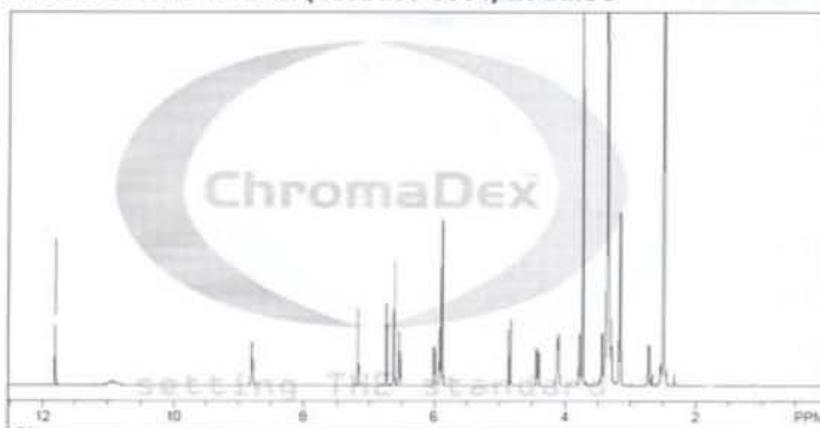
Page 3 of 4

ChromaDex™

setting THE standard

Certificate of Analysis

NMR SPECTRUM OF SILYDIANIN (CDXA-09-0364) IN DMSO



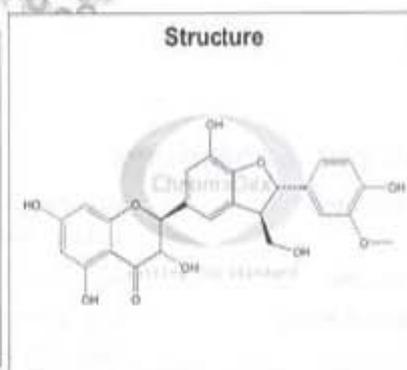
Fiche technique de la silychristine (SCN)

ChromaDex™

setting THE standard

Certificate of Analysis

PRODUCT	Silychristin
PART NUMBER	00019240
STANDARD TYPE	Primary (P)
LOT NUMBER	00019240-0977
REPORT NUMBER	CDXA-RSS-4329-00
CDXA NUMBER	CDXA-11-0977
DATE OF SAMPLE	08/10/2010
DATE OF REPORT	03/31/2011



NAME	Silychristin
OTHER NAME	2-(2,3-Dihydro-7-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(hydroxymethyl)-5-benzofuran-1-yl)-3,5,7-trihydroxy-4-chromanone; Silicristin; Silymarin II
CHEMICAL FORMULA	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₃
MOLECULAR WEIGHT (MW)	482.44
PUBLISHED MELTING POINT	174-176 °C
CAS NUMBER	[33889-69-9]
EINECS	251-720-9
CHEMICAL FAMILY	Flavonoids
FROM	NA

ANALYTICAL RESULTS

TEST	METHOD	SPECIFICATION	RESULT
Adjusted Purity	NA	NA	82.2%
HPLC	CDXA-CPM-056-00	NA	83.5%
NMR	99.1-CD-1.0-000122	Conforms	Conforms
Mass Spectrum	Direct Infusion, ESI (+)	Conforms	Conforms
Residual Solvent	99.1-CD-4.0-000115	NA	Dichloromethane – 0.1% Ethyl acetate – 1.3%
Water	99.1-CDXA-3.0-000094	NA	0.2%
Appearance	NA	NA	White Powder

ADJUSTED PURITY: 82.2% IS BASED ON (100% - 0.2% WATER - 1.4% SOLVENTS) X 83.5% HPLC

STORAGE CONDITIONS

STORAGE	-20 °C in a dry place.
EXPIRATION DATE	08/2015 under the above conditions.

Sylesh
Venkataraman, Ph.D

Digitally signed by Sylesh Venkataraman, Ph.D
DN: cn=Sylesh Venkataraman, Ph.D,
o=ChromaDex Analytical, Inc.
email=sylesh@chromadex.com, c=US
(Date: 2011.03.31 17:19:18 -0400)

Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

Page 1 of 4

ChromaDex™

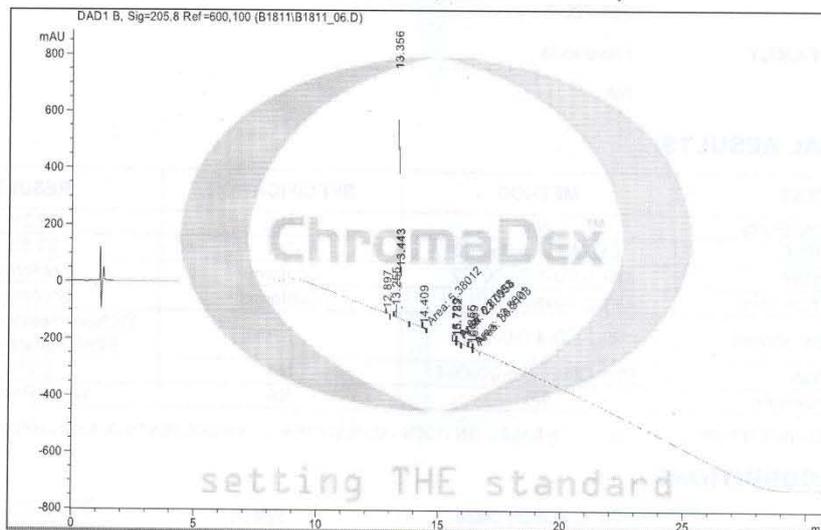
setting THE standard

Certificate of Analysis

ANALYTICAL CONDITIONS

INSTRUMENT	AGILENT 1100 HPLC UV-VIS (DAD) DETECTOR (YOUNG), AGILENT 6510 QTOF (AVOGADRO)
COLUMN	Phenomenex Luna C18(2) 150 x 2.00 mm, 5 µm particle size; S/N 412618-4
MOBILE PHASE	A - 0.1% Trifluoroacetic acid in Milli-Q water, B - Acetonitrile; Isocratic 5% B for 5 minutes, then increasing to 95% B over 20 minutes. Hold at 95% B for 5 minutes.
COLUMN TEMP.	60 °C
FLOW RATE	0.4 mL/minute
INJECTION VOL.	0.2 µL
INJECTION CONC.	0.9 mg/mL in methanol
DETECTION	205 ± 4 nm

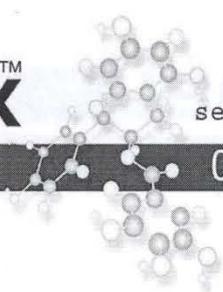
HPLC CHROMATOGRAM OF SILYCHRISTIN (CDXA-11-0977)



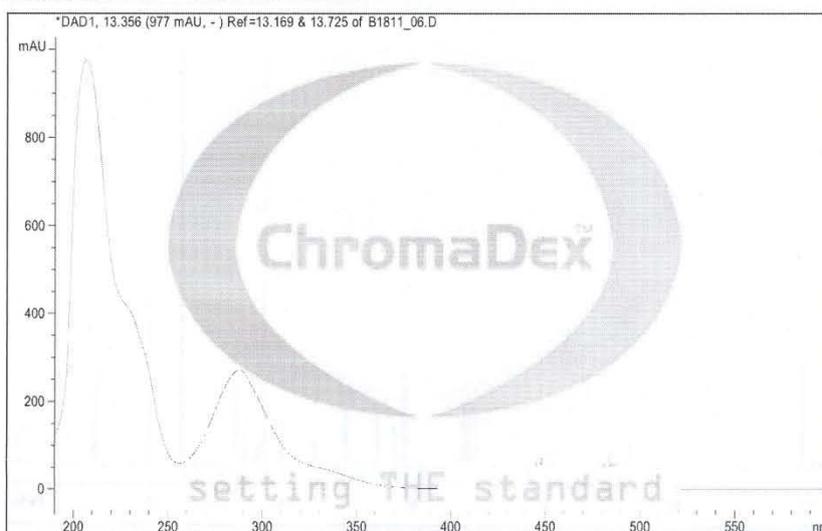
ChromaDex™

setting THE standard

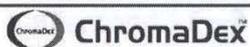
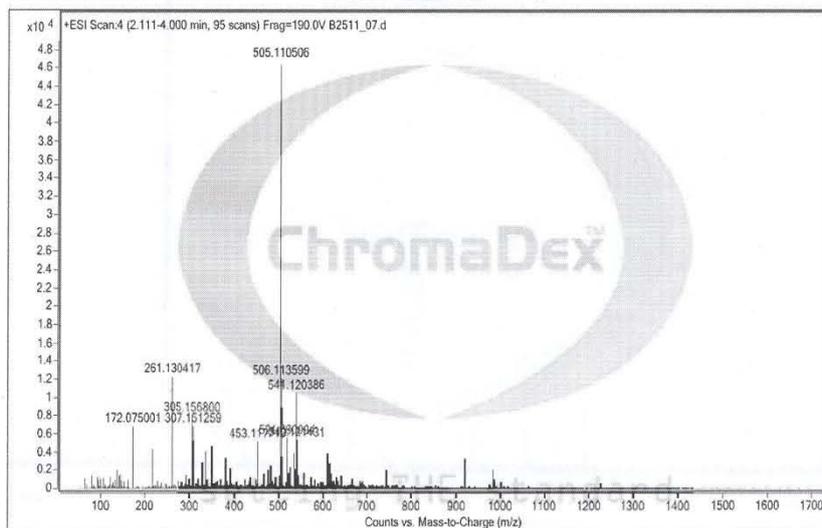
Certificate of Analysis



UV SPECTRUM AT RT = 13.4 MINUTES



MASS SPECTRUM OF SILYCHRISTIN (CDXA-11-0977)



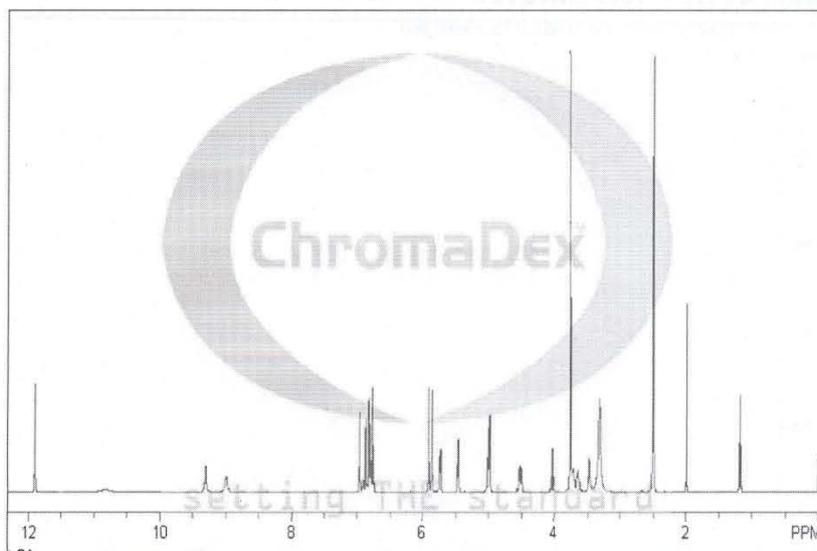
Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

ChromaDex™

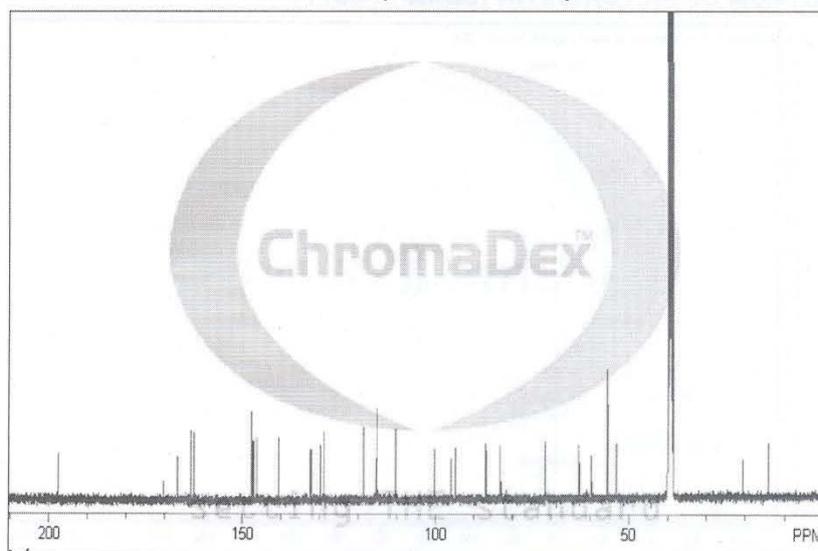
setting THE standard

Certificate of Analysis

¹H-NMR SPECTRUM OF SILYCHRISTIN (CDXA-11-0977) IN DMSO



¹³C-NMR SPECTRUM OF SILYCHRISTIN (CDXA-11-0977) IN DMSO



 ChromaDex™

Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

Page 4 of 4

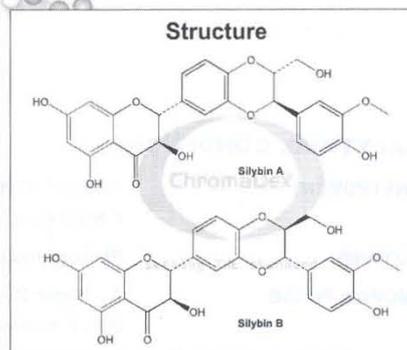
Fiche technique de la silybine (SBN)

ChromaDex™

setting THE standard

Certificate of Analysis

PRODUCT	Silybin (A and B)
PART NUMBER	00019225
STANDARD TYPE	Primary (P)
LOT NUMBER	00019225-755
REPORT NUMBER	CDXA-RSS-012-00
CDXA NUMBER	CDXA007-55E
DATE OF SAMPLE	04/01/2004
DATE OF RE-EVALUATION	08/28/2008
DATE OF REPORT	09/02/2008



NAME	Silybin (A and B)
OTHER NAME	3,5,7-Trihydroxy-2-(3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxan-6-yl)-4-chromanone; Silibinin AB; Silliver; Silybin; Silymarin I
CHEMICAL FORMULA	A - C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀ ; B - C ₂₅ H ₂₂ O ₁₀
MOLECULAR WEIGHT (MW)	A - 482.44; B - 482.44
PUBLISHED MELTING POINT	179-180 °C
CAS NUMBER	[22888-70-6] & [142797-34-0]
EINECS	245-302-5
CHEMICAL FAMILY	Flavonoids
RTECS	DJ2981770

ANALYTICAL RESULTS

TEST	METHOD	SPECIFICATION	RESULT
Adjusted Purity	NA	NA	97.1%
HPLC	CDXA-AM-067-00	NA	A - 47.0%, B - 52.6%
NMR	NA	Conforms	Conforms
Mass Spectrum	Direct Infusion, ESI (-)	Conforms	Conforms
Residual Solvent	CDXA-AM-001-00	NA	Isopropyl alcohol - 1.3% Methanol - 1.2%
Water	CDXA-AM-089-00	NA	ND
Appearance	NA	NA	White Powder

ADJUSTED PURITY: 97.1% IS BASED ON (100% - 0.0% WATER - 2.5% SOLVENTS) X 99.6% HPLC

STORAGE CONDITIONS

STORAGE	+4 °C in a dry place.
EXPIRATION DATE	08/2013 under the above conditions.

Brant
Hoekstra

Digitally signed by Brant Hoekstra
DN: cn=Brant Hoekstra, o=US,
ou=ChromaDex, ou=Reference Standards,
email=Brant.Hoekstra@chromadex.com
Reason: I am approving this document
Date: 2009.08.25 09:17:42 -05'00'

 ChromaDex™

Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

Page 1 of 4

ChromaDex™

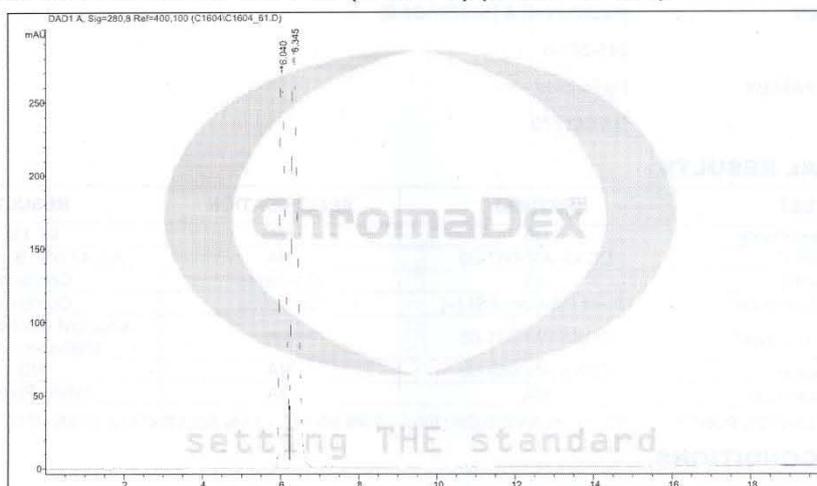
setting THE standard

Certificate of Analysis

ANALYTICAL CONDITIONS

INSTRUMENT	AGILENT 1100 HPLC UV-VIS (DAD) DETECTOR (GALILEI), FINNIGAN LCQ-DECA (CURIE)
COLUMN	Phenomenex Luna C18(2) 150 x 4.6 mm, 5 µm particle size
MOBILE PHASE	A – Water, B – Methanol; 50% B increasing to 100% B over 10 minutes.
COLUMN TEMP.	30 °C
FLOW RATE	1.0 mL/minute
INJECTION VOL.	10 µL
INJECTION CONC.	0.5 mg/mL in methanol
DETECTION	280 ± 4 nm

HPLC CHROMATOGRAM OF SILYBIN (A AND B) (CDXA007-55E)



 ChromaDex™

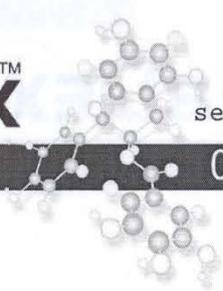
Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

Page 2 of 4

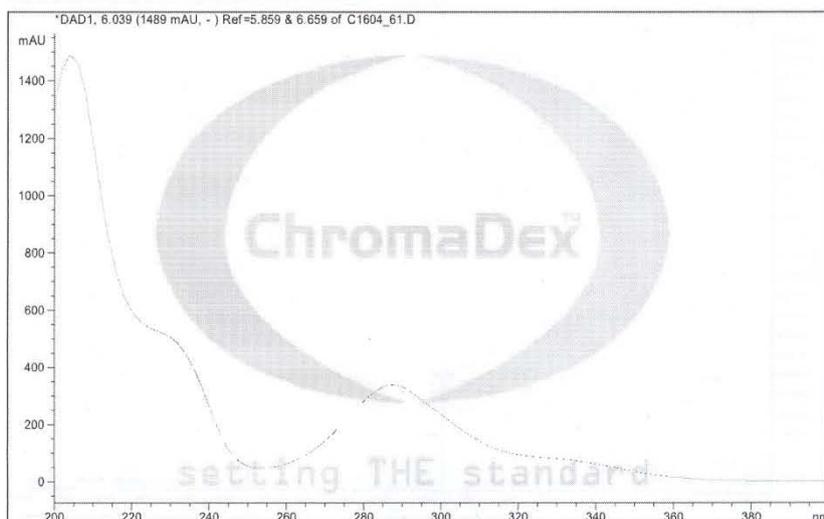
ChromaDex™

setting THE standard

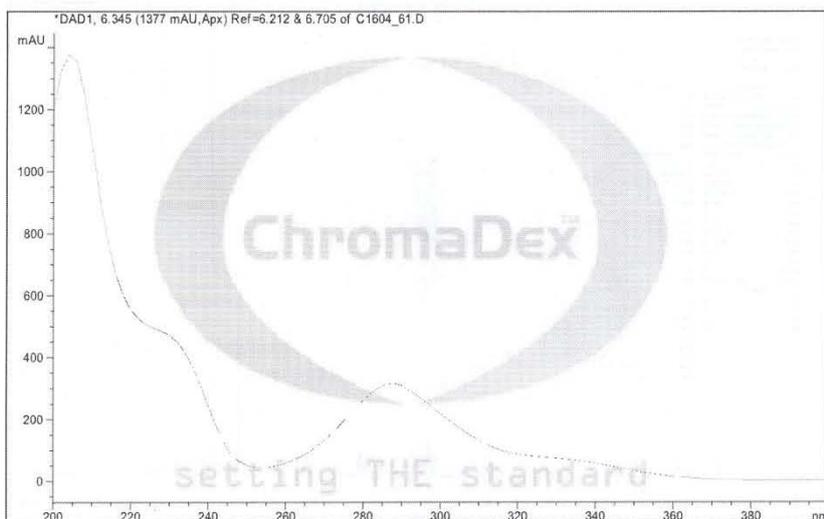
Certificate of Analysis



UV SPECTRUM AT RT = 6.0 MINUTES



UV SPECTRUM AT RT = 6.3 MINUTES

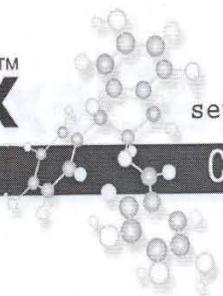


Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

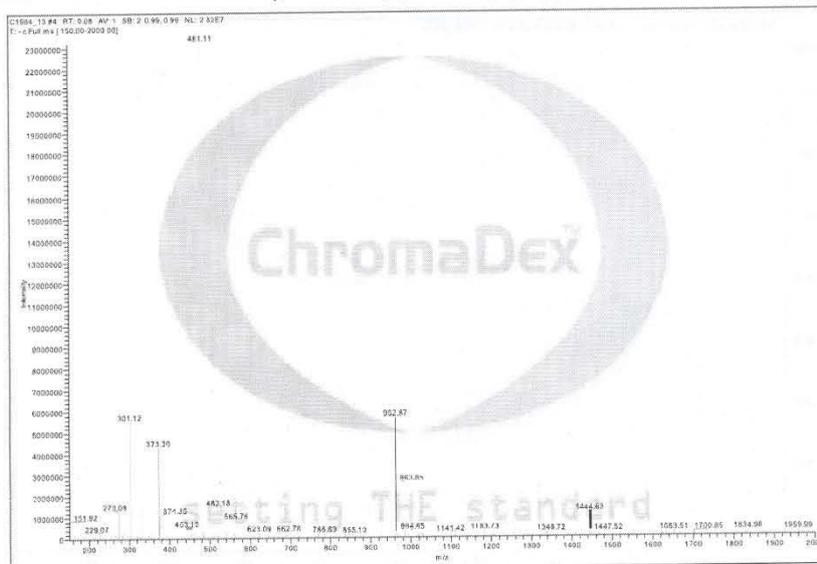
ChromaDex™

setting THE standard

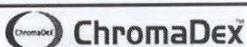
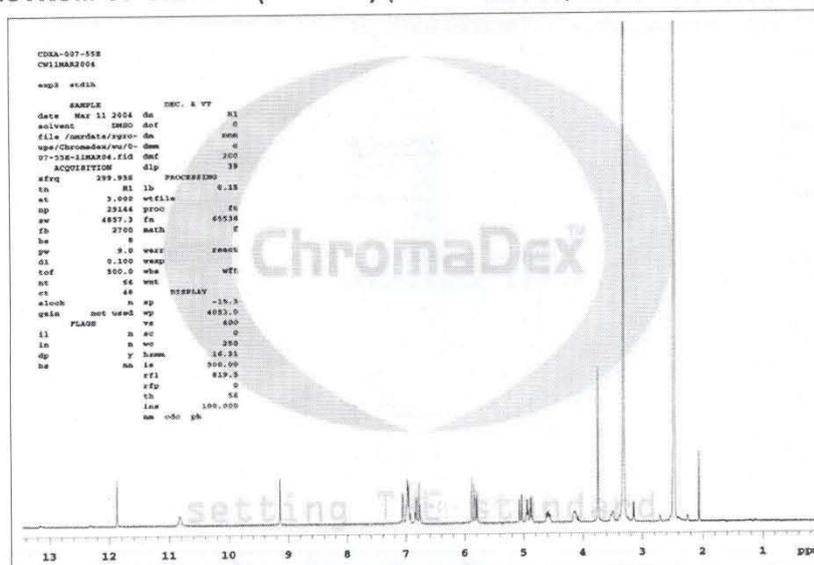
Certificate of Analysis



MASS SPECTRUM OF SILYBIN (A AND B) (CDXA007-55E)



NMR SPECTRUM OF SILYBIN (A AND B) (CDXA007-55E) IN DMSO



Tel: 949. 419. 0288 | www.chromadex.com | Fax: 949. 419. 0294

Annexe 6 Composition en flavonolignanes en fonction des températures

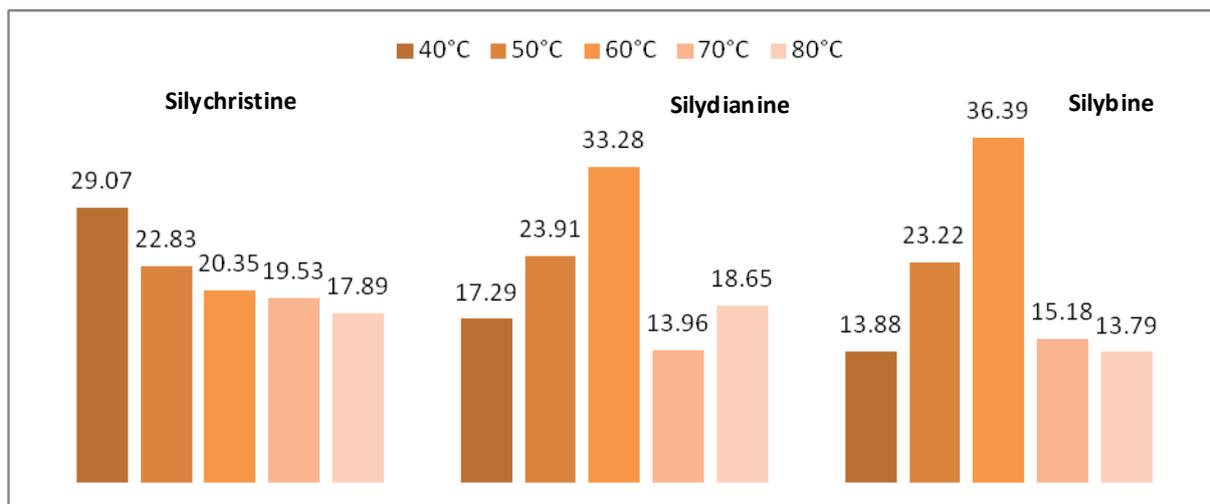


Figure 1 Composition en flavonolignanes en fonction des températures à **100 bar**

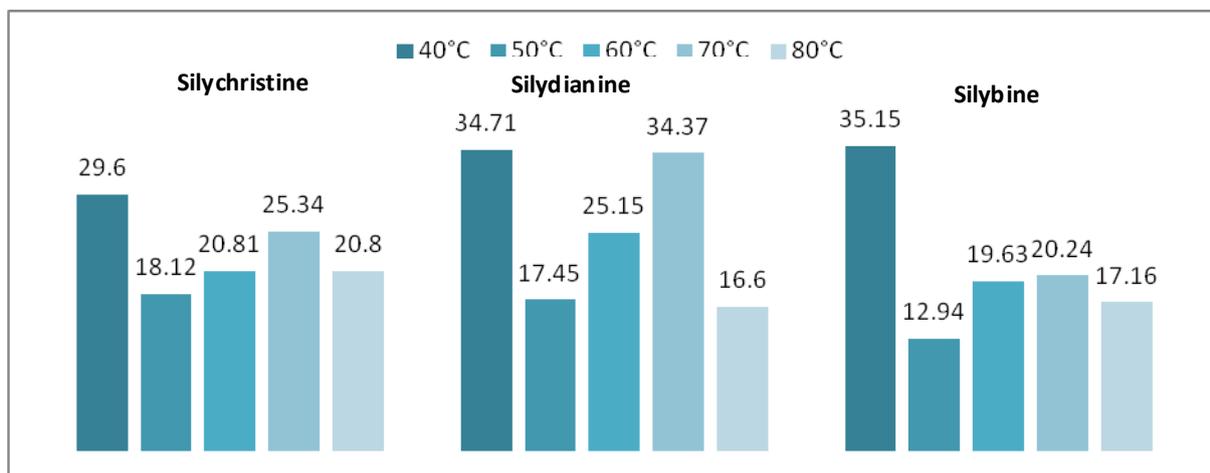


Figure 2 Composition en flavonolignanes en fonction des températures à **120 bar**

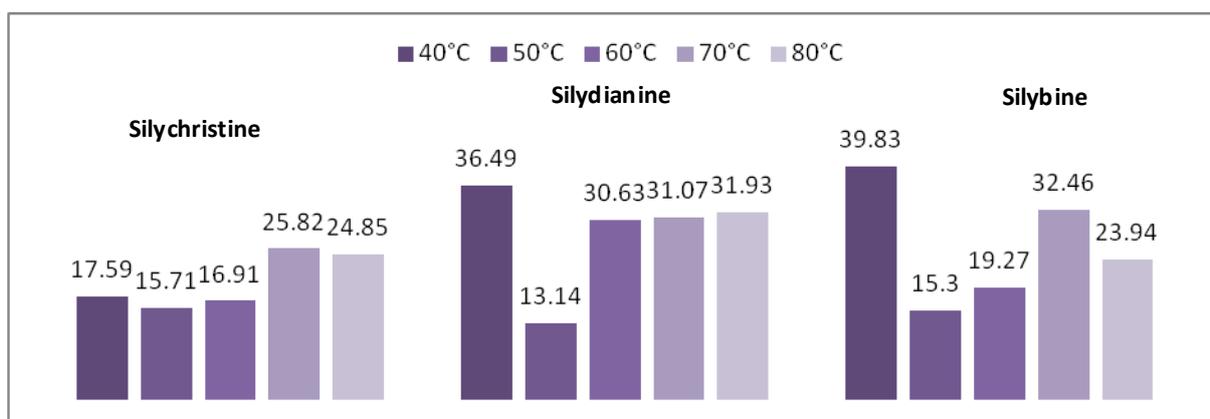


Figure 3 Composition en flavonolignanes en fonction des températures à **140 bar**

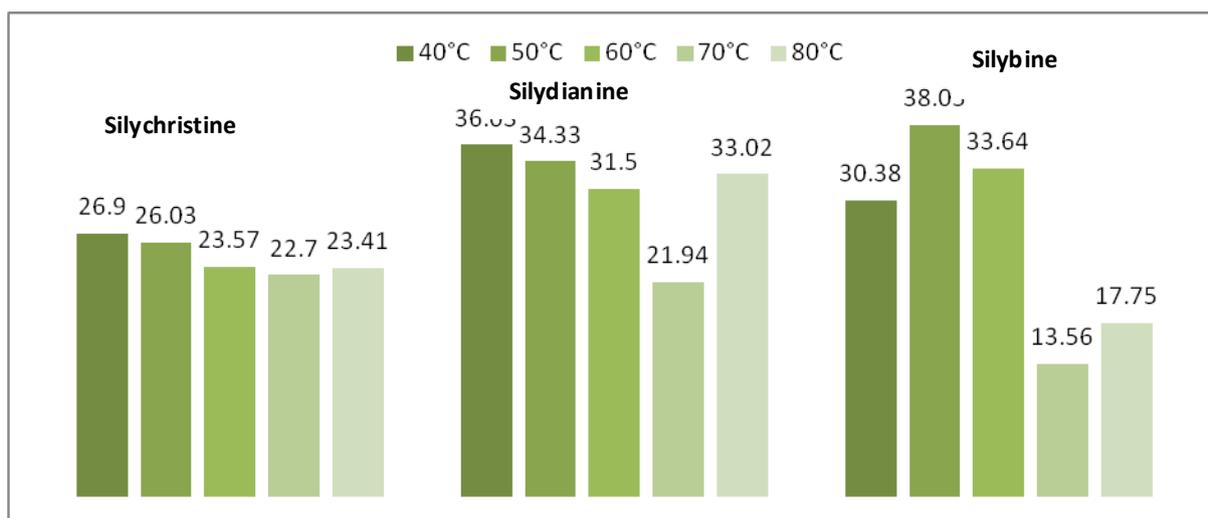


Figure 4 Composition en flavonolignanes en fonction des températures à 160 bar

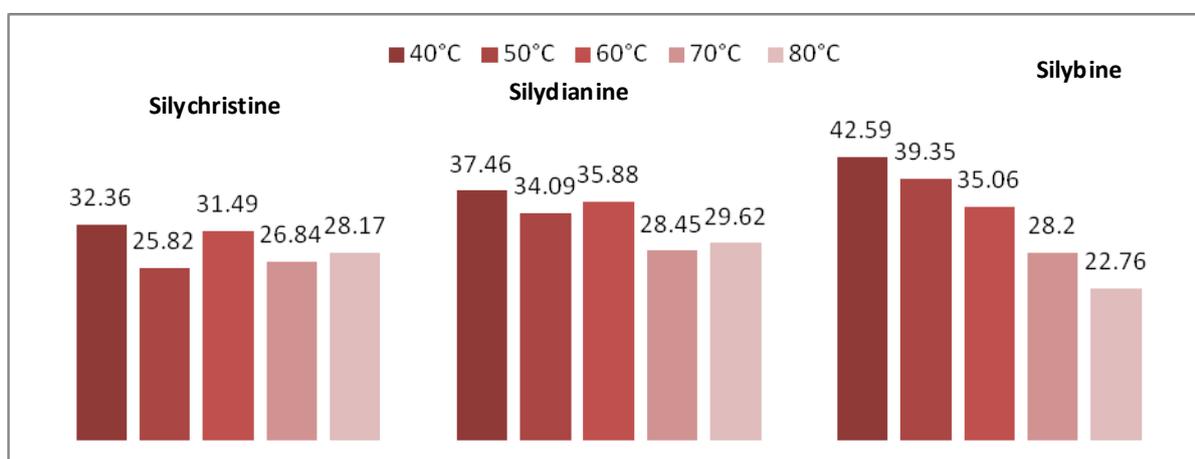


Figure 5 Composition en flavonolignanes en fonction des températures à 180 bar

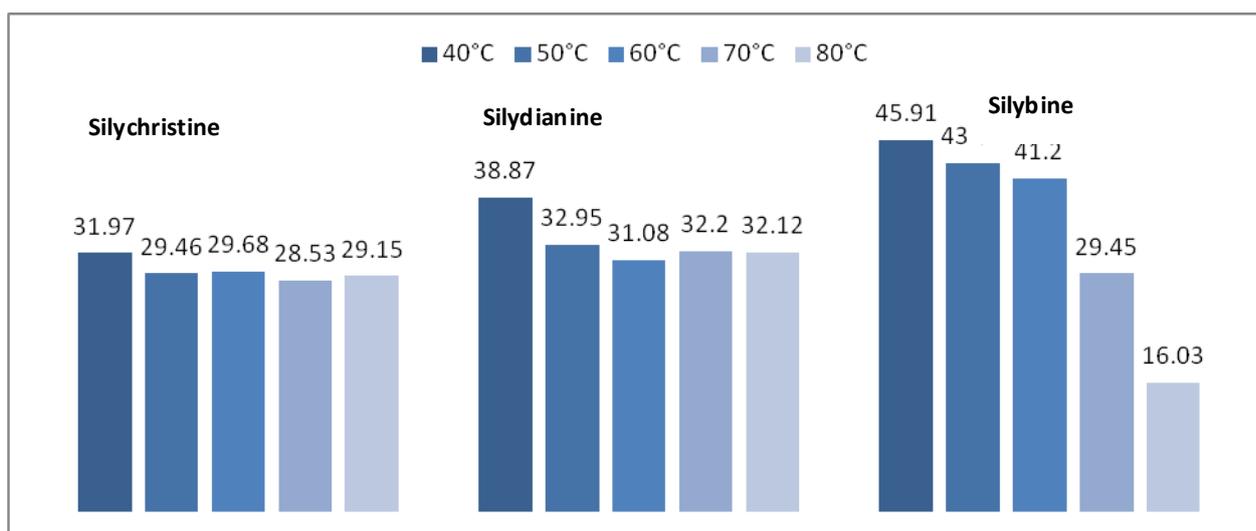
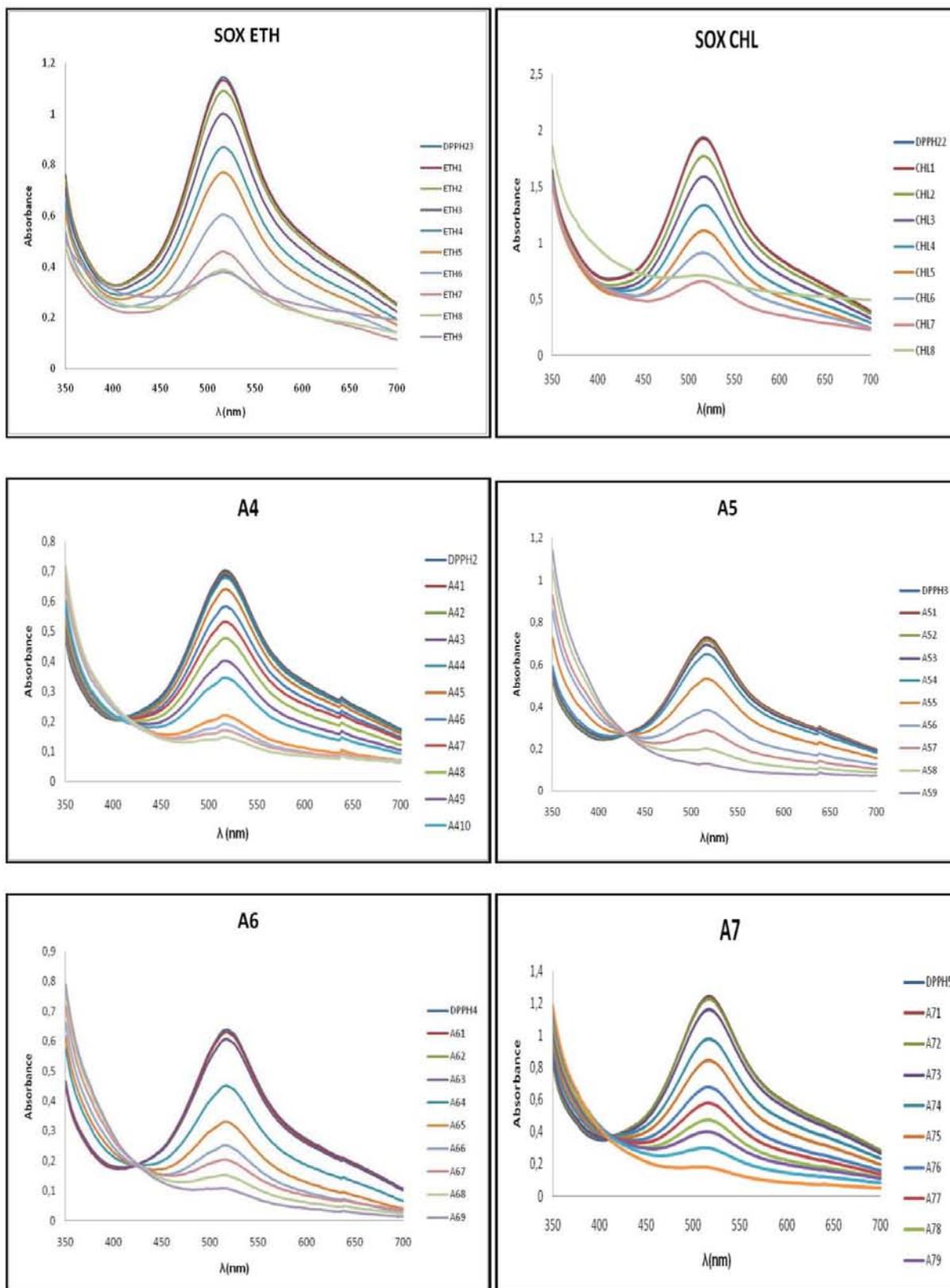
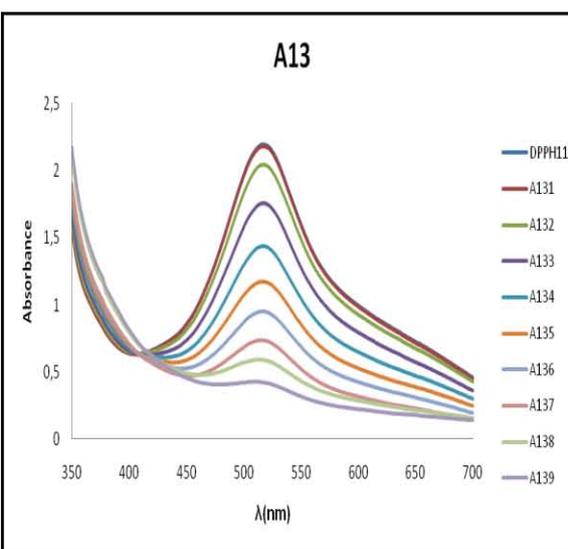
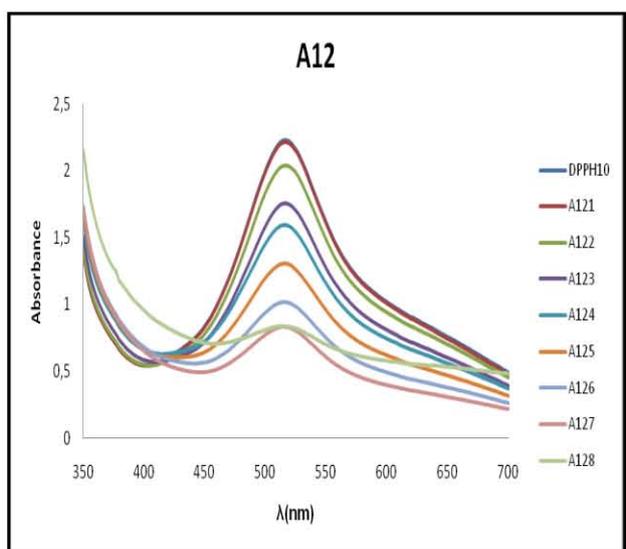
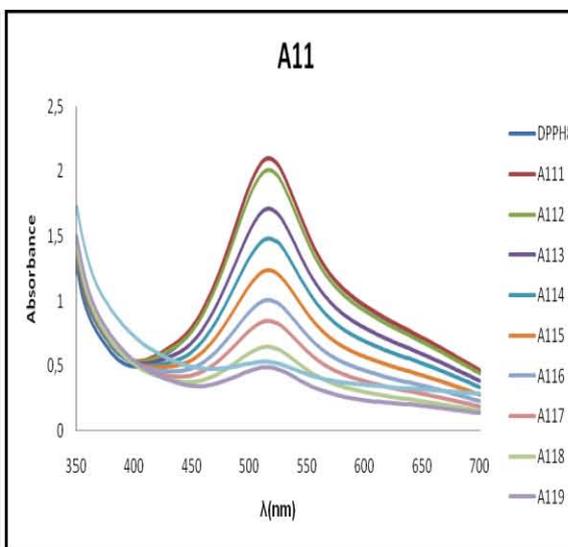
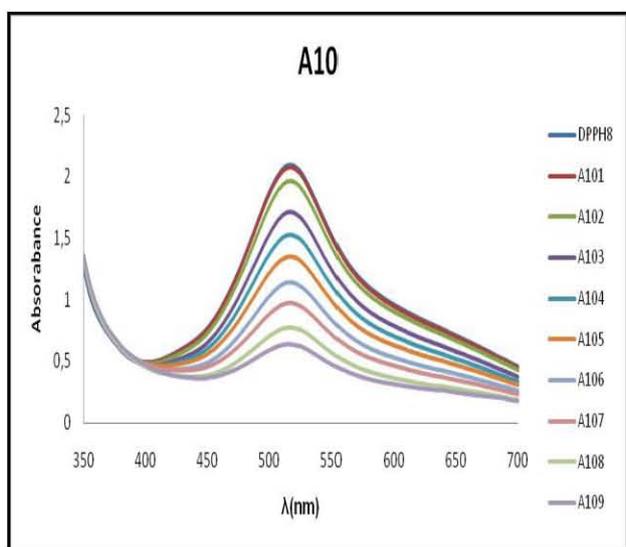
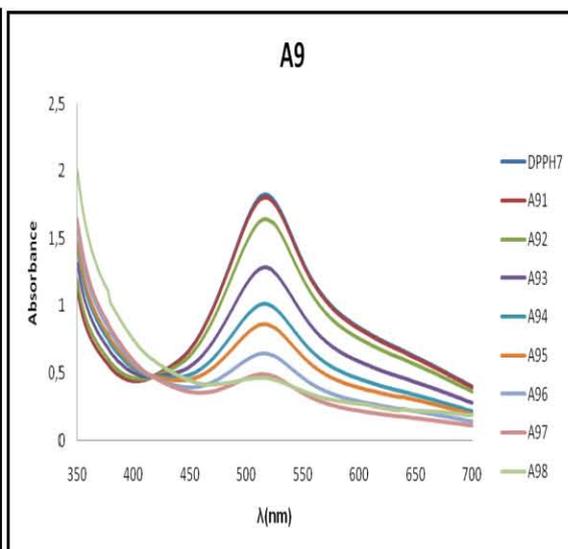
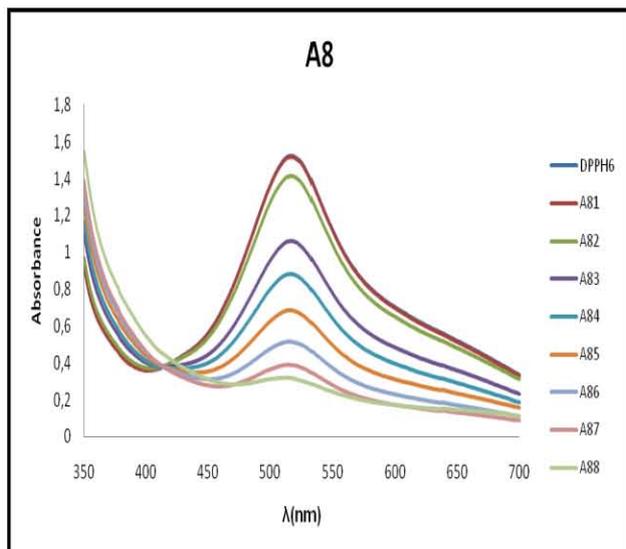
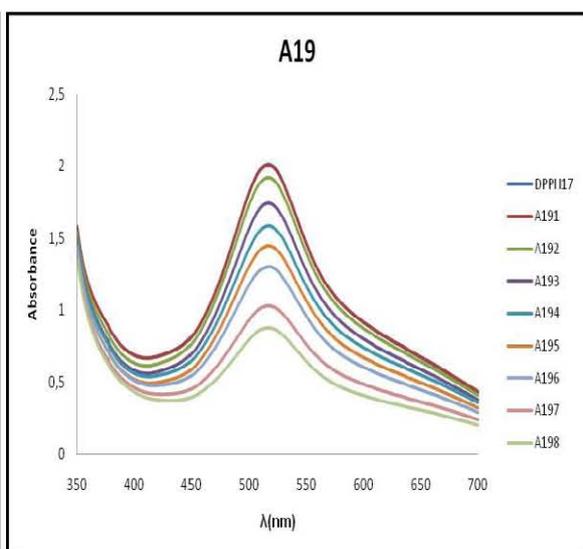
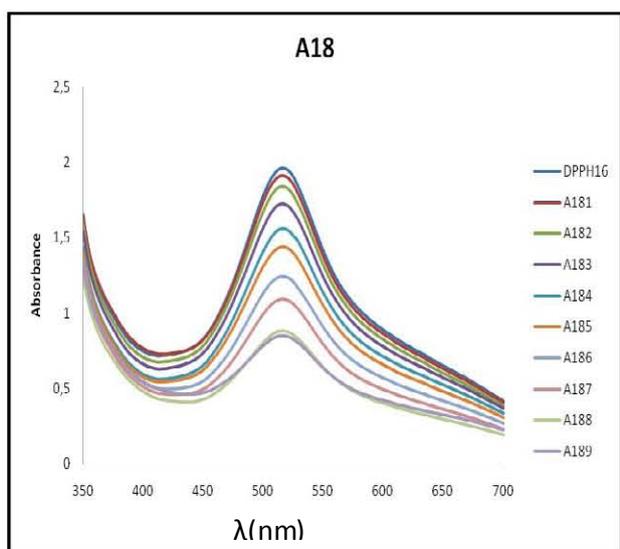
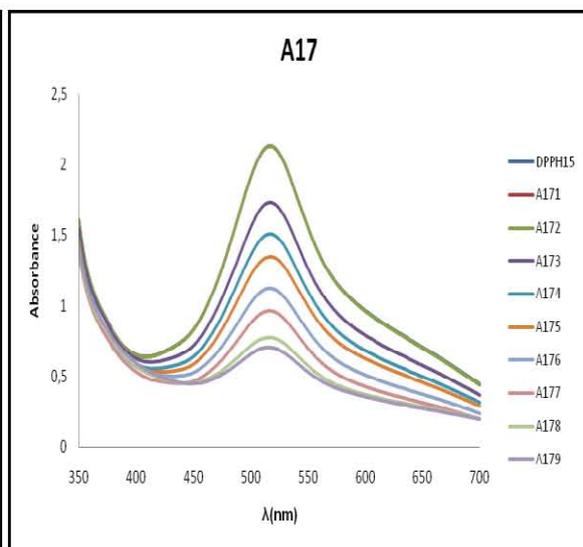
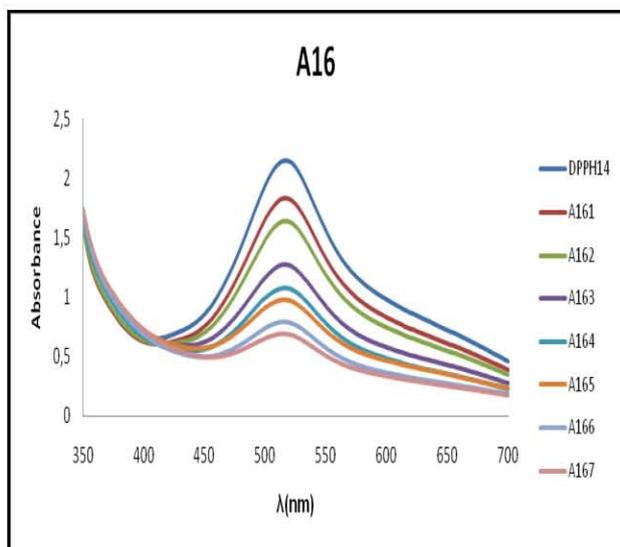
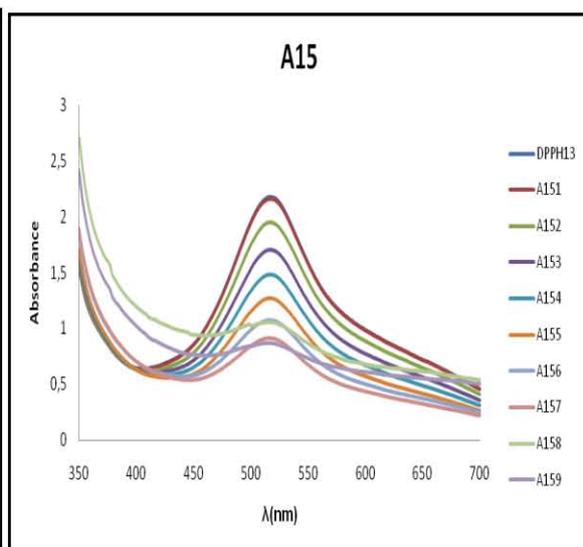
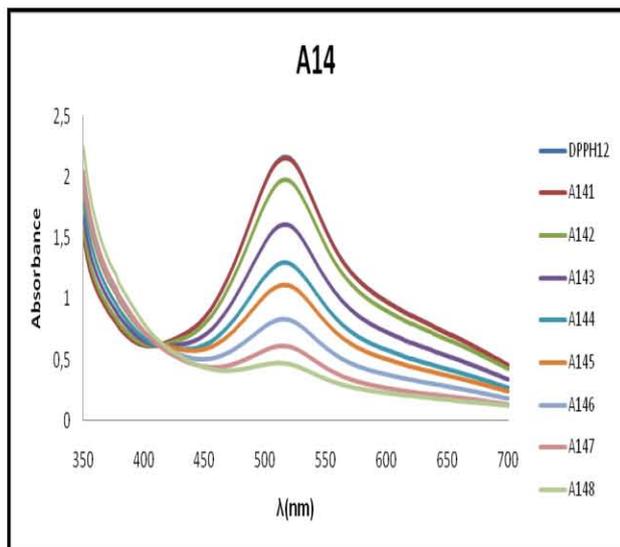


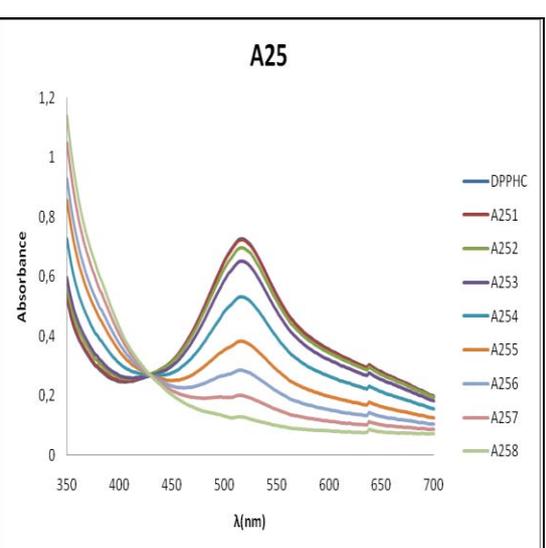
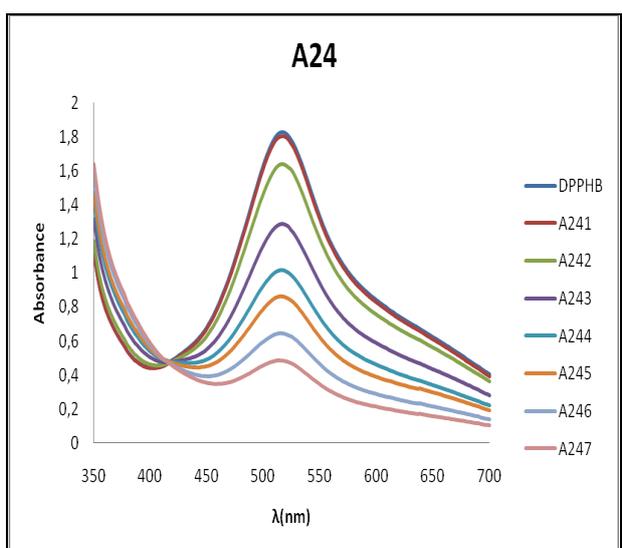
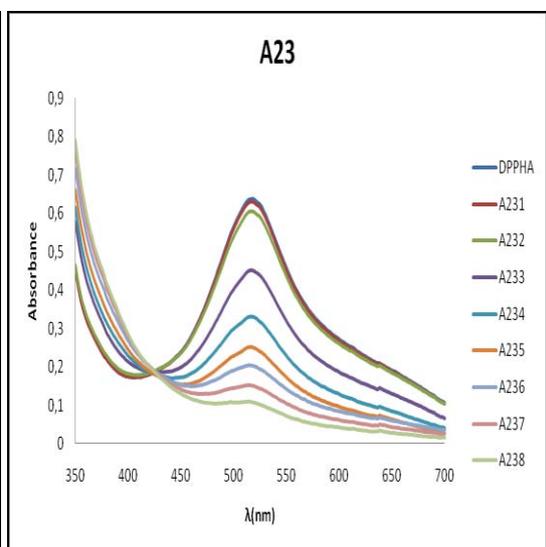
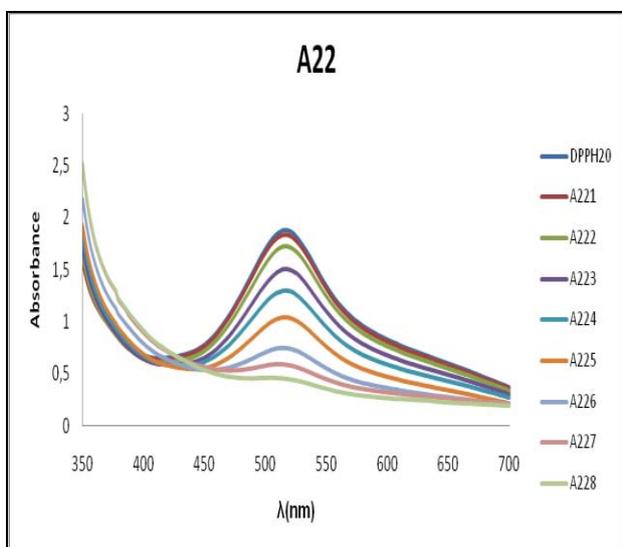
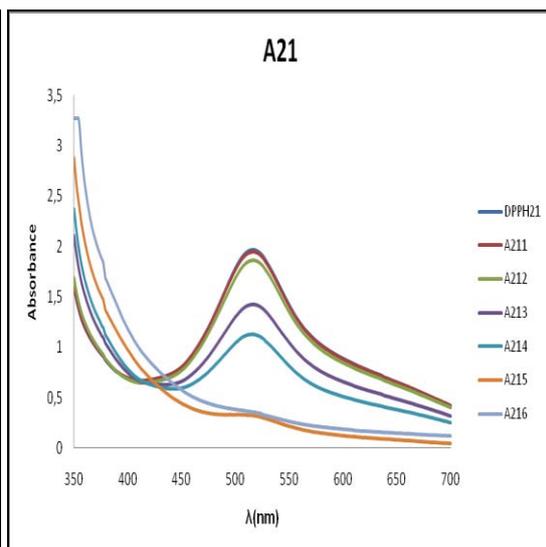
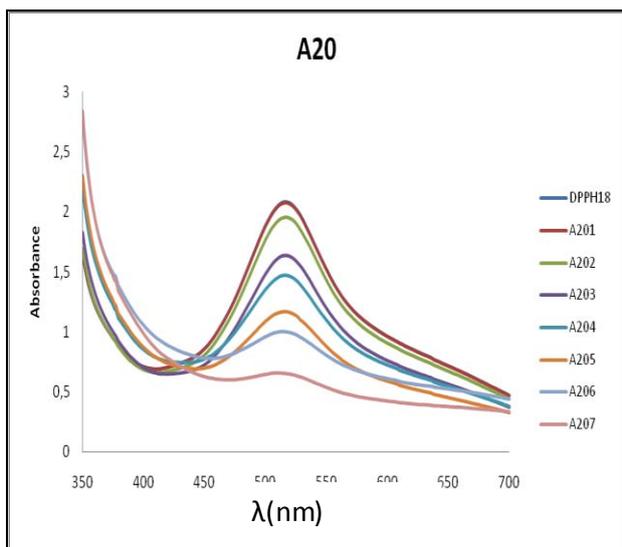
Figure 6 Composition en flavonolignanes en fonction des températures à 220 bar

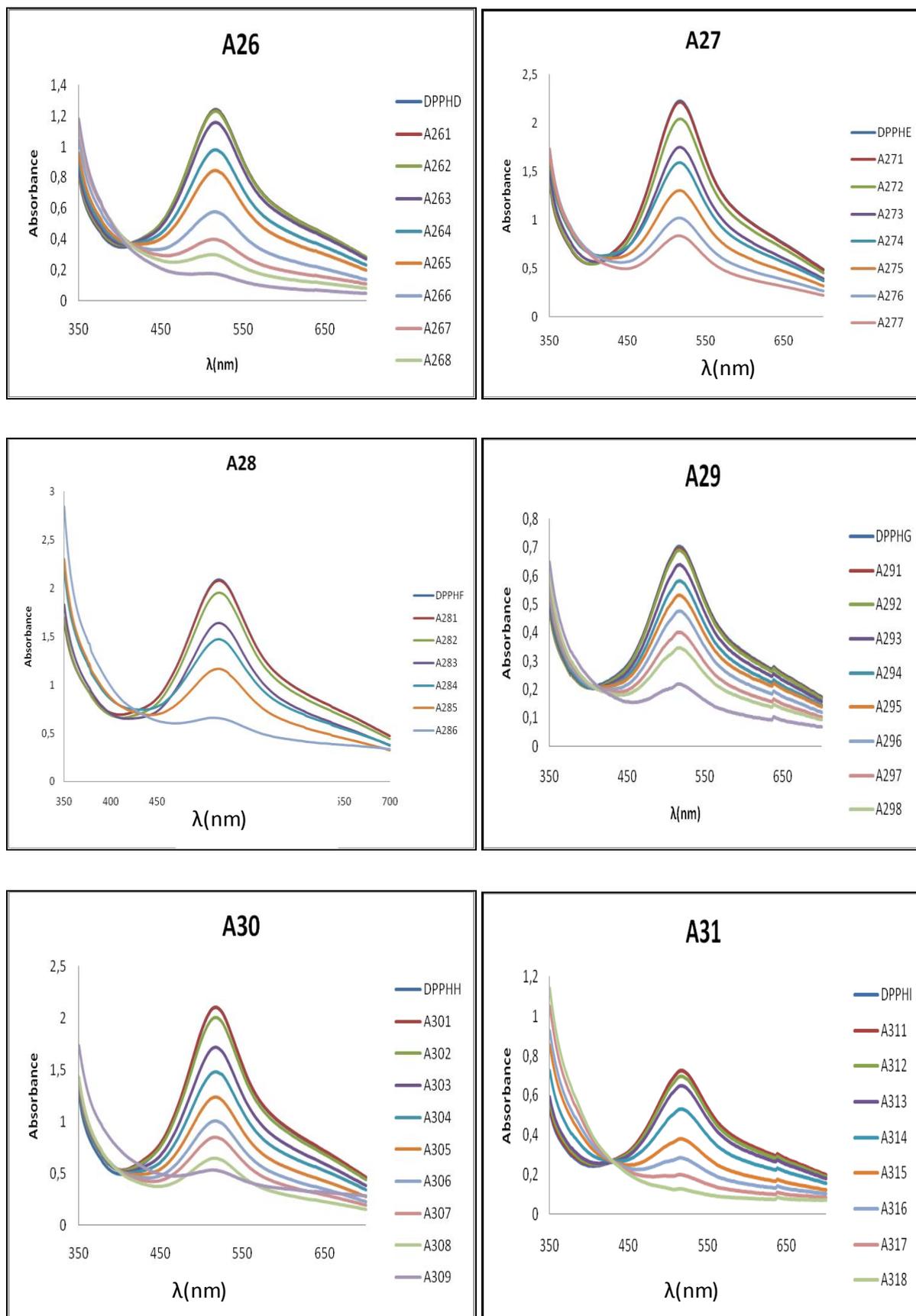
Annexe 7 Evolution des spectres d'absorption UV-visible par la méthode DPPH
 (Les échantillons sont notés par "A")











Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de *Silybum marianum*. Etude de leurs activités antioxydante et antitumorale

Résumé

L'extraction par CO₂ supercritique démontre les avantages d'un procédé de chimie verte en comparant ce procédé à la méthode d'extraction par solvant organiques et en tenant compte du degré de toxicité et de pollution du solvant. L'extraction par solvants organiques met en évidence l'influence du solvant d'extraction alors que l'extraction par CO₂-SC met en évidence l'influence de différents paramètres dont la pression, la température, le temps de contact entre la matrice végétale et le CO₂-SC, le diamètre moyen des particules et l'ajout d'un co-solvant. L'analyse chromatographique a permis d'identifier et de quantifier les flavonolignanes (silychristine, silydianine, silybine, taxifoline) dans les extraits de graines obtenus par solvants organiques et par CO₂-SC avec co-solvant. A 220 bar, les concentrations en silydianine (38,87 mg/g) et en silybine (45,91 mg/g) sont les plus élevées et à 40°C les concentrations en silychristine (31,97 mg/g), en silydianine (38,87 mg/g) et en silybine (45,91 mg/g) sont les plus importantes. Les extraits huileux obtenus à 220 bar et à 40°C des graines de *Silybum marianum* sont riches en acides gras : acide linoléique (65,22%), acide oléique (27,01%), acide palmitique (12,12%).

L'activité antioxydante a été évaluée par deux tests : test DPPH et test ABTS. Ces deux tests sont complémentaires et ont permis de conclure que l'extrait ayant un effet antioxydant le plus important est l'extrait obtenu par CO₂-SC à 220 bar et à 40°C.

L'activité biologique de cet extrait est mise en évidence par rapport à une lignée cellulaire cancéreuse du colon Caco-2. La silychristine, la silydianine et la silybine ainsi que l'extrait obtenu par CO₂-SC avec co-solvant (éthanol) à 220 bar et à 40°C ont été testés vis à vis de cette lignée cancéreuse. Ces expérimentations in vitro reflètent une activité cytotoxique quantifiable et une mortalité cellulaire des Caco-2 des flavonolignanes allant jusqu'à 71%.

Mots clés : Extraction, CO₂ supercritique, flavonolignanes, acides gras, activité anticancéreuse, lignée cancéreuse du colon Caco-2.

Extraction, identification and characterization of bioactive molecules of *Silybum marianum* seed and oil. Study of their antioxidant and antitumoral activities

Abstract

The supercritical CO₂ extraction demonstrates the benefits of green chemistry process comparing with the method of organic solvents extraction and depending to toxicity and pollution solvent degree. Organic solvents extraction shows the solvent extraction influence, so that the SC-CO₂ extraction highlights different parameters including pressure, temperature, contact time between the plant matrix and CO₂ SC, the average particle diameter and the addition of a cosolvent. Chromatographic analysis identified and quantified four flavonolignans (silychristin, silydianin, silybin, taxifolin) in seed extracts obtained by organic solvents and SC-CO₂ with cosolvent.

At 220 bar, silydianin (38.87 mg / g) and silybin (45.91 mg / g) have highest concentrations and at 40 ° C silychristin (31.97 mg / g), silydianin (38.87 mg / g) and silybin (45.91 mg / g) have the most important concentrations. The oily extracts obtained at 220 bar and 40 ° C of *Silybum marianum* seeds are rich in fatty acids: linoleic acid (65.22%), oleic acid (27.01%), palmitic acid (12.12%).

The antioxidant activity measured by two tests: DPPH and ABTS test. These two tests are complementary and confirm that the extract with the higher antioxidant effect is the extract obtained by SC-CO₂ at 220 bar and 40 ° C. The biological activity of this extract is demonstrated with respect to a colon cancer cell line Caco-2. Silychristin, silydianin and silybin and the extract obtained by CO₂-SC with co-solvent (ethanol) at 220 bar and 40 ° C were tested with respect to this line cancer. These experiments in vitro cytotoxic activity reflect estimable and cell death of Caco-2 flavonolignans of up to 71%.

Keys words: Extraction, supercritical CO₂, flavonolignans, fatty acids, anticancer activity, colon cancer cell line Caco-2.