

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante des extraits
bruts de lichen *Lobaria pulmonaria***

Présenté par : Melle BOULERBAA Reguia
Melle MAROUFI Fatiha

Devant le jury :

Présidente :	Melle ZAKHROUF Zohra	MAA
Rapporteur :	Dr. SIFI Ibrahim	MCB
Examinatrice :	Mme NEBEG Halima	MAA

Soutenu publiquement le : 16/05/2018

Remerciement



Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

J'aimerais également exprimer note gratitude à tous mes professeurs de graduation et de post-graduation de l'université de Laghouat, un grand merci pour vous notre encadreur Dr. Sifi ibrahim que dieu vous bénisse et donne la santé.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre recherche Melle ZAKHROUF Zohra et NEBEG Halima.

Nous offrons nos plus sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire ou nous avons fait notre travail pratique

À tous les étudiants de Master de la promotion 2018.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Enfin nous présentons tous nos remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire par leurs connaissances et leurs conseils.

Merci



DEWASA



À l'aide de dieu "**Allah**" tout puissant

Qui m'a tracé le chemin de ma vie,

J'ai pu réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde. Mes chers parents qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie. Qui m'ont apportés son appui durant toutes mes années d'études, pour ses sacrifices et soutien et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité

À mon très cher père **Mohamed** ; Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices qui tu as consentis pour mon éducation et ma formation, et puisse dieu t'accorder santé et longue vie. Je t'aime Papa.

À ma très belle chère mère **Om elkhair** ; tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, et puisse Dieu le tout puissant te préserver, t'accorder la santé, longue vie et bonheur.

Je t'aime Maman.

À mes chers sœurs : mbarka , khadra , fatima , Khaira .

À mes chers frères : Jalol ,Jilali , Bagdad, Brahim .Ahmed .Walid . Khaled

Et toute la famille Boulerbaa surtout Aycha .Karima .khaira . Zelikha. Rahma .Ahlem

À mon biinôme fatiha qui est partagée avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.

À mes chères amies :Aycha .Meriem. Lalya fatiha . Khadidja .Rachda .Fatna .

Je remercie toute les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici.

DEWASA



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Ma mère " Zohra" et mon père " Djelloulle"

*A ceux qui m'ont toujours encouragé pour que je réussisse dans mes études
Pour leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études.*

Ainsi qu'à mes chères soeurs :Hayet ,mbarka et nadjwa

Au ses maris et ses enfants :Taha ,ibrahim, akram , et mahammed

A mes chers frères : Bouzian et djillali .

Au ses maries et ses enfants :

hayet ,Aya , hiba el rahman,zahra ,Rajaa

Abd elhak, abd elraouf,add elrahim,abd elsami e,Amer

Tous mes Proches

*A Mes amies : mon binôme Reguia, Aicha , Meriem , Lalia,Fatiha, Khadidja
et Rachda.*

Mes camarades de promotion



Fatiha

ملخص

يتعلق هذا العمل بدراسة مضادات الأكسدة لأربعة مستخلصات عضوية (ميثانول وإيثانول وأسيتون وثنائي كلوروميثان)، لأشنة (*Lobaria pulmonaria*) والتي تستخدم عادة لعلاج العديد من الأمراض. إن كمية polyphenols ($124,97 \pm 3,16$ mg EAG/g extrait sec) و flavonoïdes ($111,29 \pm 2,82$ mg QR/g extrait sec)، مرتفع بشكل ملحوظ في مستخلص الاسيتون مقارنة بالمستخلصات الأخرى. جميع المستخلصات لديها القدرة على الحد من جزيئة DPPH الحرة مع نشاط جيد لمستخلص الأسيتون الذي قيمته EC_{50} هو $56,31 \pm 0,61$ µg/ml. سمحت لنا نتائج هذا العمل بالتأكد من أن مستخلصات الأسيتون والميثانول لها خصائص مضادة للأكسدة جيدة جدا. الكلمات المفتاحية: مضادات الاكسدة، متعدد الفينول (Polyphénols)، الفلافونويد (Flavonoïde)، Test DPPH، *Lobaria pulmonaria*.

Résumé

Le présent travail porte sur une étude antioxydante de quatre extraits organiques (méthanol, éthanol, acétone et dichlorométhane), d'un lichen (*Lobaria pulmonaria*) traditionnellement utilisé pour traiter plusieurs maladies. Le taux des polyphénols totaux ($124,97 \pm 3,16$ mg EAG/g extrait sec) et les flavonoïdes ($111,29 \pm 2,82$ mg QR/g extrait sec), sont remarquablement très élevé dans l'extrait acétone par rapport à les autres extraits. Tous les extraits ont la capacité de réduire le radical libre DPPH avec une bonne activité a été révélé pour l'extrait acétone dont la valeur EC_{50} est de $56,31 \pm 0,61$ µg/ml. Les résultats de ce travail nous ont permis d'affirmer que les extraits acétone et méthanol présentent des très bonnes propriétés antioxydantes.

Mots-clés : Antioxydant, Polyphénols, Flavonoïde Test DPPH, *Lobaria pulmonaria*

Abstract

The present work concerns an antioxidant study of four organic extracts (methanol, ethanol, acetone and dichloromethane), of lichen (*Lobaria pulmonaria*) traditionally used to treat several diseases. The amount of total polyphenols ($124,97 \pm 3,16$ mg EAG/g dry extract) and flavonoids ($111,29 \pm 2,82$ mg QR/g dry extract), are shown very high in acetone extract compared to the other extracts. All extracts have the ability to reduce the free radical DPPH with good activity was revealed for acetone extract whose EC_{50} value is $56,31 \pm 0,61$ µg/ml. The results of this work allowed us to affirm that acetone and methanol extracts have very good antioxidant properties.

Key words: Antioxidant, Polyphenols, Flavonoids Test DPPH, *Lobaria pulmonaria*

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium
DCM	Dichlorométhane
DPPH	Le radical stable (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)
EAG	Equivalent d'acide Gallique
EC₅₀	Concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libres
EOA	Espèces oxygénées active
Fe⁺³	Ion ferrique
Fe²⁺	Ion ferreux
GPx	Glutathion peroxydase
LDL	Lipoprotéines à basse densité
MeOH	Méthanol
NO·	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthétase
R·	Radical libre oxydant
RL	Radical libre
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives oxygénées
SOD	Superoxyde dismutase
O₂⁻	Radical anion superoxyde
OH°	Radical hydroxyl
ONOO°	Radical perxynitrite
ROO°	Radicaux libres peroxylés
mL	Millilitre
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
¹O₂	Oxygène singulet
g	Gramme
GSSG	Glutathion oxydé
LOO°	Radical lipidique peroxyde
α-TO·	Radical tocophéryle
α-TOH	Alp glutathion peroxydase séléno-dépendante ha-tocophérol
Se-GPx	Glutathion peroxydase séléno-dépendante
GSH	Glutathion réduit
ATP	Adénosine triphosphate
EXS	Extrait
QR	Quercitain
EAG	Equivalent d'acide gallique

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photos de l'espèce <i>Lobaria pulmonaria</i> séché (face supérieur et inférieur)	5
Figure 2 : Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction mono-électronique de l'oxygène (Gardès-Albert <i>et al.</i> , 2003).....	9
Figure 3 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier ,2003).....	12
Figure 4 : Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Menvielle-Bourg, 2005)	14
Figure 5 : Cycle oxydo-réducteur du glutathion (Hagen <i>et al.</i> , 1990).....	15
Figure 6 : Antioxydants d'origine alimentaire : α -tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C), β -carotène (famille des caroténoïdes), acide caféique et quercétine (famille des polyphénols).....	17
Figure 7 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	18
Figure 8 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	19
Figure 9 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature de produits terminaux formés.....	20
Figure 10 : Relations entre hyperglycémie et stress oxydant.....	20
Figure 11 : Voie des polyols et stress oxydant.....	21
Figure 12 : Structure générale des flavonoïdes	25
Figure 13 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002).....	26
Figure 14 : Structure des anthocyanosides.....	27
Figure 15 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)	27
Figure 16 : Structure générale de coumarine	28
Figure 17 : Photo illustre l'évaporation d'un échantillon par le Rota-vapeur (Original).....	32
Figure 18 : Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction des polyphénols	33
Figure 19 : Réduction du radical libre DPPH• (Molyneux, 2004)	36
Figure 20 : Photos des extraits bruts obtenus après filtration puis évaporation (Prise le 21/02/2018)	38
Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique dans le dosage des polyphénols.....	39
Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la quercétine dans le dosage des flavonoïdes	40
Figure 23 : Histogrammes montre les teneurs en polyphénol totaux et les flavonoïdes	40
Figure 24 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction de concentrations (mg/ml) des extraits testés et (μ g/ml) la Vit C.....	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier <i>et al.</i> , 2008)	23
Tableau 2 : Les produits chimiques et les réactifs utilisé.....	31
Tableau 3 : Les valeurs d'EC ₅₀ des quatre extraits de l'espèce <i>Lobaria pulmonaria</i>	43
Tableau 4 : Test de corrélation entre les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les valeurs inverse d'EC ₅₀	44

SOMMAIRE

ملخص	II
Résumé	II
Abstract	II
Liste des abréviations	III
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	V
SOMMAIRE	VI
INTRODUCTION	1

CHAPITRE 1 : LA PLANTE ÉTUDIÉE

1. LES LICHENS	5
2. L'ESPECE <i>LOBARIA PULMONARIA</i>	5
3. DESCRIPTION BOTANIQUE.....	6
4. CLASSIFICATION	6
5. HABITAT	6
6. EFFETS ET USAGES MEDICINAUX	7

CHAPITRE 2 : SYSTEME OXYDANT, SYSTEME ANTIOXYDANT ET STRESS OXYDANT

1. STRESS OXYDANT.....	9
2. SYSTEME OXYDANT	9
2.1. LES RADICAUX LIBRES.....	9
2.2. LES TYPES DES RADICAUX LIBRES	9
3. INTERETS BIOLOGIQUES DES RADICAUX LIBRES DANS LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE	13
3.1. LA PHAGOCYTOSE	13
3.2. LA SIGNALISATION CELLULAIRE	13
4. SYSTEMES DE DEFENSES ANTIOXYDANTS	14
4.1. LE SYSTEME ANTIOXYDANT ENZYMATIQUE	14
4.2. LE SYSTEME ANTIOXYDANT NON ENZYMATIQUE	16
5. LES CIBLES DES RADICAUX LIBRES	18
5.1. OXYDATION DE L'ADN.....	18

CHAPITRE 3 : LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

1. DEFINITION	23
2. LES CLASSES DES POLYPHENOLS	23
2.1. PHENOLS SIMPLES ET LES ACIDES PHENOLIQUES	24
2.2. QUINONES.....	24
2.3. STILBENE	25
2.4. LIGNANES	25
2.5. FLAVONOÏDES	25
2.6. ANTHOCYANOSIDES	26
2.7. TANNINS.....	27
2.8. COUMARINES	28

CHAPITRE 4 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. OBJECTIF.....	31
2. MATERIEL VEGETAL	31
3. MATERIEL TECHNIQUES ET PRODUITS.....	31
3.1. PRODUITS CHIMIQUE.....	31
3.2. APPAREILS ET INSTRUMENTS	32
4. METHODE D'EXTRACTION	32
4.1. DETERMINATION DU RENDEMENT D'EXTRACTION	33
5. DOSAGE DE COMPOSES PHENOLIQUES	34
5.1. DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX.....	34
5.2. DOSAGE DES FLAVONOÏDES	35
6. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE PAR LE PIEGEAGE DE RADICAL LIBRE DPPH'.....	35

CHAPITRE 5 : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. RESULTATS DE L'EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	38
2. RESULTAT DU DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX ET DES FLAVONOÏDES	39
3. RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE (TEST DPPH)	42
CONCLUSION.....	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	48

INTRODUCTION

La médecine traditionnelle demeure le recours principal d'une grande majorité des populations pour résoudre leurs problèmes de santé, non seulement du fait qu'elle constitue un élément important du patrimoine culturel, mais aussi pour les moyens financiers limités face aux produits conventionnels (**Koné, 2009**).

Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**OMS, 2002**).

Les plantes médicinales sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Nicole, 1997**).

L'espèce de *Lobaria pulmonaria* est l'une des rares espèces de lichen connues du grand public grâce à son aspect spectaculaire et surtout à son utilisation dans la pharmacopée traditionnelle (**Roux, 2014**).

Ce lichen était commun dans toutes les forêts avant le début de l'ère industrielle, depuis cette époque il est en régression et a même disparu dans de nombreuses forêts (Signoret J., 2001).

Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de maladies qui ont un impact énorme sur la santé des populations. Dans des conditions normales, le métabolisme aérobique chez les mammifères génère des substances appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont impliquées à faibles quantités dans des processus physiologiques (**Favier, 2003**).

Cependant l'excès de production des ERO peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques et par conséquent donné lieu au stress oxydatif (**Valko et al., 2006**).

Ce dernier est impliqué dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, le diabète, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et le processus de vieillissement (**Aruoma, 2003**).

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Berger, 2006**).

Le développement de nouveaux antioxydants d'une capacité antioxydante de meilleure qualité et de moindre toxicité s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes d'oxydation. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à caractère antioxydant, si l'on considère que ces plantes peuvent contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ces derniers représentés actuellement par 100.000 substances identifiées, pourraient être utilisés dans la prévention de certaines maladies ou pour une meilleure conservation des aliments (Cowan, 1999).

De nombreuses études ont montré que les plantes possèdent des propriétés antioxydantes dues en grande partie à leurs composés phénoliques (Pietta, 2000).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la santé humaine en raison de leurs activités pharmacologiques diverses comme anti-inflammatoires, antiallergiques, antimicrobiens, antiviral, anticancéreux, cardioprotectives et vasodilatateurs (Middleton *et al.*, 2000; Ksouri *et al.*, 2007).

En outre, ils peuvent prévenir la modification oxydative par neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou décomposition des peroxydes par l'intermédiaire de leurs activités antioxydantes (Nijveldt *et al.*, 2001).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont le but principal est d'étudier l'activité antioxydante de lichen *Lobaria pulmonaria*. La présente étude a été scindée en trois parties :

- ❖ La première partie, est consacrée à l'étude bibliographique, relative à la plante étudiée, aux composés phénoliques et à l'activité antioxydante.
- ❖ La deuxième partie du travail est expérimentale, elle est consacrée à l'évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce *Lobaria pulmonaria*, est basée sur :
 - ⇒ L'extraction des composés phénoliques de la plante.
 - ⇒ Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes.
 - ⇒ Evaluation de l'effet anti-radicalaire par le DPPH.
- ❖ Dans la troisième partie, nous discutons les résultats obtenus, on termine notre étude par une conclusion et des perspectives.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 :

LA PLANTE ETUDIEE

1. Les Lichens

Un lichen est un champignon supérieur en symbiose avec une algue, le terme d'algue étant pris au sens le plus large. Le champignon est presque toujours un ascomycète et le lichen est nommé ascolichen. L'algue, le plus souvent, est un Chlorophyte (algue verte) : Chlorococcale, avec contenu cellulaire très vert, avec cytoplasme contenant des gouttelettes d'huile, riches en caroténoïdes. Mais ce peut être aussi une Cyanophycée (algue bleue) avec contenu cellulaire vert bleuâtre ou vert brunâtre, entouré d'une enveloppe incolore, jaune brunâtre ou violet pourpre (Clauzade *et al.*, 1985).

2. L'espèce *Lobaria pulmonaria*

Le *Lobaria pulmonaria* (ou lichen pulmonaire) est une espèce de lichen épiphyte foliacé non protégée en France excepté en Basse et Haute Normandie car aucune liste de protection nationale n'a encore été dressée. Il possède néanmoins un statut de protection dans la majeure partie de l'Europe (Signoret, 2001). En plus d'être facile à reconnaître au vu de ses caractéristiques morphologiques particulières, ce lichen est considéré comme étant une espèce parapluie, c'est-à-dire que ses contraintes écologiques sont les mêmes que de nombreux lichens plus rares et plus difficiles à déterminer, la protection de son habitat revient à la protection d'autres espèces en dangers. Le nom de lichen pulmonaire lui a été donné à cause de son aspect, sa surface supérieure étant constituée de saillies marquées formant un réseau rappelant les réticulations du poumon (figure 1). Le *Lobaria pulmonaria* est le fruit de la symbiose entre un champignon (Ascomycètes) qui assure une protection vis-à-vis de la déshydratation, une algue verte (*Dictyo chloropsis reticulata*) qui produit les glucides nécessaire à l'organisme et une cyanobactérie (Nostoc) qui permet le captage d'azote atmosphérique nécessaire à la croissance (Carlsson & Nilsson, 2009).

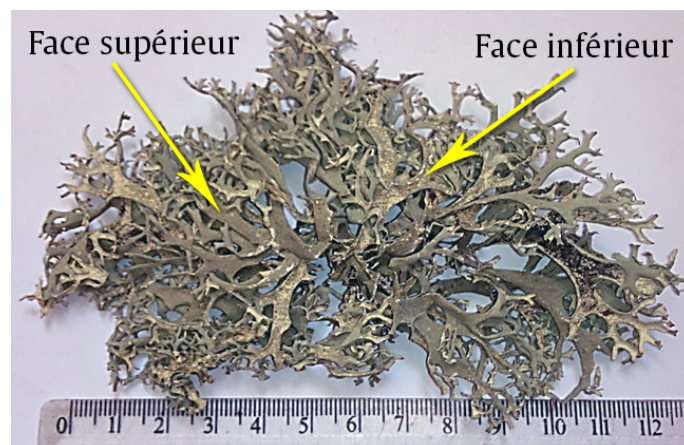


Figure 1 : Photos de l'espèce *Lobaria pulmonaria* séché (face supérieur et inférieur)

3. Description botanique

Lobaria pulmonaria est un Lichen épiphyte gris ou vert pâle à lobes fourchus et irréguliers, on le trouve presque essentiellement sur des troncs d'arbres. Sa présence sur roche est anecdotique et ne peut avoir lieu que si le milieu est très favorable. Est fortement divisé finissant en plusieurs lobes, caractéristique qui lui donna le nom de genre *Lobaria*. Lorsqu'il est sec, ce dernier arbore une couleur brunâtre tandis qu'il devient progressivement vert au fur et à mesure de sa réhydratation. Sa face inférieure quant à elle est très claire voir blanchâtre et est non photosynthétique. Le relief de la face supérieure se répercute sur celle inférieure, on remarque donc des zones quelques peu bombées en dessous pour la zone de dépression de la face du dessus. Le mode de reproduction de ce lichen est principalement asexué, celui-ci se caractérise par l'apparition de masses pulvérulentes sur les bords et crêtes du thalle, ce sont les soralies (Wolseley & James, 2000; Werth *et al.*, 2006; Carlsson & Nilsson, 2009).

4. Classification

- Règne : Fungi
- Phylum : Ascomycotina
- Classe : Ascomycètes
- Ordre : Lecanorales
- Sous-ordre : Peltigerinae
- Famille : Lobariaceae
- Genre : *Lobaria*
- Espèce : *pulmonaria*
- Nom en arabe : شبيبة الشيخ ، الشبيبة

5. Habitat

La combinaison de la température, du degré d'éclairement et de l'humidité du milieu régissent les périodes d'activités du lichen, ces variables sont d'autant plus importantes et changeantes dans les forêts caducifoliées (l'éclairement changeant drastiquement entre le feuillage estival et l'absence de celui-ci à l'arrivée de l'automne).

C'est uniquement lorsque ces paramètres sont favorables en même temps que le lichen croît (le printemps est la période la plus propice), ces conditions permettent aussi au lichen de réparer les parties cassées ou abimées durant la période de sécheresse du thalle (MacKenzie *et al.*, 2001).

En plus de ces contraintes, s'ajoute un paramètre essentiel à la survie de ce lichen. Bien qu'il soit héliophile, il supporte mal la lumière directe, mais demande néanmoins un éclairage assez élevé (**Edman et al., 2008; Asplund et al., 2010**).

Le *Lobaria* se trouve généralement sur des arbres à l'écorce crevassée car ces derniers favoriseraient l'établissement des propagules par rapport aux troncs lisses. De plus, il est majoritairement observé sur des troncs aux diamètres importants, ceci peut s'expliquer par la croissance lente du lichen. En effet, avant que le thalle devienne visible (**Hilmo & Ott, 2002**), l'arbre sur lequel il s'est établi peut se développer. De ce fait, les diamètres des troncs sur où le *Lobaria* peut se trouver ont une limite inférieure où il sera très peu probable de les observer (**Carlsson & Nilsson, 2009; Hilmo et al., 2011**).

6. Effets et usages médicaux

Remède efficace mais sous-employé, la pulmonaire recèle des propriétés expectorantes et toniques. Sous forme de décoction édulcorée au miel, elle convient à toutes les affections qui augmentent les sécrétions bronchiques (toux et bronchites). Elle contribue à soigner l'asthme, la pleurésie et l'emphysème. Décongestionnante, elle est également purgative et apéritive. On la prescrit en cas d'ulcères pulmonaires et de troubles digestifs. La pulmonaire convient particulièrement aux enfants (**Iserin et al., 2001**).

CHAPITRE 2 :

SYSTEME OXYDANT,

SYSTEME ANTIOXYDANT ET

STRESS OXYDANT

1. Stress oxydant

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires par ce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : Les radicaux libres organiques (**Desceemaeker, 2004**).

Le stress oxydatif apparait dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et antioxydantes est rompu en faveur de l'état pro-oxydant. La rupture de cet équilibre est due à la promotion d'espèces activées de l'oxygène, ou radicaux libres oxygénés. Dans les systèmes vivants, la production des radicaux libres oxygénés se fait de manière continue. Toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont particulièrement affectées par les radicaux libres, entraînant la très grande réactivité de ces espèces chimiques vis-à-vis des lipides, des protéines et de l'ADN. C'est pourquoi les effets des radicaux libres sont retrouvés dans tout l'organisme et dans des pathologies très variées.

2. Système oxydant

2.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataire (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte (figure 2). En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Système redox) (**Halliwell, 1996**).

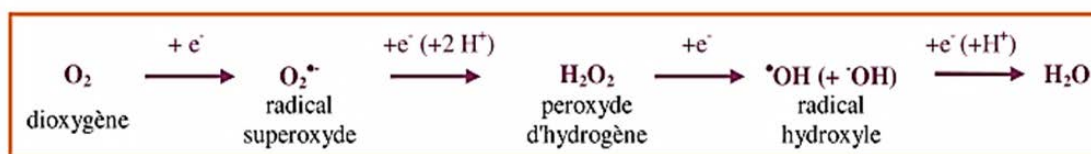


Figure 2 : Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction mono-électronique de l'oxygène (Gardès-Albert *et al.*, 2003)

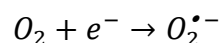
2.2. Les types des radicaux libres

La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent. Leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées (10^5 à $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) (**Delattre *et al.*, 2005**).

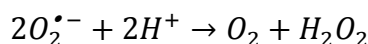
2.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène(ERO)

- **L'anion superoxyde**

Il est considéré comme le type le moins réactif des ERO et le radical le plus fréquemment produit dans l'organisme (**Scheibmeir *et al.*, 2005**). Le radical superoxyde est produit à partir de L'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophiles), et il participe à l'inactivation des virus et bactéries (**Nohl, 1994**). Il est chargé négativement et généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire (**Lacolley *et al.*, 2008**).



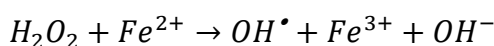
Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène :



L' $O_2^{\bullet -}$ est régulé par des enzymes, les superoxydes dismutases qui catalysent sa dismutation (**Halliwell, 1989**)

- **Le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée H_2O_2**

Il est produit en grande partie à partir du radical superoxyde en présence de superoxyde dismutase qui catalyse la réaction. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires. Il est potentiellement toxique pour la cellule (**Halliwell, 1996**). L' H_2O_2 n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. La réduction mono-électronique du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 donne naissance au radical hydroxyle HO^{\bullet} et à l'anion basique non radicalaire OH^- en présence d'un catalyseur (réaction de Fenton) :

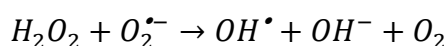


Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique.

- **Le radical hydroxyle HO[•]**

Le radical hydroxyle est l'oxydant le plus réactif et le plus puissant (Marusawa *et al.*, 2002). Le peroxyosome grâce à des oxydases spécifique représente l'une des sources les plus importantes productrices de ce radical (Poortmans & Boisseau, 2017).

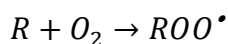
Parmi les voies conduisant à la formation de ce radical on peut citer celle qui implique les métaux de transition, le cuivre et le fer sous leur forme réduit par une réaction appelée réaction de fenton (Favier, 2003). L'H₂O₂ peut aussi réagir avec le radical superoxyde, aboutissant à la production du HO[•], ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss :



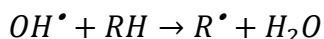
Le HO[•] est capable de réagir avec la plupart des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides membranaire. Parmi les ERO le radical hydroxyle est de loin le plus réactif.

- **Radicaux alkyles R[•] et peroxy ROO[•]**

Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone R[•].



Les radicaux R[•] sont généralement issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons).



- **L'oxygène singulet (¹O₂)**

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène O₂, il possède la même structure électronique que l'oxygène, mais (agencée) différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état (excité) lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (Delattre *et al.*, 2005).

2.2.2. Les espèces réactives azotées (ERN)

- **Le monoxyde d'azote NO**

Le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique) est un radical libre ubiquitaire synthétisé dans la cellule endothéliale à partir de l'arginine et l' O_2 grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthase (Delattre *et al.*, 2003).



Il se caractérise par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO_2), lequel peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3) ; pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO_2^-). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'anion superoxyde le peroxynitrite ($ONOO^-$). Ce dernier est moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (figure 3) (Rezaire, 2012).

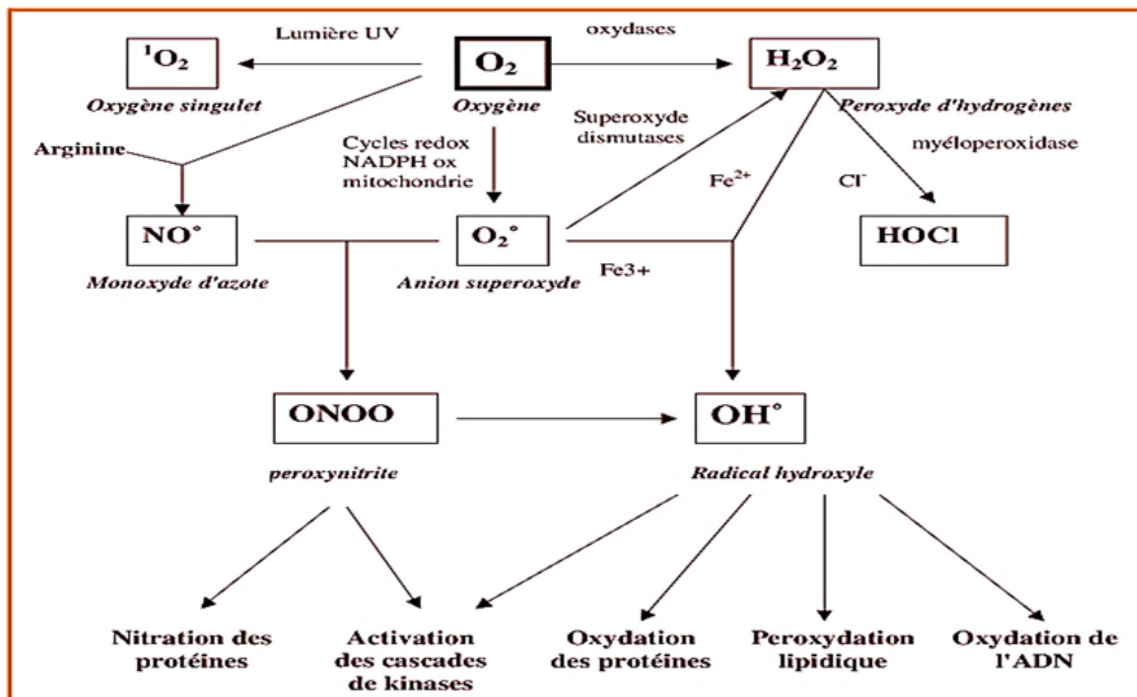


Figure 3 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

3. Intérêts biologiques des radicaux libres dans la physiologie cellulaire

Le rôle de l'espèce oxygénée activées (EOA) est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EOA pour percer la paroi membranaire de l'ovule (**Haleng *et al.*, 2007**).

3.1. La phagocytose

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. La phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène si brutale et intense qu'elle est connue sous le nom « Bouffée respiratoire » puis qu'elle s'accompagne d'une augmentation transitoire de la consommation d'oxygène. Au sein de phagosome, l'activation de la NADPH oxydase, l'action des superoxydes dismutases (SOD) et la NO synthase (NOS) aboutissent à un mélange très corrosif de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , $ONOOH$. L'eau oxygénée (H_2O_2) en présence de chlore et sous l'effet de la myelo-peroxydase donnera naissance à l'acide hypochlorique HOCl, c'est l'oxydant microbicide le plus puissant (**Favier, 2003**).

3.2. La signalisation cellulaire

En dehors de leurs actions délétères, les ERO peuvent agir en tant que molécule de signal et intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire. Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore élucidés. En résumé :

- Les radicaux libres joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. La présence de radicaux libres dans le milieu extracellulaire est à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription par des mécanismes encore mal compris. Il en résulte ensuite l'expression des gènes correspondants (**Delattre *et al.*, 2005**).
- Les radicaux libres peuvent intervenir dans la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la migration (**Robert, 2011**)(Jacques, 2010).

- Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires (Favier, 2003).
- Les radicaux libres jouent un rôle dans la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire (Favier, 2003).

4. Systèmes de défenses antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Droge, 2002).

Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (figure 4) (Delattre *et al.*, 2005).

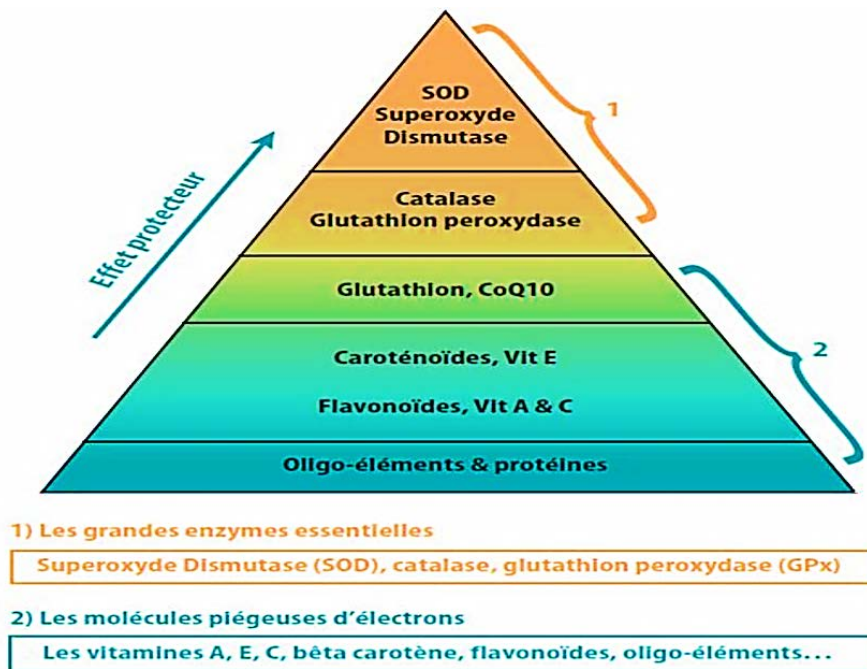


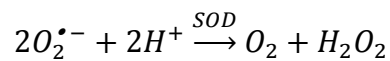
Figure 4 : Les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Menvielle-Bourg, 2005)

4.1. Le système antioxydant enzymatique

Les protéines enzymatiques antioxydantes constituent la première barrière de cette défense antioxydante, qui est constituée de trois métallo-enzymes essentielles : les superoxydes dismutases, la catalase et les glutathions peroxydases.

- **Les superoxydes dismutases**

Les superoxydes dismutases ou SOD (EC 1.15.1.1) sont des antioxydants enzymatiques ubiquitaires. Ces métalloprotéines représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant en assurant l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire selon la réaction suivant (Haleng *et al.*, 2007) :



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant diffusible et dangereux à distance (Goudable & Favier, 1997).

- **Catalase**

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elles sont localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Lindau-Shepard & Shaffer, 1993).

- **Glutathions peroxydase (GPX)**

Les GSHPX réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (Figure 5). Dans la cellule, dans les conditions physiologiques, la forme glutathion réduit est prédominante (95%). Les GSHPX connues sont des enzymes à sélénium. Le sélénium est intégré dans la protéine sous forme de séléncystéine. Le facteur limitant de la synthèse des sélénoprotéines, et donc des GSHPX, est la teneur intracellulaire en sélénium (Vitoux *et al.*, 1996).

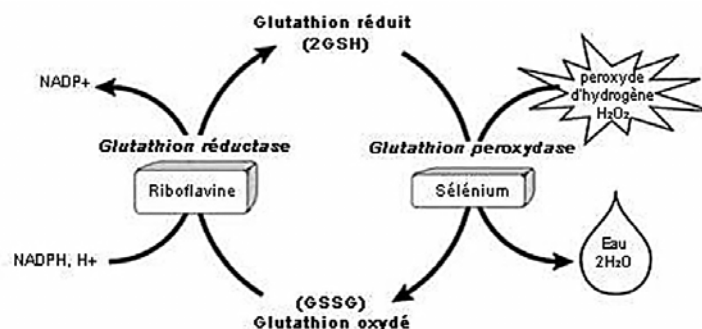


Figure 5 : Cycle oxydo-réducteur du glutathion (Hagen *et al.*, 1990)

Elles permettent également de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne, en réduisant les peroxydes instables en acide gras hydroxylés. Ce système ne fonctionne que si le GSSG formé est continuellement réduit en GSH, ce qui est assuré par la glutathion réductase en présence de NADPH, ce dernier pouvant être lui-même régénéré par l'intermédiaire d'un couplage métabolique avec la voie des pentoses phosphates (Lacolley *et al.*, 2008).

4.2. Le système antioxydant non enzymatique

L'organisme possède une seconde ligne de défense « *les piègeurs de radicaux libres* » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO (figure 6), limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

- **Vitamine E (α tocophérol)**

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, cette famille comprend 4 substances (α , β , γ , δ), α -tocophérols est la forme la plus active (Cuvelier *et al.*, 2003). Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme, situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, il est capable d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle HO \cdot . Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ROO \cdot pour former un radical tocophéryle (Delattre *et al.*, 2005).

La vitamine E permet de diminuer la peroxydation lipidique dans la membrane cellulaire et au sein des LDL. Elle est très active dans la résistance à l'oxydation des LDL (Azzi *et al.*, 1995).

- **Vitamine C (Acide ascorbique)**

C'est un antioxydant hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piéger directement l'anion superoxyde O $_2^{\cdot-}$, le radical hydroxyle HO \cdot , l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau via l'ascorbate peroxydase (Evans, 2000). En plus, elle permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E. La vitamine C a notamment un rôle antioxydant au niveau des tissus oculaires, en particulier la rétine, où elle participe à la dégradation du H $_2$ O $_2$ (Ohia *et al.*, 2005). L'acide ascorbique peut agir en tant qu'un antioxydant seulement en absence de métaux de transitions sous forme libre (Evans, 2000).

- **β carotène**

Le β carotène appartient à la grande famille des caroténoïdes, constituée de plus de 600 pigments identifiés dans de nombreux fruits et légumes, qui possèdent des propriétés anti oxydantes. Le β -carotène est notamment capable de piéger les radicaux hydroxyles HO^\bullet et peroxydes ROO^\bullet et ainsi d'inhiber les chaînes de peroxydations lipidiques, il neutralise également l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. En outre le β -carotène, tout comme l' α -carotène et β -cryptoxanthine, sont des caroténoïdes précurseurs de la vitamine A (ou rétinol) chez l'homme, de sorte que le β -carotène est une provitamine A (**Durand & Beaudeau, 2011**).

- **Les Polyphénols**

Les polyphénols sont des pigments végétaux dont les propriétés antioxydantes, les plus importants sont les flavonoïdes (**Médart, 2009**). Ils sont naturellement capables de piéger l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et le radical anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ en le dismutant en H_2O_2 (**Chen *et al.*, 2003**). Leur effet protecteur est notamment connu dans le système cardiovasculaire où ils préviennent l'oxydation des protéines. Ils sont particulièrement présents dans certaines boissons (thé, vin rouge, bière...) ou les fruits et légumes (agrumes, carottes...) (**Lehucher-Michel *et al.*, 2001**).

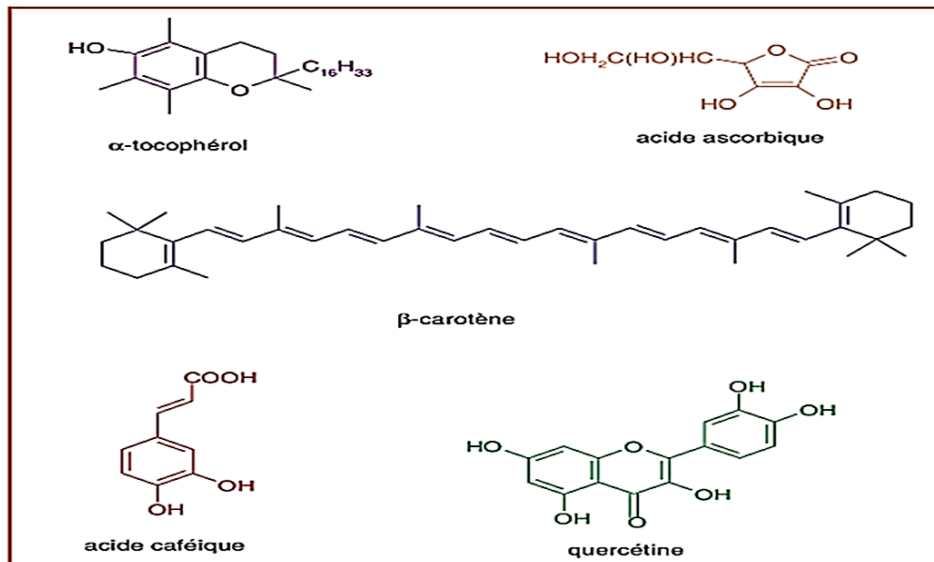


Figure 6 : Antioxydants d'origine alimentaire : α -tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C), β -carotène (famille des caroténoïdes), acide caféique et quercétine (famille des polyphénols)

5. Les cibles des radicaux libres

5.1. Oxydation de l'ADN

La molécule de l'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires (figure 7). Les modifications observées après l'action du radical HO[•] sont très nombreuses : conversion des résidus thymines en thymine glycol et 5-hydroxy méthyluracile, de la guanine en 8-hydroxy guanine, oxydation du désoxyribose entraînent une coupure des brins de la double hélice. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome et conduisant ainsi à la mutagenèse, la carcinogénèse et la mort cellulaire (Leverve *et al.*, 2001).

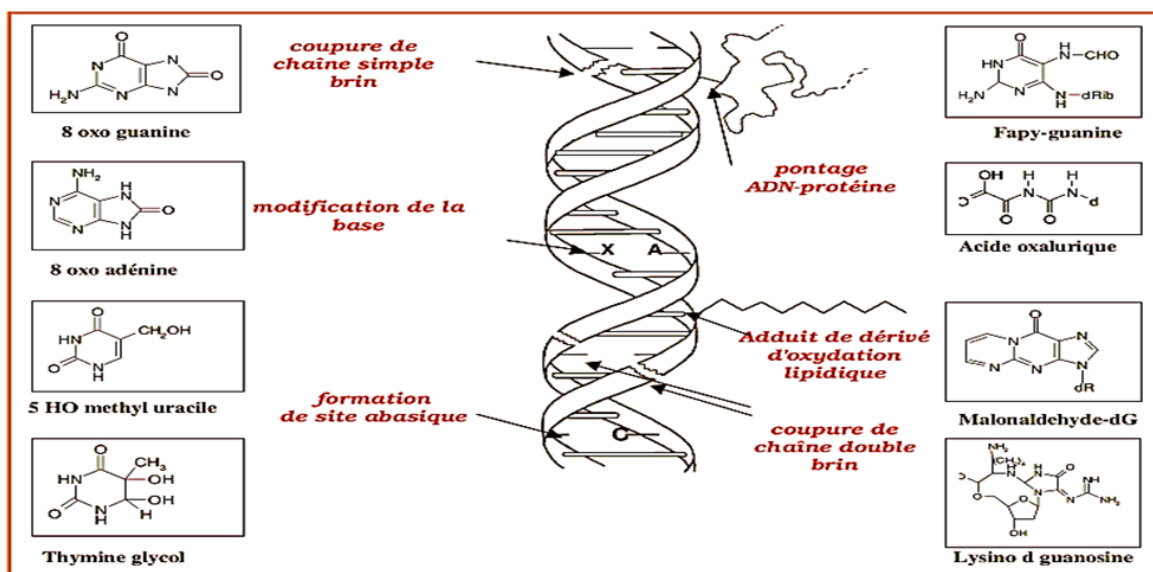


Figure 7 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules

5.2. Oxydation des protéines

L'électron non apparié des radicaux libres peut s'attaquer à la structure de certaines protéines, en particulier les protéines porteuses d'un groupement sulfhydryle (-SH), c'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et entraîner la formation de ponts entre protéines, une fragmentation ou une dénaturation de la protéine (Lacolley *et al.*, 2008). Les protéines sont sensibles à l'action du radical HO[•] (figure 8), celui-ci peut, en effet, réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, les plus sensibles à son action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, ou celui ayant un noyau imidazole comme l'histidine, sur lesquels le radical HO[•] s'additionne et provoque un changement de conformation de la molécule de protéine (Pasquier, 1995).

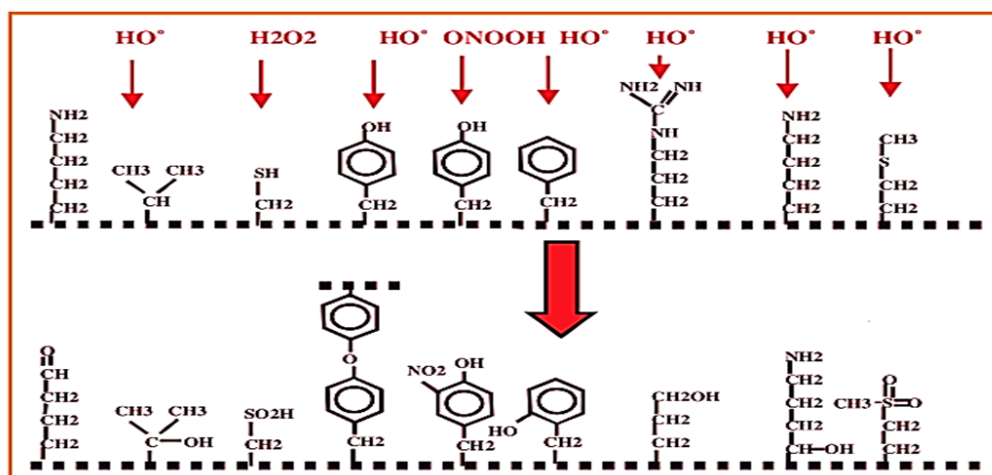


Figure 8 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire

5.3. Peroxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle HO^\bullet (figure 9), qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, et qu'il sera oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne, car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer *et al.*, 1992**).

Les produits de dégradation des lipides sont des aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) et des hydrocarbures tels que l'éthane et l'éthylène (**Gutteridge & Halliwell, 1990**).

La peroxydation lipidique dans les mitochondries entraîne des dysfonctionnements de la production d'ATP mais peut également induire l'apoptose (**Green & Reed, 1998**). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Favier, 2003**).

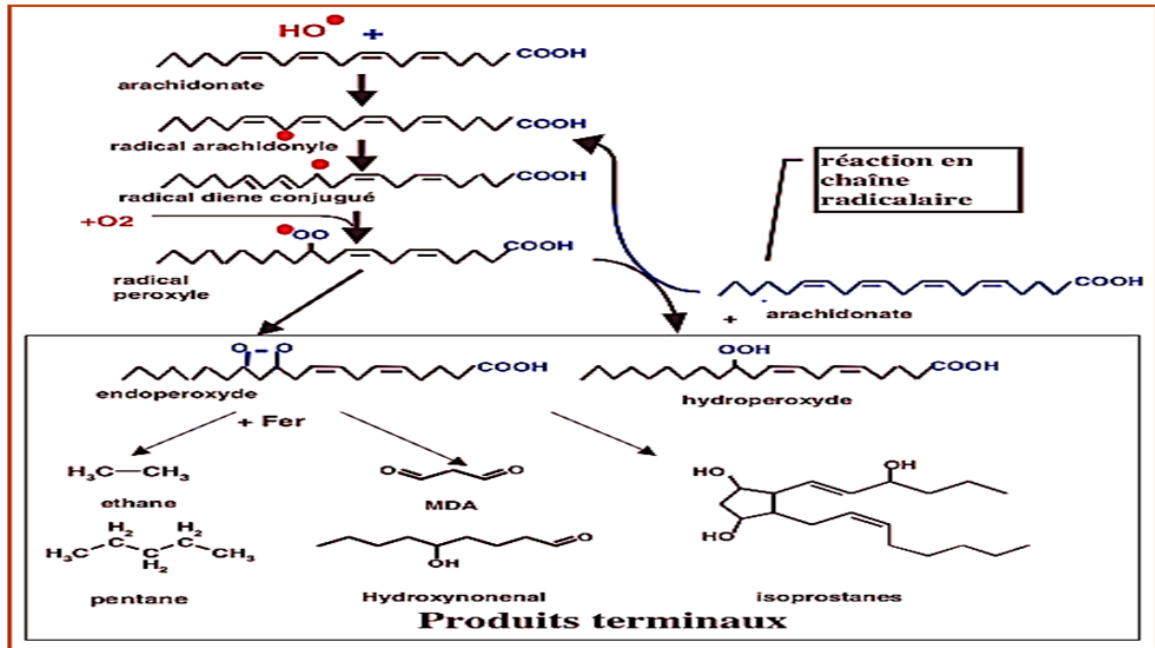


Figure 9 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature de produits terminaux formés

5.4. Hyperglycémie et stress oxydant

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans des conditions d'hyperglycémie chronique : auto-oxydation du glucose, surproduction de radicaux superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale et par activation de la NAD(P)H oxydase vasculaire, voie des polyols, et formation de produits de glycation avancée (figure 10).

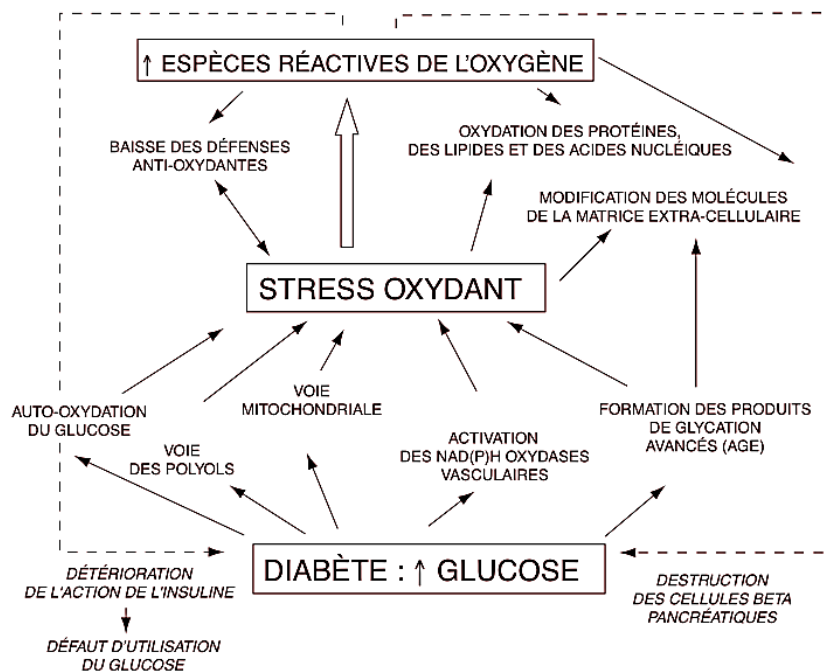


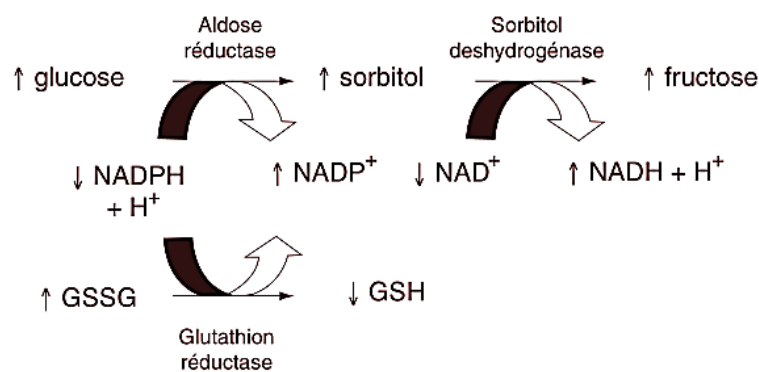
Figure 10 : Relations entre hyperglycémie et stress oxydant

Selon **Bonnefont-Rousselot *et al.*, (2004)**, le gradient de protons généré par la chaîne mitochondriale de transport des électrons conduit à une production intracellulaire de radicaux superoxide ($O_2^{\cdot-}$), au niveau de deux sites principaux : la NADH déshydrogénase du complexe I, et l'interface entre l'ubiquinone et le complexe III. Cette surproduction de superoxyde est accrue en présence de fortes concentrations de glucose.

Le gradient de protons généré par la chaîne mitochondriale de transport des électrons conduit à une production intracellulaire de radicaux superoxide ($O_2^{\cdot-}$), au niveau de deux sites principaux : la NADH déshydrogénase du complexe I, et l'interface entre l'ubiquinone et le complexe III. Cette surproduction de superoxyde est accrue en présence de fortes concentrations de glucose qui sont susceptibles d'induire la synthèse de diacylglycérol ou l'hydrolyse des phosphatidylcholines, activant ainsi la protéine kinase C (PKC). Par ailleurs, les cellules vasculaires telles que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses sont capables de produire des ERO via l'activation des NAD(P)H oxydases.

De fortes concentrations de glucose peuvent stimuler la production d'ERO en activant la NAD(P)H oxydase par une voie dépendante de la PKC.

Une production accrue de sorbitol par la voie des polyols a lieu en présence de concentrations élevées de glucose. Cette voie est importante à noter car elle conduit à une déplétion intra-cellulaire de NADPH puisque le NADPH est nécessaire à l'activité de l'aldose réductase (figure 11).



GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydé

Figure 11 : Voie des polyols et stress oxydant

CHAPITRE 3 :
LES COMPOSÉS
PHÉNOLIQUES

1. Définition


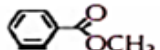
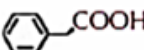
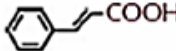
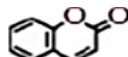
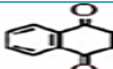
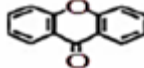
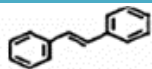
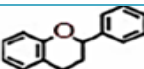
Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substance qu'il est difficile de définir. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié un ou plusieurs groupes hydroxyles, libre ou engagé (Bruneton, 2009).

Les polyphénols peuvent être conjugués, avec un ou plusieurs résidu(s) glucidique(s), ou être liés à d'autres composés chimiques tels que des acides carboxyliques, des amines, des lipides ou avec d'autres phénols (Martin & Andriantsitohaina, 2002).

2. Les classes des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 1). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2008)

Nombre de carbone	Squelette	Clarification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1C	Acide phénoe	Acide gallique	
8	C6-C2	Acétophénone	Gallactophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide hydroxyphényl-acitique	
9	C6-C3	Acide hydroxycinamique	Acide p-coumarique	
9	C6-C3	coumarine	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiférine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

2.1. Phénols simples et les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

- **Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque**

Les acides phénols en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables.

D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique (**Bruneton, 2009**).

- **Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique**

La plupart des acides phénols en C6-C3 (acides coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres sont peu fréquents. Les acides cinnamique et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation (**Cowan, 1999**).

- **Phénols simples**

Tels que le catéchol, phloroglucinol...etc, sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (*Ericaceae, Rosaceae,...*). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (**Cowan, 1999**).

2.2. Quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (**Bruneton, 2009**).

Elles sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan, 1999**).

2.3. Stilbène

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (**Crozier *et al.*, 2008**).

2.4. Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolées dans environ soixante-dix familles.

2.5. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (**Havsteen, 2002**).

Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (**Edenharder & Grünhage, 2003**) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (figure 12) (**Yao *et al.*, 2004**).

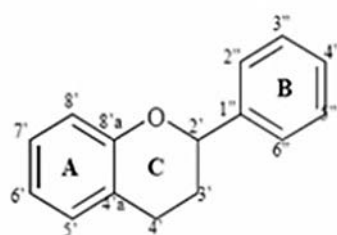


Figure 12 : Structure générale des flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes (figure 13) dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C2-C3, du groupe 3-Oetla fonction 4-oxo (**Yao *et al.*, 2004**).

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes (**Havsteen, 2002; Edenharder & Grünhage, 2003**).

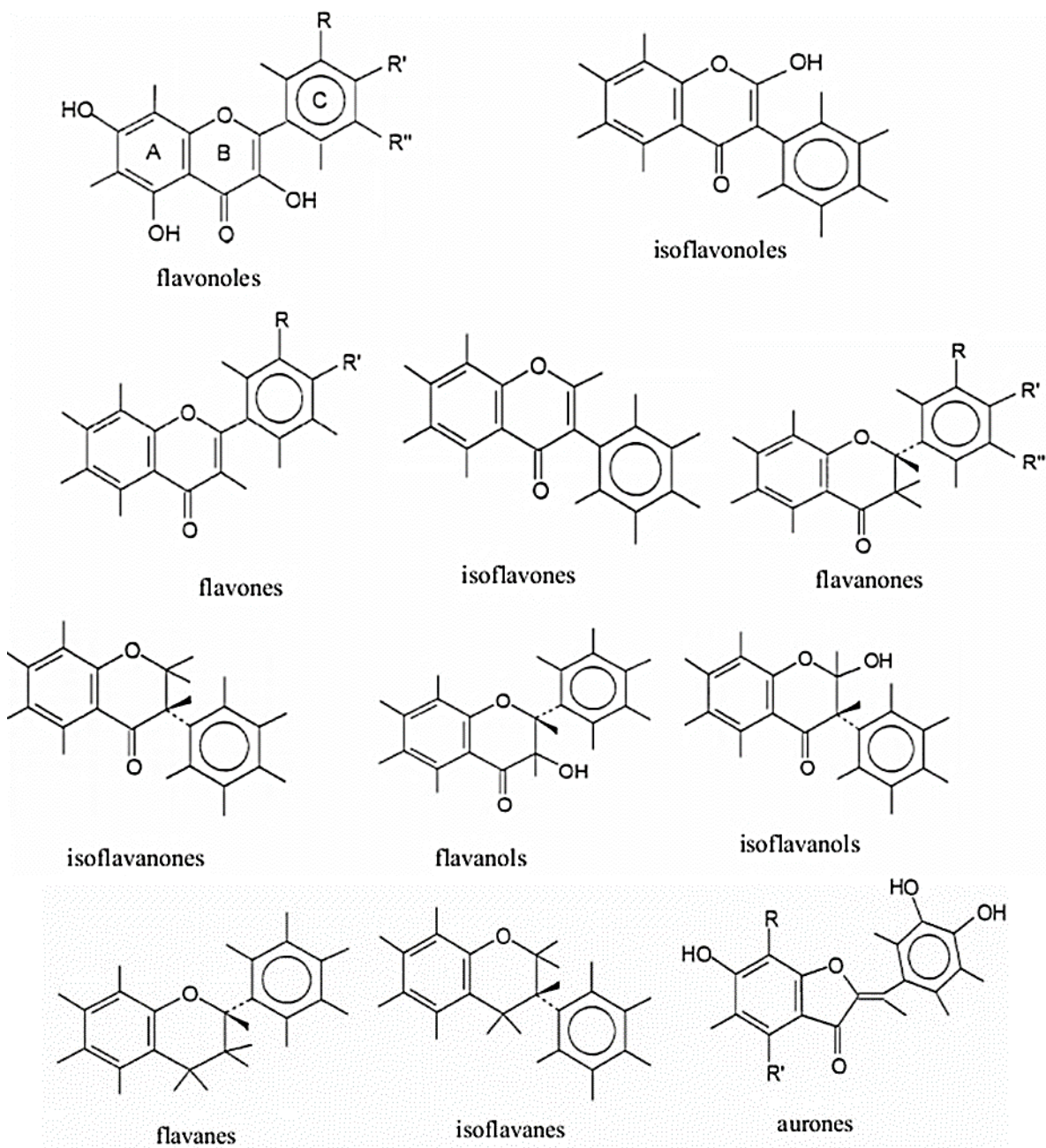


Figure 13 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002)

2.6. Anthocyanosides

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (**Bruneton, 2009**). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides).

Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium (figure 14) plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux).

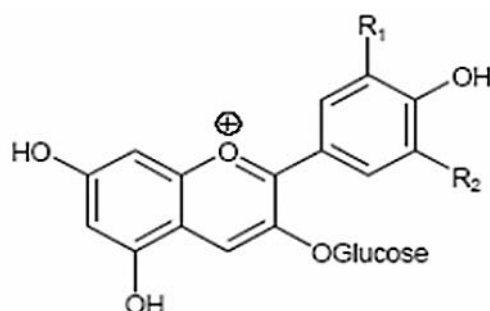


Figure 14 : Structure des anthocyanosides

2.7. Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996; Cowan, 1999).

On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

- **Tannins hydrolysables**

Ils sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol (figure 15). Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Cowan, 1999; Bruneton, 2009).

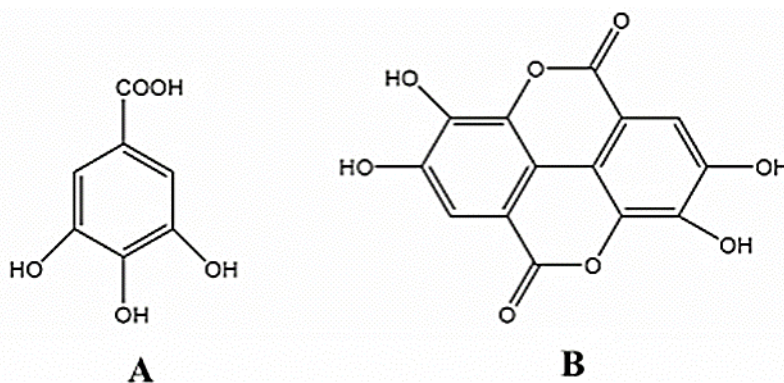


Figure 15 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

- **Tannins condensés**

Les tannins condensés ou tannins catéchiques ou proanthocyanidols qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (**Bruneton, 2009**).

2.8. Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C₆-C₃ (figure 16), appartiennent au groupe des composés connus par des benzopyrone (**Keating & O'Kennedy, 1997**) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combinées avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (**Cowan, 1999**).

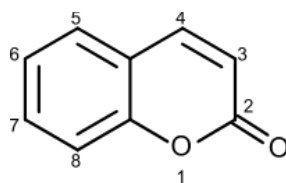


Figure 16 : Structure générale de coumarine

PARTIE
EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE 4 :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Objectif

Nous avons réalisé notre travail de fin d'étude au sein de le laboratoire de biochimie de département de biologie de l'université Amar Télidji – Laghouat.

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante des composés phénoliques de l'espèce *Lobaria pulmonaria* par la méthode de DPPH•. Le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail sont décrits ci-dessous.

2. Matériel végétal

Le matériel végétal : *Lobaria pulmonaria* est acheté chez un herboriste qui est-il récoltée sur des troncs d'arbres. Au laboratoire, le matériel végétal est lavé puis séché à l'abri de la lumière pendant quelques semaines. Après séchage, la plante est broyée en poudre fine.

3. Matériel techniques et produits

3.1. Produits chimique

Les produits chimiques sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Les produits chimiques et les réactifs utilisé

Produits chimiques	Fabricant
<i>Solvant organiques</i>	
Méthanol : (CH ₃ OH)	Sigma-Aldrich Germany
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Riedel-de-Haën Germany
Acétone	Sigma-Aldrich Germany
Dichlorométhane	Sigma-Aldrich Germany
<i>Composés pure</i>	
Acide gallique monohydrate	Sigma-Aldrich Germany
Quercétine	Sigma-Aldrich Germany
Acide ascorbique	Honeywell Fluka Germany
<i>Réactifs</i>	
DPPH	Sigma-Aldrich Germany
Solution de Folin ciocalteau	Riedel-de Haën Germany
<i>Sels</i>	
Carbonate de sodium	Honeywell Fluka Germany
Trichlorure d'aluminium	Honeywell Fluka Germany

3.2. Appareils et instruments

Appareils et instruments	Caractéristiques
<i>Rota vapeur</i>	R220 BUCHI
<i>Spectrophotomètre UV/Visible</i>	SHIMADZU UV 1601
<i>Balance électronique de précision</i>	OHAUS 10 ⁻⁴ g
<i>Agitateur magnétique plaque chauffante</i>	Stuart max 300°C
<i>Agitateur vortex</i>	Fischer scientifique (40 Hertz)
<i>Micropipettes (variable)</i>	100 et 1000 µl

4. Méthode d'extraction

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est la macération par quatre solvants organiques de polarité différente (*Méthanol, Ethanol, Acétone, Dichlorométhane*) décrite par **Djeridane et al. (2006)**.

Ce type d'extraction est un simple contact entre le support solide et le solvant ; 10g de poudre ont été mélangés avec 100 ml de chaque solvant d'extraction (méthanol, éthanol, acétone, dichlorométhane) ; le mélange a été mis sous l'agitateur (*shakeur*) à température ambiante et à l'obscurité pendant 24h, l'opération est répétée deux fois avec renouvellement du solvant. Après la macération (48h), le mélange a été filtré à l'aide d'un papier wattman.

Les deux fractions filtrées sont regroupées et évaporées à sec sous pression réduite dans un rota-vapeur (figure 17) ; après l'évaporation l'extrait a été récupéré, et mélangé la matière sèche de chaque solvant avec 10ml de méthanol.



Figure 17 : Photo illustre l'évaporation d'un échantillon par le Rota-vapeur (Original)

4.1. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est déterminé à l'aide de l'équation suivante (Mahmoudi *et al.*, 2013).

$$R\% = \frac{\text{Masse résidu sec}(g)}{\text{Masse de plante}(g)} \times 100$$

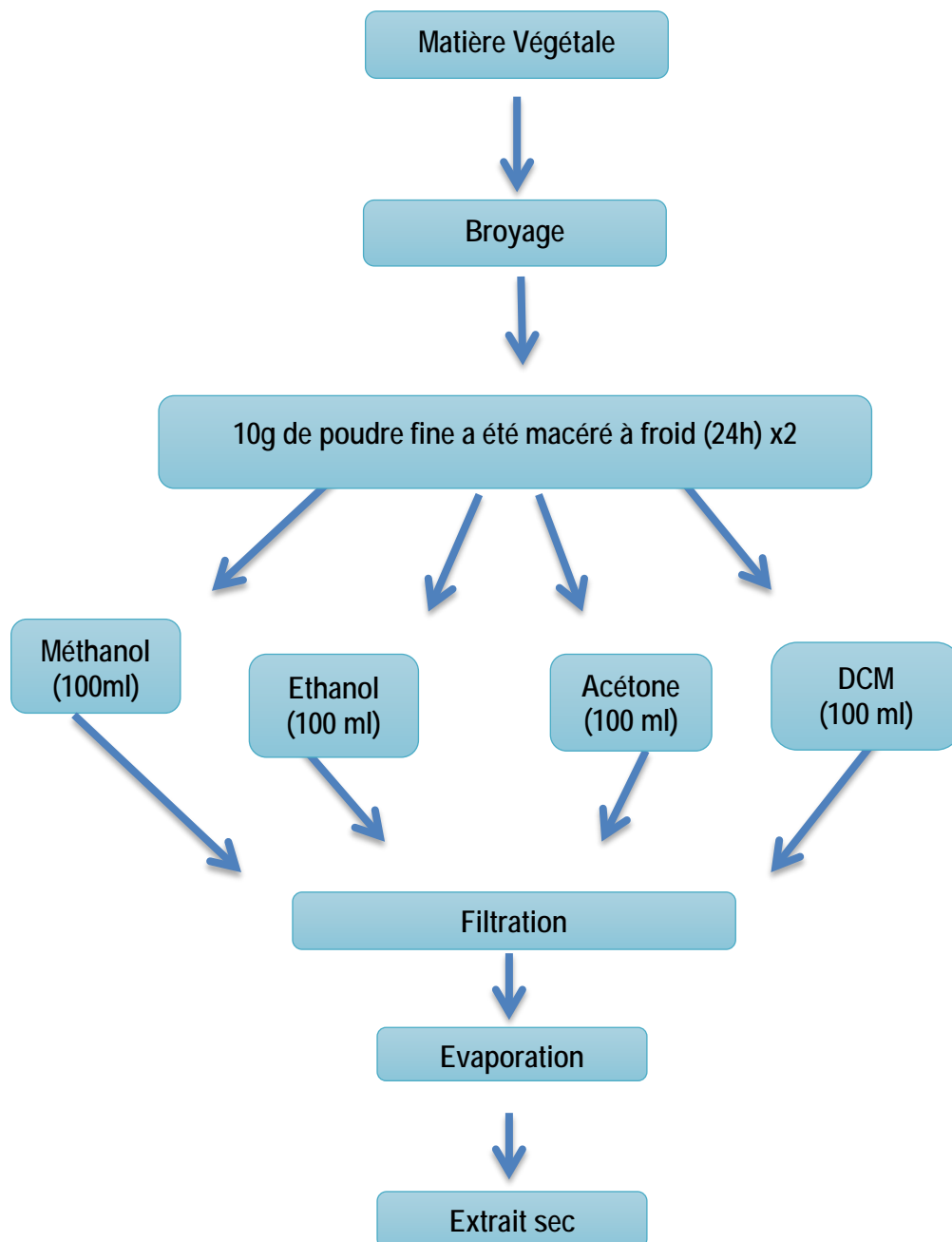


Figure 18 : Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction des polyphénols

5. Dosage de composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénol totaux de l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de **Slinkard & Singleton (1977)** en utilisant le réactif de *Folin ciocalteau*, tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium (AlCl_3).

5.1. Dosage des polyphénols totaux

Principe

Tout le contenu phénolique dans l'extrait brut a été déterminé par spectrophotomètre au biais de la méthode *Foline-Ciocalteu*, rapportée dans **Slinkard et Singleton 1977**, le réactif est formé d'acide phosphotungstique $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $\text{H}_3\text{PM}_{12}\text{O}_{40}$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène.

Mode opératoire

250 μl de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 50 μl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables.

Après 2 min, 1 ml d'une solution de carbonate de sodium 4% (m/v), sont additionnés au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec de la plante (mg EAG/g d'extrait sec).

La courbe d'étalonnage :

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de concentrations allant de 0.1 à 0.5 g/l (même Protocole des échantillons).

5.2. Dosage des flavonoïdes

Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode citée par **Djeridane et al. (2006)** en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif.

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec le groupement carbonyle C-4 et aussi les groupements hydroxyles C-3 et C-5 des flavones et flavonols, en plus il forme des complexes acides labiles avec les groupements di-hydroxyles en ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (**Mabry et al., 2012**), ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm.

Mode opératoire

Un ml de chaque solution diluée dans le méthanol ou de l'extrait végétal dilué est mélangé avec 1 ml du trichlorure d'aluminium 2 % (m/v), ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 430nm.

La courbe d'étalonnage

La quercétine a été utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage. Une solution mère de concentration 0,5g/l préparée dans le MeOH a été diluée pour obtenir des solutions filles de concentrations différentes variant entre 0,1g/l et 0,5g/l.

6. Evaluation de l'activité antioxydante par le piégeage de radical libre DPPH[•]

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et les composés phénoliques font généralement intervenir à la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un antioxydant. Parmi ces techniques d'analyse on a utilisé le test DPPH[•] (2,2 diphenyl-1-picryl-hydrazyle), joue sur le transfert d'électron singulet pour différentes concentrations de l'extrait et une comparaison avec des antioxydants de références (Trolox ; Vitamine C).

Principe

La méthode est basée sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH[•] en présence d'un donneur d'hydrogène H[•] (le cas d'un antioxydant). La solution de DPPH[•] montre une forte bande d'absorption à 515 ~ 517 nm, avec une couleur violet foncé et qui se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Figure 19).

La décoloration qui en résulte est stœchiométrique ; elle concerne le degré de réduction. Le DPPH[•] restant, mesuré après un certain temps, correspond inversement à l'activité de piégeage des radicaux libres par l'antioxydant (**Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004**).

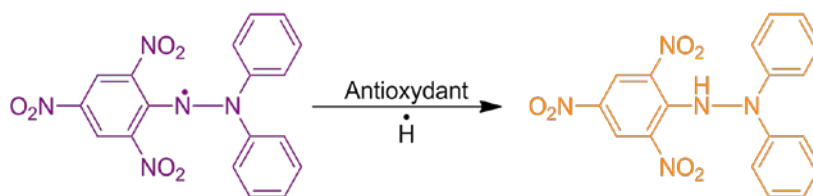


Figure 19 : Réduction du radical libre DPPH[•] (Molyneux, 2004)

Mode opératoire

Un volume de 1 ml, de chaque solution fille (Extrait brut de chaque solvant), récemment préparée dans le MeOH, est ajouté à 1 ml de solution de DPPH[•] (100µM) fraîchement préparée. Après 30 min d'incubation, à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lu contre le blanc **A₀** (1ml de la solution de DPPH et de 1ml de méthanol) à 517 nm par spectrophotomètre (UV/Vis).

Le pourcentage (%) d'inhibition des radicaux libres de DPPH[•] a été calculé par la relation suivante :

$$I\% = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100$$

A : Absorbance de la solution de DPPH[•] en présence de l'échantillon

A₀ : Absorbance de la solution de DPPH[•] en absence de l'échantillon

A partir de la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons, les valeurs EC₅₀ ont été déterminées en (µg/ml), qui représentent les concentrations des échantillons à 50% de neutralisation des radicaux libres (DPPH[•]).

Les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C) et le Trolox.

CHAPITRE 5 :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats de l'extraction des composés phénoliques

La préparation des extraits a été effectuée selon la méthode modifiée de **Djeridane *et al.* (2006)**. Cette méthode est basée sur l'utilisation des solvants à polarité croissante. En utilisant Le *méthanol*, *l'éthanol*, *l'acétone* et *dichlorométhane* comme des solvants d'extraction par macération.



Figure 20 : Photos des extraits bruts obtenus après filtration puis évaporation (Prise le 21/02/2018)

La couleur, l'aspect (figure 20) ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids sec de plante, sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Aspect, couleur, la masse et le rendement de chaque extrait végétal

Solvants	Masse de résidu sec (g)	Rendement %	Couleur de résidu sec	Aspect de résidu sec
<i>Méthanol</i>	1.329	13.29	Jaune/marron	visqueux
<i>Ethanol</i>	1.069	10.69	Vert foncé	pate
<i>Acétone</i>	0.461	4.61	Vert olive	poudre
<i>DCM</i>	0.385	3.85	vert	poudre

Les rendements des fractions organiques varient de 3.85% à 13.29 % dans des différents extraits des solvants organiques (*Méthanol*, *Ethanol*, *Acétone*, DCM) de la plante étudiée.

Nous remarquons que le rendement le plus faible a été observé pour le solvant dichlorométhane et l'acétone avec un pourcentage de 3.85% et 4.61%, respectivement.

Alors que le rendement le plus élevé a été observé pour le solvant méthanol avec (13.29 %) et l'éthanol (10.69%). Nous pouvons dire que nos extraits présentent des teneurs élevées par rapport aux masses macérées.

Donc, l'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale dépend de plusieurs facteurs qui contribuent à son efficacité : la méthode d'extraction, la granulométrie des particules, la durée d'extraction, la nature et le volume des solvants utilisés.

2. Résultat du dosage des phénols totaux et des flavonoïdes

Le dosage de polyphénols totaux et de flavonoïdes a été effectué par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de *Folin-Ciocalteu* et le trichlorure d'aluminium (AlCl_3), respectivement.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de plante a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (figure 21) (l'équation de la courbe : $y = 2.468x$; $R^2=0.9995$) qui est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec de la plante (mg EAG/g d'extrait sec).

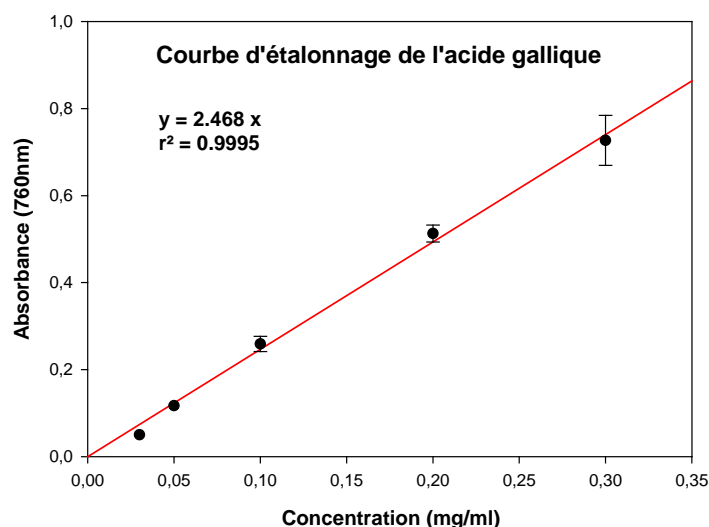


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique dans le dosage des polyphénols

La quantification des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage (figure 22) et les résultats sont exprimés en équivalent de la quercétine.

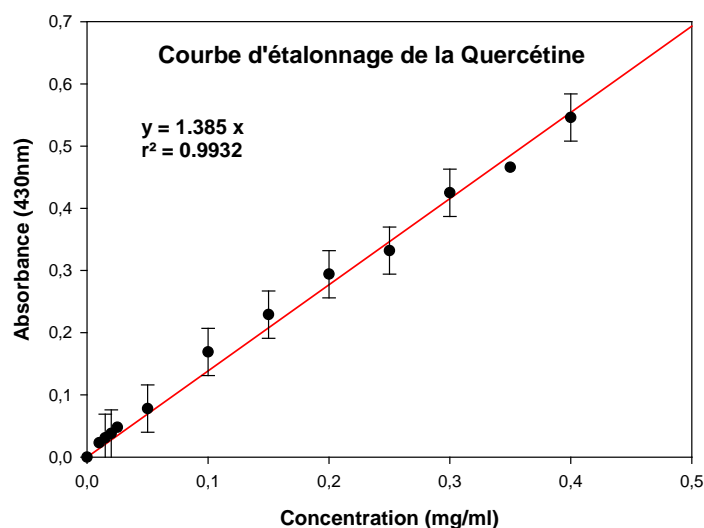


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la quercétine dans le dosage des flavonoïdes

D'après les résultats, on peut constater que tous les extraits de la plante étudiés, sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes.

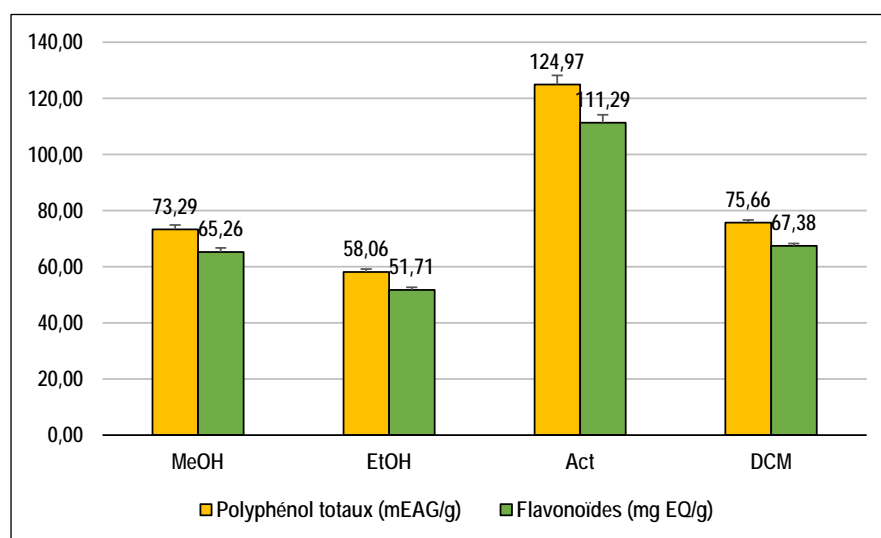


Figure 23 : Histogrammes montre les teneurs en polyphénol totaux et les flavonoïdes

Le figure ci-dessus, montre que l'extrait d'acétone possède la plus haute teneur en polyphénols totaux ($124,97 \pm 3,16$ mgEAG/g extrait sec), suivi par l'extrait dichlorométhane et le méthanol avec une teneur de $75,66 \pm 0,95$ mg EAG/g extrait sec et $73,29 \pm 1,59$ mg EAG/g extrait sec ; tandis que l'extrait éthanol présente le plus faible teneur par rapport les autres solvants ($58,06 \pm 1,06$ mg EAG/g extrait sec).

La même chose pour les flavonoïdes donc l'extrait l'acétone possède la plus haute teneur en flavonoïdes totaux ($111,29 \pm 2,82$ mg EQ/g extrait sec), suivi par l'extrait

dichlorométhane et l'extrait méthanol de $67,38 \pm 0,84$ et $65,26 \pm 1,41$ mg EQ/g extrait sec, respectivement. Enfin l'extrait éthanol de faible teneur ($51,71 \pm 0,95$ mg EQ/g extrait sec).

Les résultats de la teneur en polyphénol totaux ($124,97 \pm 3,16$ mgEAG/g extrait sec) sont différentes avec ceux obtenu par **Fehmi *et al.* (2004)**, ce dernier ont trouvé des valeurs en polyphénol totaux de 39,2 mEAG/g extrait sec pour l'espèce *Lobaria pulmonaria*.

En effet, la plante étudiée est montre une richesse importante en phénols totaux et flavonoïdes, qui sont doués sans doute d'une activité antioxydant en plus des autres activités biologiques.

2.1. Discussion

Vue la différence dans les teneuses en polyphénol totaux entre les différents solvants utilisés dans cette étude, on peut dire que la faible spécificité du réactif de *Folin-Ciocalteu* est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines ...etc. (**Vuorela, 2005; Gómez-Caravaca *et al.*, 2006**).

Le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (**Djeridane *et al.*, 2006**). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (**Tawaha *et al.*, 2007**). La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols. En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Falleh *et al.*, 2008**). Même, l'influence des conditions environnementales et des variations saisonnières dans la production de composés phénoliques dans diverses espèces de lichen a été signalée dans plusieurs études (**BeGora & Fahselt, 2001; Bjerke *et al.*, 2005**).

3. Résultats de l'activité antioxydante (Test DPPH)

Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée. La figure ci-dessous représente la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait.

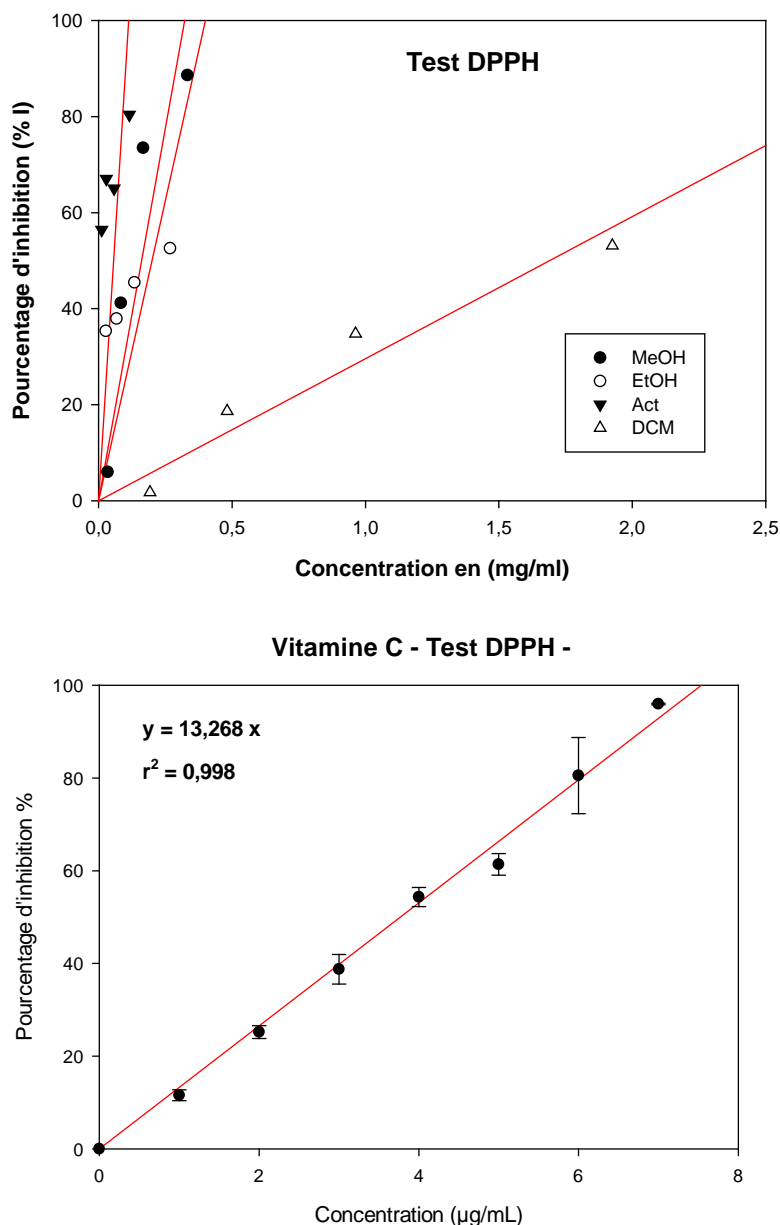


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• en fonction de concentrations (mg/ml) des extraits testés et (µg/ml) la Vit C

Ces pourcentages correspondent à une inhibition du radical DPPH reflétée par la décoloration du DPPH de couleur violet en couleur jaune pâle.

La capacité antioxydant des différents extraits a été déterminée à partir de l'EC₅₀, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50% du radicale DPPH. Plus la valeur d'EC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydant d'un composé est grande (Hebi & Eddouks, 2016). Les valeurs d'EC₅₀ des quatre extraits sont figurées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Les valeurs d'EC₅₀ des quatre extraits de l'espèce *Lobaria pulmonaria*

Extraits	EC ₅₀ (µg/ml)
<i>Méthanol</i>	161,22 ± 1,61
<i>Ethanol</i>	200,02 ± 7,10
<i>Acétone</i>	56,31 ± 0,61
<i>DCM</i>	1689,76 ± 32,2
<i>Vitamine C</i>	3,77 ± 0,17

Toutes les extraits testées (Acétone, Méthanol, Ethanol et DCM) ont été provoqué une diminution importante de l'absorbance à 517 selon leur concentrations.

L'extrait de l'acétone a présenté l'activité antioxydante la plus élevée (EC₅₀ : 56,31 ± 0,61 µg/ml), suivie par l'extrait méthanol et l'éthanol (161,22 ± 1,61 µg/ml) et (200,02 ± 7,10 µg/ml) respectivement. Ces deux derniers ne présentent pas une différence significative dans leur activité. L'extrait DCM se trouve en dernier position avec de valeur d'EC₅₀ est de 1689,76 ± 32,2 µg/ml.

Nous constatons que l'extrait d'acétone a présenté une activité plus élevé que celles des autres extraits avec de valeur d'EC₅₀ de 56,31 ± 0,61 µg/ml. Cette activité pourrait être liée à sa richesse en polyphénols totaux (124,97 ± 3,16 mg EAG/g extrait sec) et en flavonoïdes (111,29 ± 2,82 mg EQ/g extrait sec).

3.1. Discussion

De manière générale, il ressort que les valeurs de l'EC₅₀ des extraits Acétone, Méthanol, Ethanol et DCM et l'antioxydant de référence (vitamine C) se présentent dans l'ordre suivant :

$$\text{Vitamine C} < \text{Acétone} < \text{Méthanol} < \text{Ethanol} < \text{DCM}$$

Tableau 4 : Test de corrélation entre les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les valeurs inverse d'EC₅₀

Corrélation (R)	<i>Polyphénol totaux</i>	<i>Flavonoïdes</i>	<i>1/EC₅₀</i>
<i>Polyphénol totaux</i>	1		
<i>Flavonoïdes</i>	1	1	
<i>1/EC₅₀</i>	0,872	0,872	1

La teneur des polyphénols totaux des différents extraits s'est corrélée significativement ($R = 0.872$) avec leur activité antioxydante. De même pour les flavonoïdes un coefficient de corrélation égale à 0.872.

Cette corrélation a été montrée par **Fehmi *et al.* (2004)**, dont la plus grande quantité de polyphénol totaux et l'activité antioxydante a été démontrée par l'extrait méthanolique de *L. pulmonaria*. Il existe de fortes relations entre les valeurs de polyphénol totaux et l'activité antioxydante des extraits de méthanol de cette espèce.

La solubilité d'un composé dans l'environnement réactionnel peut affecter son activité. En général, la solubilité des aglycones dans la phase émulsion est supérieure à celle des glycosides (**Huang *et al.*, 1996**). La majorité des composés phénoliques, synthétisés par les espèces de lichens, sont des aglycones, qui ont une plus grande solubilité dans le méthanol que dans l'eau (**Culberson, 1969; Zeybek & Yildiz, 2000**).

Par conséquent, les polyphénols totaux et l'activité antioxydante élevés de l'extrait acétone de *L. pulmonaria* peuvent être attribués à la forte solubilité dans ce dernier des composés phénoliques antioxydants.

Ces résultats s'expliqueraient non seulement par la richesse des extraits en polyphénols, mais aussi par la nature de leurs composés phénoliques hydrosolubles (flavonoïdes) qui sont caractérisés par des groupements hydroxyles fortement impliqués dans l'activité anti-radicalaire (**Robards *et al.*, 1999**).

Selon **Turkmen *et al.* (2007)**, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur structure chimique idéale.

Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (**Bourgou *et al.*, 2008**).

CONCLUSION

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. La majorité des médicaments actuels sont des copies concentrées de remèdes végétaux, notamment les polyphénols qu'ils sont les composés les plus intéressants et les plus étudiés de nos jours.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de *Folin-ciocalteu* a révélé la présence des quantités importantes en polyphénols dans les quatre extraits (Méthanol, Ethanol, Acétone, Dichlorométhane) de la plante étudiée.

Globalement, la plante sélectionnée dans ce travail contient probablement des molécules très intéressantes qui peuvent être considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

L'ensemble des résultats obtenus au cours des analyses quantitatives par spectrophotométrie UV/visible, nous a permis de trouver des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes très variables entre les différents extraits, dont l'extrait acétone possède la plus haute teneur en phénols totaux ($124,97 \pm 3,16$ mg EAG/g extrait sec) et en flavonoïdes ($111,29 \pm 2,82$ mg EQ/g extrait sec).

L'étude de l'activité antioxydante par le test DPPH a montré que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait acétone dépasse 80% dont la valeur d' EC_{50} est de $56,31 \pm 0,61$ μ g/ml. La comparaison des valeurs des EC_{50} obtenus avec la vitamine C (acide ascorbique), nous a permis de déduire que l'activité antioxydante de l'ensemble des extraits testés est plus faible par rapport à celle des standards.

En perspectives, dans le but de compléter ce travail, on propose :

- ✓ D'étudier l'activité antioxydante des huiles essentielles de cette plante.
- ✓ De tester l'effet antimicrobien des polyphénols et des huiles essentielles de *Lobaria pulmonaria*.
- ✓ D'identifier les principes actifs de cette espèce avec des méthodes chromatographiques.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aruoma, Okezie I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 9-20.
- Asplund, Johan; Larsson, Per; Vatne, Steinar & Gauslaa, Yngvar. (2010). Gastropod grazing shapes the vertical distribution of epiphytic lichens in forest canopies. *Journal of Ecology*, 98(1), 218-225.
- Azzi, Angelo; Boscoboinik, Daniel; Marilley, Dominique; Ozer, Nesrin K; Stäuble, B & Tassinato, A. (1995). Vitamin E: a sensor and an information transducer of the cell oxidation state. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1337S-1346S.
- BeGora, Michael D & Fahselt, Dianne. (2001). Usnic acid and atranorin concentrations in lichens in relation to bands of UV irradiance. *The Bryologist*, 104(1), 134-140.
- Berger, Mette M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(1), 48-53.
- Bjerke, Jarle W; Elvebakk, Arve; Domínguez, Erwin & Dahlback, Arne. (2005). Seasonal trends in usnic acid concentrations of Arctic, alpine and Patagonian populations of the lichen *Flavocetraria nivalis*. *Phytochemistry*, 66(3), 337-344.
- Bonnefont-Rousselot, D; Beaudeau, J-L; Théron, P; Peynet, J; Legrand, A & Delattre, J. (2004). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales pharmaceutiques françaises*, 62(3), 147-157.
- Bourgou, Soumaya; Ksouri, Riadh; Bellila, Amor; Skandrani, Ines; Falleh, Hanen & Marzouk, Brahim. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 48-55.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 25-30.
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales (4e ed.). Paris: *Lavoisier*, 1269p.
- Carlsson, Ralf & Nilsson, Katarina. (2009). *Status of the red-listed lichen Lobaria pulmonaria on the Åland Islands, SW Finland*. Paper presented at the Annales Botanici Fennici.
- Chen, Liuji; Yang, Xianqiang; Jiao, Hongli & Zhao, Baolu. (2003). Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells. *Chemical research in toxicology*, 16(9), 1155-1161.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Clauzade, Georges; Roux, Claude; Houmeau, J-M & Roux, Claude. (1985). *Likenoj de Okcidenta Eŭropo: ilustrita determinlibro* (Généralités sur les lichens et leur détermination. Traduction par VAILLE. L, Trans.): Société botanique du centre-ouest, 893p.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-570.
- Crozier, Alan; Clifford, Mike N & Ashihara, Hiroshi. (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*: John Wiley & Sons.
- Culberson, Chicita F. (1969). *Chemical and botanical guide to lichen products*. The University of North Carolina Press: Chapel Hill, USA.
- Cuvelier, C; Dotreppe, O & Istasse, L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét*, 147, 315-324.
- Delattre, J.; Beaudoux, J.L. & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques*: Tec & Doc Lavoisier, 549p.
- Delattre, J.; Durand, G. & Jardillier, J. C. (2003). *Biochimie pathologique: Aspects moléculaires et cellulaires*. Paris: Flammarion, 317p.
- Desceemaeker, K. (2004). Nutri-& Phytothérapie: développements récents. *GARANT*, 41-51.
- Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P. & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660.
- Droge, Wulf. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Durand, G. & Beaudoux, J.L. (2011). *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives*: Médecine Sciences publications, Lavoisier, 607p.
- Edenharder, R & Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(1), 1-18.
- Edman, Mattias; Eriksson, Anna-Maria & Villard, Marc-André. (2008). Effects of selection cutting on the abundance and fertility of indicator lichens *Lobaria pulmonaria* and *Lobaria quercizans*. *Journal of Applied Ecology*, 45(1), 26-33.
- Esterbauer, Hermann; Gebicki, Janusz; Puhl, Herbert & Jürgens, Günther. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(4), 341-390.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Evans, William J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise—. *The American journal of clinical nutrition*, 72(2), 647S-652S.
- Falleh, Hanen; Ksouri, Riadh; Chaieb, Kamel; Karray-Bouraoui, Najoua; Trabelsi, Najla; Boulaaba, Mondher & Abdelly, Chedly. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- Favier, Alain. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- Fehmi, Odabasoglu; Ali, Aslan; Ahmet, Cakir; Halis, Suleyman; Yalcin, Karagoz; Mesut, Halici & Yasin, Bayir. (2004). Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytotherapy Research*, 18(11), 938-941.
- Gardès-Albert, Monique; Bonnefont-Rousselot, Dominique; Abedinzadeh, Zohreh & Jore, Daniel. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- Gómez-Caravaca, AM; Gómez-Romero, M; Arráez-Román, D; Segura-Carretero, A & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Goudable, Joëlle & Favier, Alain. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- Green, Douglas R & Reed, John C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *science*, 1309-1312.
- Gutteridge, John MC & Halliwell, Barry. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in biochemical sciences*, 15(4), 129-135.
- Hagen, TORY M; Wierzbicka, GRAZYNA T; Sillau, AH; Bowman, BARBARA B & Jones, DEAN P. (1990). Bioavailability of dietary glutathione: effect on plasma concentration. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 259(4), G524-G529.
- Haleng, Jeanine; Pincemail, Joël; Defraigne, Jean-Olivier; Charlier, Corinne & Chapelle, Jean-Paul. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-638.
- Halliwell, B. (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie-biologie*, 44(1), 6-13.
- Halliwell, Barry. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British journal of experimental pathology*, 70(6), 737.
- Haslam, Edwin. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2), 205-215.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Havsteen, Bent H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- Hebi, M & Eddouks, M. (2016). Évaluation de l'activité antioxydante de Stevia rebaudiana. *Phytothérapie*, 14(1), 17-22.
- Hilmo, O & Ott, S. (2002). Juvenile development of the cyanolichen *Lobaria scrobiculata* and the green algal lichens *Platismatia glauca* and *Platismatia norvegica* in a boreal *Picea abies* forest. *Plant Biology*, 4(02), 273-280.
- Hilmo, Olga; Rocha, Lester; HOLIEN, Håkon & Gauslaa, Yngvar. (2011). Establishment success of lichen diaspores in young and old boreal rainforests: a comparison between *Lobaria pulmonaria* and *L. scrobiculata*. *The Lichenologist*, 43(3), 241-255.
- Huang, Shu-Wen; Hopia, Anu; Schwarz, Karin; Frankel, Edwin N & German, J Bruce. (1996). Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 444-452.
- Iserin, P.; Masson, M.; Restellini, J. P.; Ybert, E.; De Laage de Meux, A.; Moulard, F., . . . Botrel, A. (2001). *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins* (Larousse Ed.): Larousse, 10-12p.
- Keating, GJ & O'kenedy, R. (1997). *The chemistry and occurrence of coumarins. Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 348.
- Koechlin-Ramonatxo, Christelle. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Koné, Donatien. (2009). *Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes : extraction, identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante*. Retrieved from <http://www.theses.fr/2009METZ014S/document> Available from <http://www.theses.fr/2009METZ014S>: 175p.
- Ksouri, Riadh; Megdiche, Wided; Debez, Ahmed; Falleh, Hanen; Grignon, Claude & Abdelly, Chedly. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3-4), 244-249.
- Lacolley, Patrick; Babuty, Dominique; Boulanger, Chantal; Ghaleh, Bijan; Loirand, Gervaise; Pinet, Florence & Samuel, Janelise. (2008). *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux* (1 ed.): JOHN LIBBEY EUROTTEXT, 664p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Lehucher-Michel, MP; Lesgards, JF; Delubac, O; Stocker, P; Durand, P & Prost, M. (2001). Oxidative stress and human disease. Current knowledge and perspectives for prevention. *Presse medicale (Paris, France: 1983)*, 30(21), 1076-1081.
- Leverve, X.; Cosnes, J.; Erny, P. & Hasselmann, M. (2001). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte* (2nd ed.): Springer Paris, 931p.
- Lindau-Shepard, Barbara A & Shaffer, Jacquelin B. (1993). Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(6), 581-588.
- Mabry, T.; Markham, K.R. & Thomas, M.B. (2012). *The Systematic Identification of Flavonoids*: Springer Berlin Heidelberg, 354p.
- MacKenzie, Tyler D; MacDonald, Tara M; Dubois, Luc A & Campbell, Douglas A. (2001). Seasonal changes in temperature and light drive acclimation of photosynthetic physiology and macromolecular content in *Lobaria pulmonaria*. *Planta*, 214(1), 57-66.
- Mahmoudi, Souhila; Khali, Mustapha & Mahmoudi, Nacéra. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*(9), 35.
- Martin, S & Andriantsitohaina, R. (2002). *Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium*. Paper presented at the Annales de Cardiologie et d'Angéiologie.
- Marusawa, Hiroshi; Ichikawa, Kazuhiko; Narita, Nozomu; Murakami, Hiromu; Ito, Keiichi & Tezuka, Takahiro. (2002). Hydroxyl radical as a strong electrophilic species. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 10(7), 2283-2290.
- Médart, J. (2009). *Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative*: De Boeck Supérieur, 314p.
- Menvielle-Bourg, F Joanny. (2005). La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*, 3(3), 118-121.
- Middleton, Elliott; Kandaswami, Chithan & Theoharides, Theoharis C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- Molyneux, Philip. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
- Nicole, Maurice. (1997). De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed: *Lavoisier, Paris*, 12-14.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- Nijveldt, Robert J; Van Nood, ELS; Van Hoorn, Danny Ec; Boelens, Petra G; Van Norren, Klaske & Van Leeuwen, Paul AM. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications-. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nohl, H. (1994). *Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration*. Paper presented at the Annales de biologie clinique.
- Ohia, Sunny E; Opere, Catherine A & LeDay, Angela M. (2005). Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1), 22-36.
- OMS. (2002). Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Genève. 78p.
- Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, 1995(276), 87-92.
- Pietta, Pier-Giorgio. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- Poortmans, Jacques & Boisseau, Nathalie. (2017). *Biochimie des activités physiques et sportives*: De Boeck Supérieur, 674p.
- Rezaire, Aïra. (2012). *Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa)*. Antilles-Guyane. p.
- Robards, Kevin; Prenzler, Paul D; Tucker, Greg; Swatsitang, Prasan & Glover, William. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.
- Robert, J. (2011). *Signalisation cellulaire et cancer: un manuel pour les étudiants et les oncologues*: Springer-Verlag Paris, 335p.
- Roux, Claude. (2014). *Catalogue des lichens et champignons lichénicoles de France métropolitaine* (Fougères (Ille-et-Vilaine) ed.): Association française de lichénologie; Henry des Abbayes, 1525p.
- Scheibmeir, Heath D; Christensen, Katie; Whitaker, Sally H; Jegaethesan, Jay; Clancy, Richard & Pierce, Janet D. (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21(1), 24-28.
- Signoret, J. (2001). *Le lichen pulmonaire en Lorraine et des régions voisines*. Université de Metz. France. 16p.

- Slinkard, Karen & Singleton, Vernon L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Tawaha, Khaled; Alali, Feras Q; Gharaibeh, Mohammad; Mohammad, Mohammad & El-Elimat, Tamam. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- Turkmen, Nihal; Velioglu, Y Sedat; Sari, Ferda & Polat, Gokce. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12(3), 484-496.
- Valko, Marian; Rhodes, CJB; Moncol, Jan; Izakovic, MM & Mazur, Milan. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.
- Vitoux, D; Chappuis, P; Arnaud, J; Bost, M; Accominotti, M & Roussel, AM. (1996). *Sélénium, glutathion peroxydase, peroxydes et fonctions plaquettaires*. Paper presented at the Annales de Biologie Clinique.
- Vuorela, S. (2005). Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics (dissertation). EKT series 1343. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology. *Food Chemistry. Helsinki*, 75.
- Werth, Silke; Wagner, Helene H; Holderegger, Rolf; Kalwij, Jesse M & Scheidegger, Christoph. (2006). Effect of disturbances on the genetic diversity of an old-forest associated lichen. *Molecular Ecology*, 15(4), 911-921.
- Wolseley, Pat & James, Peter. (2000). Factors affecting changes in species of *Lobaria* in sites across Britain 1986–1998. *Forest Snow and Landscape Research*, 75, 319-338.
- Yao, Liu H; Jiang, YM; Shi, J; Tomas-Barberan, FA; Datta, Nivedita; Singanusong, R & Chen, SS. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*, 59(3), 113-122.
- Zeybek, U & Yildiz, A. (2000). Studies on the Northeast Anatolian lichens *Lobaria scrobiculata* and *L. pulmonaria*. *SCIENTIA PHARMACEUTICA*, 68(3), 317-322.