

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

**Etude de l'activité antioxydante des fractions de solvant
à polarité différente d'un Lichen à usage culinaire**

Présenté par : Melle KADIRI Ikbal
Melle HELAILI Khaoula

Devant le jury :

Président :	M. BOUKEROUIS Djoudi	MAA
Rapporteur :	Dr. SIFI Ibrahim	MCB
Examinatrice :	Mlle. ZAKHROUF Zohra	MAA

Soutenu publiquement le : 02/07/2019

Remerciements

En tout premier lieu, Nous remercions le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir données la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Nous tenons à remercier sincèrement notre encadreur **Dr. SIFI Ibrahim** pour sa disponibilité, son aide, ses conseils et ses orientations. Nous la remercions vivement pour le choix du sujet qui est original et intéressant.

Nos remerciements vont aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à notre travail. Nous remercions particulièrement **M. BOUKAROUIS Djoudi** pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de notre mémoire. Nous remercions également **Melle ZAKHROUF Zohra** pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions également les membres du laboratoire de Biologie pour l'aide qu'ils nous ont apporté en mettant à notre disposition les moyens de leur laboratoire ; ce qui nous a permis de réaliser la partie pratique de notre travail dans de bonnes conditions.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACES

Au nom du dieu le clément et le miséricordieux louange à ALLAH le
tout puissant

Je dédie ce modeste travail :

À la personne la plus précieuse à mes yeux, à **ma très chère mère** mon
exemple éternel, mon soutien moral. Qui m'as ouvert les yeux sur le
monde et me donnes confiance en moi pour chaque étape de ma vie.
Que dieu la protège.

À l'homme de ma vie, à ma force **Mon cher père** qui m'a aidé à devenir
ce que je suis aujourd'hui, que *dieu* le *garde* et le *protège*.

À mon Cher frère **OUSSAMA**, pour sa soutenance et son aide pratique
depuis mes études les plus premières.

À mes sœurs adorées **IMANE** et **ASMA** pour leurs encouragements et
leur soutien moral.

À mes nièces, mes princesses que j'aime énormément **RYM** et **TASNIM**.

À ma tante bien-aimée, **RYM** Je ne te remercierai jamais assez pour tout
ce que tu fais pour moi, que dieu te protège.

À toute la famille **KADIRI** et **HASSANI**.

À Ma très chère binôme « **H. Khaoula** » et à toute sa famille.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient
toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin
d'études.

À tous ceux que j'aime.

IKBAL



Avant toute, Je remercie d'abord « Dieu » , le Tout-puissant, qui m'a donné la force, la patience et le courage pour suivre mes études.

*J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail aux deux chandelles qui éclairent ma vie : à mes très chers parents, ma mère **Hafida** et mon père **Badredinne***

*A mes chères sœurs : Soumia, Je te remercie pour ton soutien continu. **Yousra** et Et le dernier cluster **Manal** Sans oublier les enfants de ma sœur **Raid** et **Alaa***

*Spéciale dédicace à mon mari « **Abdelkader** » : Merci pour ton soutien, tes encouragements, tes conseils, ta patience et ta confiance envers moi. Merci pour ta gentillesse et ton sens du sacrifice*

Sans oublier aussi à ma deuxième famille " Zaza"

A tous les membres de ma famille, petits et grands.

*Enfin à mes chères amies et Ma chère binôme « **ikbal** » et à toute sa famille*

A moi-même.

Khaoula

ملخص

تهدف الدراسة الحالية الى تقييم نشاط مضادات الأكسدة للعديد من أجزاء مستخلص الأسيتون من الأشنة (*Lobaria pulmonaria*) بواسطة ست مذيبيات عضوية (الكلوروفورم ، أسيتات الإيثيل ، الهكسان ، الماء 35% ماء/ميثانول و بوتانول). قتنا باختبار هذه الاجزاء بالفعالية المضادة للأكسدة من خلال ثلاث تقنيات ، دراسة النشاطية المضادة للأكسدة بطريقة محاصرة الجذور الحرة DPPH واختبار ABTS و FRAP. كمية البوليفينول كانت 209.04 مغ/مغ مكافئ لحمض الغاليك والفلافونويد 48.58 مغ/مغ مكافئ للكربستين. تكشف الاختبارات الكيميائية النباتية عن وجود عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية مثل الفلافونويد والجلوكوزيدات القلبية والفينولات. إن نتائج تقييم نشاط مضادات الأكسدة من خلال اختبارات DPPH و ABTS و FRAP الثلاثة التي عبر عنها EC₅₀ أظهرت ان مستخلص الأسيتون له نشاط مضاد للأكسدة عالي و خاصة بالنسبة للأجزاء ماء 35 % ميثانول و البيوتانول واسيتات الاثيل.

الكلمات المفتاحية: *Lobaria pulmonaria* ، النشاط المضاد للأكسدة (DPPH, ABTS, FRAP) ، الفينول، الفلافونويد

Résumé

Cette étude porte sur l'évaluation de l'activité antioxydante des différentes fractions de l'extrait acétonique d'un lichen (*Lobaria pulmonaria*) par six solvants, chloroforme, acétate d'éthyle, hexane, eau, eau 35% MeOH et le n-butanol. L'activité antioxydante des extraits est évaluée par trois techniques, la réduction du fer (*Ferric reducing antioxidant power* ou FRAP), le piégeage du radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et réduction du radical-cation ABTS. Le taux des polyphénols totaux (fraction acétate d'éthyle : 209,04 mg EAG/g extrait sec) et les flavonoïdes (fraction chloroforme : 48,51 mg QR/g extrait sec). Les tests phytochimiques révèlent la présence de différentes familles de composés chimiques comme les tanins, les flavonoïdes, Glucosides cardiotoniques et les phénols. L'évaluation de l'activité antioxydante par les trois tests DPPH, ABTS et FRAP des fractions exprimée par l'EC₅₀ montre une activité plus importante pour la fraction acétate d'éthyle, eau 35% MeOH et la fraction butanol.

Mots clés : *Lobaria pulmonaria*, Antioxydant (Test DPPH, Test ABTS, Test FRAP), Polyphénols, Flavonoïde.

Abstract

This study focuses on the evaluation of the antioxidant activity of the different fractions of the acetonic extract of a lichen (*Lobaria pulmonaria*) by six solvents, chloroform, ethyl acetate, hexane, water, water 35% MeOH and n-butanol. The antioxidant activity of the extracts was evaluated by three methods, the reduction of iron (*ferric reducing antioxidant power* or FRAP), ABTS radical scavenging assay and trapping of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The amount of total polyphenols (ethyl acetate fraction 209.04 mg EAG/g dry extract) and flavonoids (chloroform fraction: 48.51 mg QR/g dry extract). Phytochemical tests revealed the presence of different families of chemical compounds such as tannins, flavonoids, Cardiotonic glucosides and phenols. The evaluation of the antioxidant activity by the DPPH, ABTS and FRAP assays of the fractions expressed by EC₅₀ showed higher activity for the ethyl acetate fraction, water 35% MeOH and the butanol fraction.

Keywords: Antioxidant, polyphenols, flavonoid, DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay, *Lobaria pulmonaria*.

SOMMAIRE

ملخص.....	i
Résumé.....	i
Abstract	i
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
Introduction	1

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La plante étudiée	4
1.1. Les lichens.....	4
1.2. Morphologie des lichens.....	4
1.3. L'intérêt des lichens.....	6
1.4. L'espèce <i>Lobaria pulmonaria</i>	7
2. Le stress oxydant	9
2.1. Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire.....	10
2.2. Les cibles des radicaux libres.....	12
2.3. Les systèmes antioxydants.....	14
3. Les composés phénoliques	18
3.1. Les formes les plus simples.....	19
3.2. Les formes condensées.....	22
3.3. Activités biologiques des flavonoïdes.....	24

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL et MÉTHODES

1. Objectif	27
2. Matériel utilisé	27
2.1. Matériel et produits chimiques.....	27
2.2. Matériel végétal.....	28
3. Méthode d'extraction des composés phénolique	28
3.1. Préparation des extraits d'acétone.....	28
3.2. Fractionnement de l'extrait d'acétone.....	28
3.3. Calcule de rendement d'extraction.....	30
4. Tests phytochimique	30
4.1. Les tanins.....	30
4.2. Les flavonoïdes.....	30

4.3.	Les glucosides cardiotoniques :	30
4.4.	Les composés réducteurs.....	31
4.5.	Les phénols	31
4.6.	Les résines	31
4.7.	Les glycosides	31
4.8.	Les acides aminés	31
4.9.	Les stéroïdes	31
5.	Dosages des métabolites secondaires	32
5.1.	Dosage des polyphénols totaux.....	32
5.2.	Dosage des flavonoïdes.....	32
5.3.	Dosage des anthocyanes	33
5.4.	Dosage de chlorophylles totales et caroténoïdes.....	34
6.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	34
6.1.	Méthode de piégeage de radical libre DPPH*	34
6.2.	Méthode de piégeage de radical ABTS*+	35
6.3.	Méthode de FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	36
7.	Etude statistique	37

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS et DISCUSSION

1.	Résultats du rendement d'extraction	39
2.	Résultats des tests phytochimique.....	39
3.	Résultats de dosage des métabolites secondaires.....	41
3.1.	Résultats du dosage des composés phénoliques.....	41
3.2.	Résultat du dosage des flavonoïdes	42
3.3.	Résultats de dosage des anthocyanes,.....	44
3.4.	Résultats de chlorophylles et caroténoïdes	44
4.	Résultats de l'activité antioxydante	45
4.1.	Résultats de l'activité antioxydante par Test DPPH.....	45
4.2.	Résultats de l'activité antioxydante par Test ABTS.....	47
4.3.	Résultats du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)	49
5.	Résultats de test de corrélation	50
6.	Discussion	52
	Conclusion	55
	Références bibliographiques	56

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS⁺	2, 2' - Azino bis-(3-éthylbenzothiazoline- 6- sulfonique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gallique
AGPI	Les acides gras polyinsaturés
AH	Un antioxydant donneur d'hydrogène
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium
ARN	Acide ribonucléique
AO	Les agents oxydants
CAT	La catalase
CP	Composés phénoliques
DPPH	Le radical stable (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
EAG	Equivalent d'acide gallique
EC₅₀	Concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libres
ERO	Les espèces réactives de l'oxygène
EOA	Espèces oxygénées active
Fe³⁺	Ion ferrique
Fe²⁺	Ion ferreux
FeCl₃	chlorure de fer
FL	Flavonoïdes
GSH	Le glutathion
HCl	Chlorure d'hydrogène
H₂O₂	Le peroxyde d'hydrogène
MeOH	Méthanol
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
O₂⁻	Radical anion superoxyde
OH[•]	Radical hydroxyl
ONOO[•]	Radical perxynitrite
¹O₂	L'oxygène singulet
PAF	Platelet Activating Factor
QR	Quercétine
R[•]	Radical libre oxydant
RL	Radical libre
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives oxygénées
ROO[•]	Radicaux libres peroxylés

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Coupe verticale à travers le corps d'un lichen.....	4
Figure 2 : Les trois grands types de thalles	5
Figure 3 : Production de radicaux libres lors de la phagocytose d'une bactérie	10
Figure 4 : Rôle des radicaux libres dans la communication cellulaire.....	11
Figure 5 : Peroxydation lipidique induite par le radical OH•	13
Figure 6 : Système de défense antioxydant.....	14
Figure 7 : (a) Structure de base des acides phénoliques (b) l'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels.....	19
Figure 8 : Les principaux dérivés de l'acide hydroxy-cinnamique	20
Figure 9 : Structure générale des flavonoïdes	20
Figure 10 : Structure de penta-galloylglucose (tannin hydrosoluble)	23
Figure 11 : La structure d'un tannin condensé.....	23
Figure 12 : Photos de l'espèce <i>Lobaria pulmonaria</i> séché	28
Figure 13 : Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction par l'acétone.....	29
Figure 14 : Les étapes de fractionnement de l'extrait d'acétone.....	29
Figure 15 : Réduction du radical libre DPPH• (Molyneux, 2004).....	35
Figure 16 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique	41
Figure 17 : La courbe d'étalonnage de la quercétine	43
Figure 18 : Courbes représentes le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des fractions de <i>Lobaria pulmonaria</i> avec les standards	46
Figure 19 : Courbes représentes le pourcentage d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations des fractions de <i>Lobaria pulmonaria</i> avec les standards	48
Figure 20 : Courbes représentes pouvoir réducteur des fractions et de Trolox, en (mg/ml) par Test FRAP	49
Figure 21 : Graphe de corrélation entre les composés phénoliques et les flavonoïdes	50
Figure 22 : Graphe de corrélation entre les composés phénoliques et le pouvoir antioxydant (DPPH)	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principaux radicaux libres	9
Tableau 2 : Les types de protection antioxydant de l'organisme (les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants)	15
Tableau 3 : Principaux modes d'action de quelques antioxydants.....	15
Tableau 4 : Les principes classes de composés phénoliques	18
Tableau 5 : Les différentes classes des flavonoïdes d'après.....	21
Tableau 6 : Les appareils et produits chimiques utilisés	27
Tableau 7 : Rendement, aspect et couleur des fractions obtenus.....	39
Tableau 8 : Résultats des tests phytochimiques.....	40
Tableau 9 : La teneur en polyphénols totaux (mg AG/g) de différentes fractions.....	41
Tableau 10 : La teneur en flavonoïdes en (mg QR/g) de différentes fractions	42
Tableau 11 : Résultat de dosage des anthocyanes.....	44
Tableau 12 : Résultat de dosage de chlorophylles totales et caroténoïdes.....	44
Tableau 13 : Les valeurs d'EC ₅₀ du test DPPH des six fractions et de trois standards.....	45
Tableau 14 : Les valeurs d'EC ₅₀ du test ABTS des six fractions et de trois standards.....	47
Tableau 15 : Les valeurs d'EC ₅₀ du test ABTS des six fractions.....	49
Tableau 16 : Test de corrélation entre l'activité antioxydante et le taux des composés phénoliques (CP, FL).....	50

INTRODUCTION

Introduction

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales ou des préparations à base des plantes connaît un succès croissant. Ainsi, d'après les estimations, 80% de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle **(OMS, 2002)**.

Les plantes médicinales renferment de nombreux actifs (plus de 250) qui ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques. Ces actifs ont été étudiés et reproduits chimiquement pour être incorporés de nos jours dans de nombreux médicaments.

L'étude de l'activité antioxydante des plantes est aujourd'hui devenue importante, car on peut retrouver dans les végétaux de puissants antioxydants. Actuellement, la société scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Le stress oxydant est lié à de nombreuses pathologies, par exemple l'athérosclérose, les cancers, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et rhumatismales. Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides. C'est pour cela que la recherche sur les antioxydants dans les plantes s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de permettre de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies **(Benhammou, 2011; Guillouty, 2016)**.

D'autre part, l'alimentation joue un rôle très important dans l'apport en antioxydants exogènes qui vont venir soutenir l'effet des antioxydants endogènes. En effet, les antioxydants sont principalement apportés par les végétaux, on y retrouve notamment les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, lignanes, stilbènes), les vitamines (vitamine E, vitamine C et vitamine A) ainsi que les oligoéléments (cuivre, manganèse, sélénium et zinc) **(Guillouty, 2016)**.

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)**. La population locale de la région de Laghouat a utilisé l'espèce *Lobaria pulmonaria* dans la préparation des plats culinaires traditionnels (la préparation de couscous).

L'espèce *Lobaria pulmonaria* provenant de l'Europe a été étudiée par plusieurs chercheurs (Nishitoba *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1995; Honda & Vilegas, 1999; Odabasoglu *et al.*, 2004; Karakus *et al.*, 2009; Atalay *et al.*, 2015).

Cette espèce pousse en abondance dans la région d'Atlas tellien de l'Algérie et les travaux sur cette espèce par les chercheurs Algériens ont focalisés sur l'identification taxonomique seulement. Concernant l'activité biologiques quelque soient antioxydante, antimicrobienne...etc, nous n'avons pas trouvé des travaux mené par nos chercheurs sur cette espèce.

C'est dans ce contexte d'étude que s'inscrit ce présent travail, dont l'objectif principal étant d'évaluer l'activité antioxydante de différentes fractions de l'extrait acétonique de l'espèce de lichens *Lobaria pulmonaria*.

Au préalable nous avons procédé à la détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. En second temps, nous avons évalué l'activité antioxydante en moyen de trois méthodes, à savoir :

- Le test DPPH
- Le test ABTS
- Le test FRAP

Ce manuscrit alors, est subdivisé en trois parties essentielles. La première a été consacrée à une synthèse bibliographique portée principalement sur les lichens, les activités antioxydantes et composés phénoliques. Alors que, la deuxième a été réservée pour l'explication des protocoles expérimentaux adaptés en réponse aux objectifs de cette étude qui est basée sur :

- L'extraction des composés phénoliques de la plante.
- Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes.
- Evaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH, ABTS et FRAP.

En dernier rang, nous avons exposé les différents résultats obtenus accompagnés de leurs discussions.

CHAPITRE 1 :

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. La plate étudiée

1.1. Les lichens

Un lichen est un organisme composite résultant de l'association entre deux êtres vivants : un champignon et une algue unicellulaire ou un champignon et une cyanobactérie.

Le champignon est responsable de la morphologie des lichens, c'est-à-dire de la forme du corps du lichen. Le corps est appelé **thalle**. Le thalle est formé par un réseau de filaments nommés **hyphes** (ils sont comparables au mycélium des champignons). C'est au milieu d'un enchevêtrement de ces filaments que se trouvent les algues.

Au niveau de la partie inférieure du thalle, on observe un nouvel entrelacement de filaments servant à fixer le lichen à un support, ce sont les **rhizines** (Bauwens, 2004).

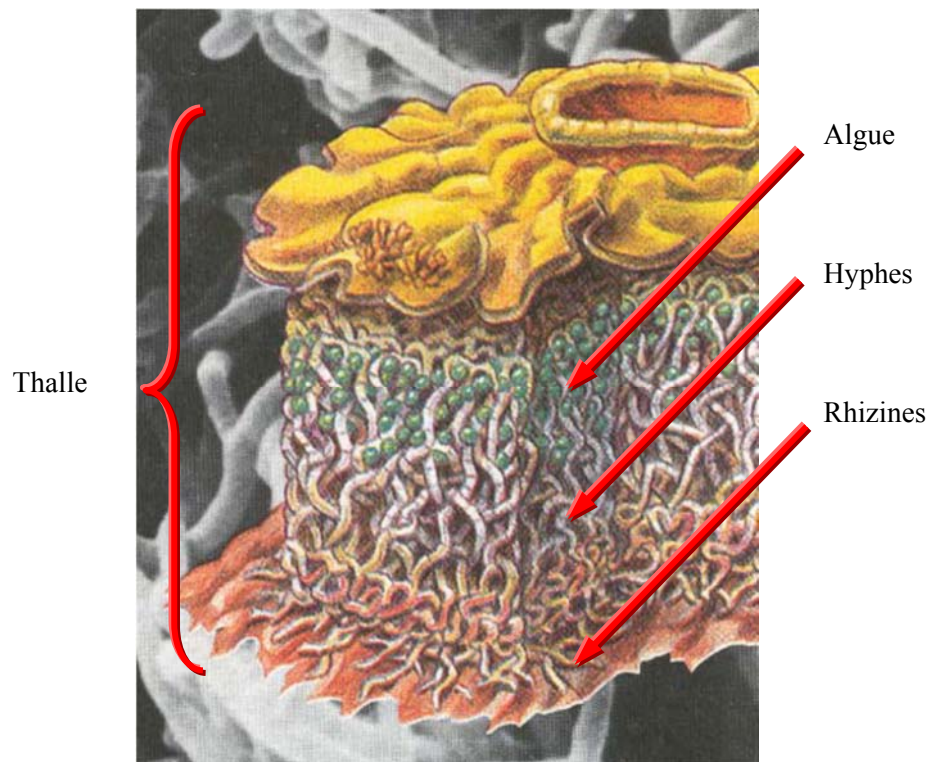


Figure 1: Coupe verticale à travers le corps d'un lichen (Bauwens, 2004)

1.2. Morphologie des lichens

A la différence des plantes supérieures, les lichens ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille mais un appareil végétatif rudimentaire : le thalle (Parrot, 2014).

1.2.1. Différents types de thalles

Le mycobionte (champignon) joue le rôle le plus déterminant dans la morphologie et la structure du lichen. Le thalle porte les éléments nécessaires à la reproduction et est caractérisé par une grande diversité de formes et de couleurs parmi ces thalles :

- ✓ Les **thalles fruticuleux** : sont des thalles en lanières ou tiges plus ou moins ramifiées, dressés ou Vain.
- ✓ Les **thalles foliacés** : se présentent sous forme de lames ou de feuilles, plus ou moins lobées ou découpées, se détachant facilement du substrat.
- ✓ Les **thalles crustacés** : sont les plus communs (90 %). Sous forme de croûte, ils adhèrent au substrat dans lequel ils peuvent pénétrer plus ou moins profondément.



Thalle fruticuleux



Thalle foliacé



Thalle crustacé

Figure 2 : Les trois grands types de thalles (Bauwens, 2004)

1.2.2. Structures anatomiques

Contrairement à leur morphologie qui peut être variée, la structure des lichens est relativement homogène et assure leur unité. On en distingue tout de même deux types (Parrot, 2014):

- **Structure de type homéomère** : champignons et algues ou cyanobactéries sont entremêlés de façon homogène.
- **Structure de type hétéromère** : on observe une disposition par couches. La structure est donc stratifiée et on observe de la face supérieure à la face inférieure :
 - ✓ Un cortex supérieur formé par des cellules jointives de champignons.
 - ✓ Une couche algale, mélange d'algues et de champignons lichéniques telles que pour *Cladonia rangiferina*.

1.3. L'intérêt des lichens

Les lichens ont été utilisés depuis l'antiquité comme plantes médicinales et pour de multiples autres usages alimentaires ou artisanaux (Bauwens, 2004). Voici quelques usages :

1.3.1. Usages alimentaires

Certains lichens constituent un fourrage pour des animaux comme par exemple, les rennes de Laponie. D'autres peuvent également être source de glucose et dans certaines régions ils sont consommés comme aliment pour l'homme (Japon, Canada).

1.3.2. Usages médicaux

Aujourd'hui, le principal intérêt des lichens en médecine est leur potentiel antibiotique. Ils sont également utilisés en homéopathie pour la fabrication de sirops et de pastilles.

1.3.3. Usages industriels

Les huiles essentielles de certaines espèces de lichens sont utilisées pour la fabrication de parfums et de savons. Les lichens sont également connus pour la fabrication artisanale de teintures. Enfin, d'autres utilisations telles que la décoration des tables, la confection des maquettes (où ils représentent des arbres) et celle de couronnes funéraires sont courantes dans certains pays.

1.4. 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.

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. 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 (*Dictyochloropsis reticulata*) qui produit les glucides nécessaires à l'organisme et une cyanobactérie (*Nostoc*) qui permet le captage d'azote atmosphérique nécessaire à la croissance (Marsy, 2015).

1.4.1. Description botanique

Lobaria pulmonaria est un lichen foliacé généralement de grande taille (jusqu'à 50cm de diamètre pour les plus grands, plus classiquement autour de 30cm). La couleur est vert-brunâtre à vert-grisâtre à l'état sec et devient vert-olive vif à l'état humide. Cette couleur verte est due au photobionte présent dans le thalle. Le thalle en forme de feuille est profondément lobé. La division des lobes est presque dichotomique. Ceux-ci mesurent de 1 à 3cm de larges et sont tronqués à l'extrémité. La face supérieure du thalle est fortement réticulée ce réseau délimite des alvéoles (fovéales) qui lui ont valu son nom de *pulmonaire*, par comparaison avec la forme des alvéoles des poumons. Cette ressemblance est d'ailleurs à l'origine de ses supposées propriétés médicinales (Pascal & Yorick, 2015).

1.4.2. Classification

- Règne : *Fungi*
- Phylum : *Ascomycotina*
- Classe : *Ascomycètes*
- Ordre : *Lecanorales*
- Sous-ordre : *Peltigerinae*

- Famille : *Lobariaceae*
- Genre : *Lobaria*
- Espèce : *pulmonaria*
- Nom en arabe : شبيبة الشيخ ، الشبيبة

1.4.3. Habitats

Il s'agit d'une espèce essentiellement corticole, c'est-à-dire vivant accrochée sur les écorces des arbres, et plus particulièrement celle des chênes et des érables, plus occasionnellement sur celles du charme et du frêne, et rarement sur celle du hêtre et du sapin. Elle est essentiellement installée sur les troncs, à hauteur d'homme ou plus haut, jusqu'aux premières branches. Les vieux lierres grimpants sur les troncs d'arbres constituent aussi un support que le *Lobaria pulmonaria* apprécie particulièrement. Il est également saxicole dans les Vosges et souvent muscicole sur les mousses corticoles et saxicoles. Il a besoin d'une humidité atmosphérique élevée et d'une excellente qualité de l'air (il est en particulier sensible au dioxyde de soufre et disparaît complètement dès que le seuil de 30 µg/m³ est atteint). Sur le premier plateau, entre Arbois et Poligny il croît dans les chênaies charmaies calcicoles mésophiles à légèrement hygrocliclophiles. La roche affleure un peu partout avec de nombreuses zones lapiazées, mais une certaine fraîcheur reste conservée en permanence grâce à l'accumulation des argiles résiduelles de décalcification. Le peuplement optimal qui lui convient est un taillis sous futaie avec un couvert arboré varié avec les chênes, le frêne et le charme dominants, l'érable sycomore, le merisier, le tremble, l'érable champêtre et le hêtre comme essences secondaires (**Pascal & Yorick, 2015**).

1.4.4. Effets et usages médicaux

Son utilisation pour les affections pulmonaires remonte au moins à jusqu'aux années 1500 (L'Obel 1576). Il était principalement utilisé dans les affections pulmonaires (par exemple, la tuberculose, asthme, toux, cracher du sang), mais également pour les maladies du foie, comme stimulant de l'appétit, pour la diarrhée, et pour arrêter le saignement. Il était généralement bouilli avec de l'eau ou du lait ou transformé en une pommade pour usage externe. Il a également été utilisé pour les affections pulmonaires chez les animaux d'élevage en Angleterre, en Allemagne et en Suède (**Crawford, 2015**).

2. Le stress oxydant

Se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels.

Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées tels que les radicaux libres qui sont des molécules instables et fortement réactives, entraînant le stress oxydant, ions oxygénés, peroxydes, rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés dans l'orbitale la plus externe. L'équilibre est rétabli soit par oxydation (perte de cet électron libre) ou par réduction (gain d'un autre électron) (**Kumar *et al.*, 2008**).

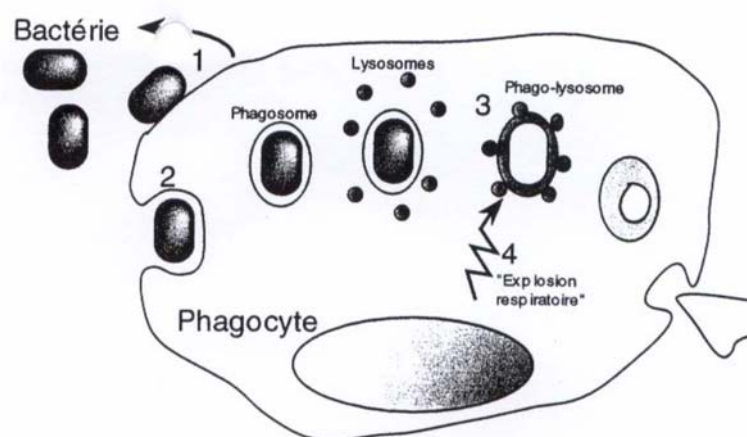
Tableau 1 : Les principaux radicaux libres

ERO	Symbole chimique	Propriétés
L'anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$	Radical formé par la réduction mono électronique de l'oxygène, peu réactif mais toxique (Lee <i>et al.</i>, 2004)
Le radical hydroxyle	OH^{\bullet}	L'espèce radicalaire la plus réactive de l'oxygène, à une demi-vie extrêmement courte d'environ 10-9 s, capable de réagir très rapidement avec la plupart des biomolécules (ADN, protéines et lipides) (Bartosz, 2003)
L'oxygène singulet	1O_2	La forme excitée de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Milane, 2004)
Le peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	C'est une molécule non radicalaire, stable, présente une toxicité importante

2.1. Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire

2.1.1. Rôle dans la phagocytose

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. Ils sont produits par les cellules phagocytaires pour être utilisés dans la lutte contre les bactéries. Après sa phagocytose par un macrophage, une bactérie se retrouve dans une vésicule appelée phagosome. Celui-ci va fusionner avec un lysosome pour donner un phago-lysosome. Alors, une succession de réactions appelées « explosion respiratoire » a lieu. Son but est de générer des oxydants bactéricides (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , NO^{\cdot}) (Pastre, 2005) (Figure 3).



Légendes : 1- chimiotactisme et adhésion, 2- ingestion, 3- fusion phagosome phago-lysosome, 4- explosion respiratoire

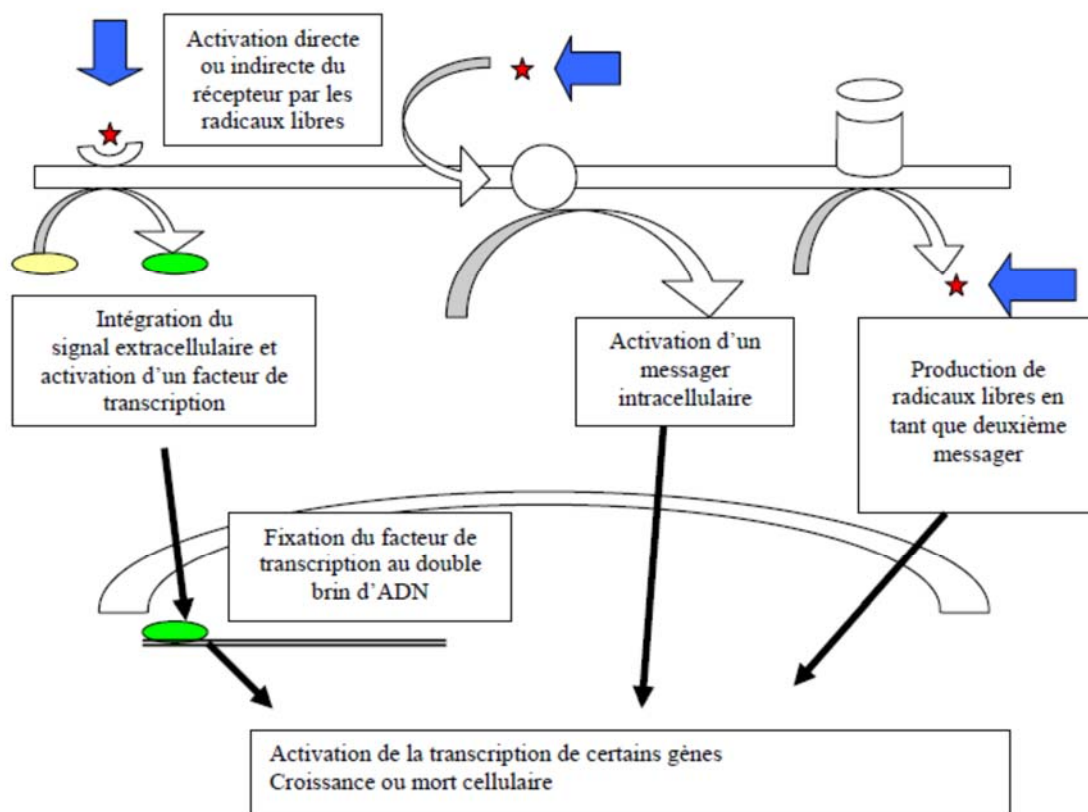
Figure 3 : Production de radicaux libres lors de la phagocytose d'une bactérie (Pastre, 2005)

2.1.2. Rôle dans la communication cellulaire

Les ROS peuvent agir en tant que « molécule-signal » et ainsi 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 (Pastre, 2005).

Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore élucidés. Les principes généraux sont présentés sur la figure 4.

- ⇒ 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.
- ⇒ Les radicaux libres extracellulaires peuvent interagir avec certains récepteurs membranaires et les activer. Ils sont ensuite à l'origine d'un signal cellulaire.
- ⇒ Les radicaux libres peuvent intervenir en tant que second messenger intracellulaire. La fixation d'un ligand extracellulaire sur son récepteur membranaire est à l'origine d'une succession de réactions conduisant à la genèse de ROS.



Légende

- ★ Radicaux libres
- ➡ Site d'action éventuel des antioxydants
- Facteur de transcription activé

Figure 4 : Rôle des radicaux libres dans la communication cellulaire (Pastre, 2005)

2.2. Les cibles des radicaux libres

Les radicaux libres sont instables et cherchent à s'apparier avec un électron d'une autre molécule. Ils sont à l'origine de réactions en chaîne qui conduisent à des destructions cellulaires. Leurs structures cibles essentielles sont l'ADN, les membranes cellulaires mais aussi toutes les molécules pouvant être déstabilisées (**Pastre, 2005**).

2.2.1. Les 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[•], 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**).

2.2.2. Les glucides

Les radicaux libres peuvent aussi agir sur le glucose et générer des intermédiaires réactifs. Les dommages oxydatifs peuvent alors se propager via l'attaque des radicaux formés sur d'autres molécules.

2.2.3. Les lipides

Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides et notamment les acides gras mono- et polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Ils sont à l'origine de réaction de peroxydation (Figure 5).

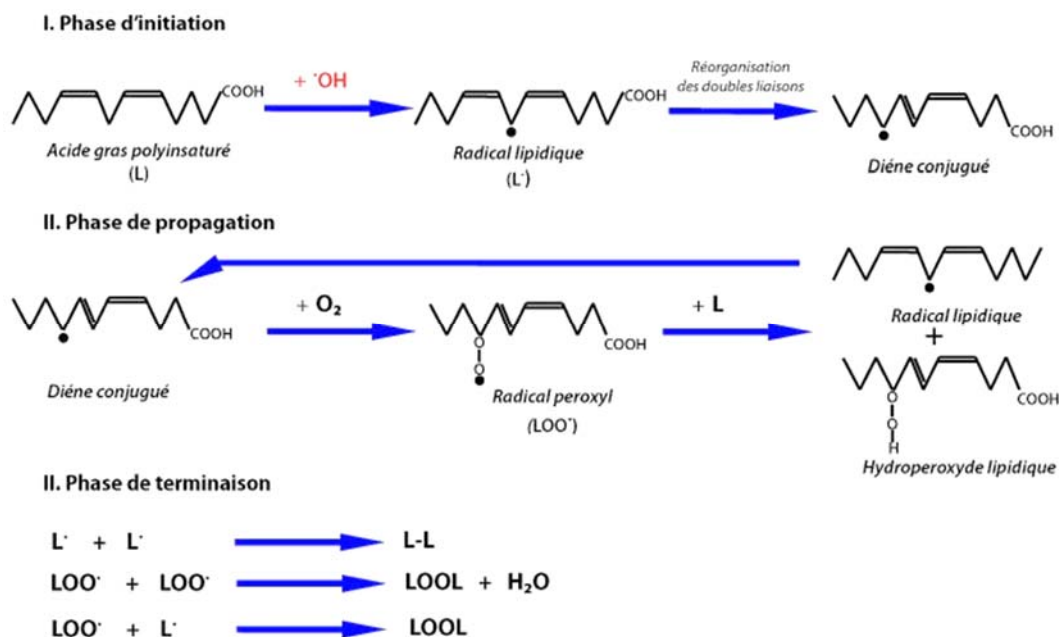


Figure 5 : Peroxydation lipidique induite par le radical OH• (Pastre, 2005)

Il s'agit d'une succession de réactions radicalaires à l'origine de la libération de molécules réactives. En l'absence d'antioxydants, la réaction s'auto-entretient car les espèces produites peuvent à nouveau réagir entre elles.

Cette réaction est à l'origine de la formation d'hydroperoxydes lipidiques. Ceux-ci s'accumulant dans la membrane, entraînent la diminution de sa fluidité et de sa perméabilité. Sa fonction étant complètement perturbée, la membrane se désorganise. Si les dégâts sont trop importants, les peroxydes peuvent conduire à la mort de la cellule.

Les peroxydes lipidiques peuvent aussi réagir avec d'autres composés cellulaires et être à l'origine de molécules très toxiques. Par exemple, ils peuvent réagir avec l'ADN et être à l'origine de substances mutagènes.

2.2.4. l'ADN

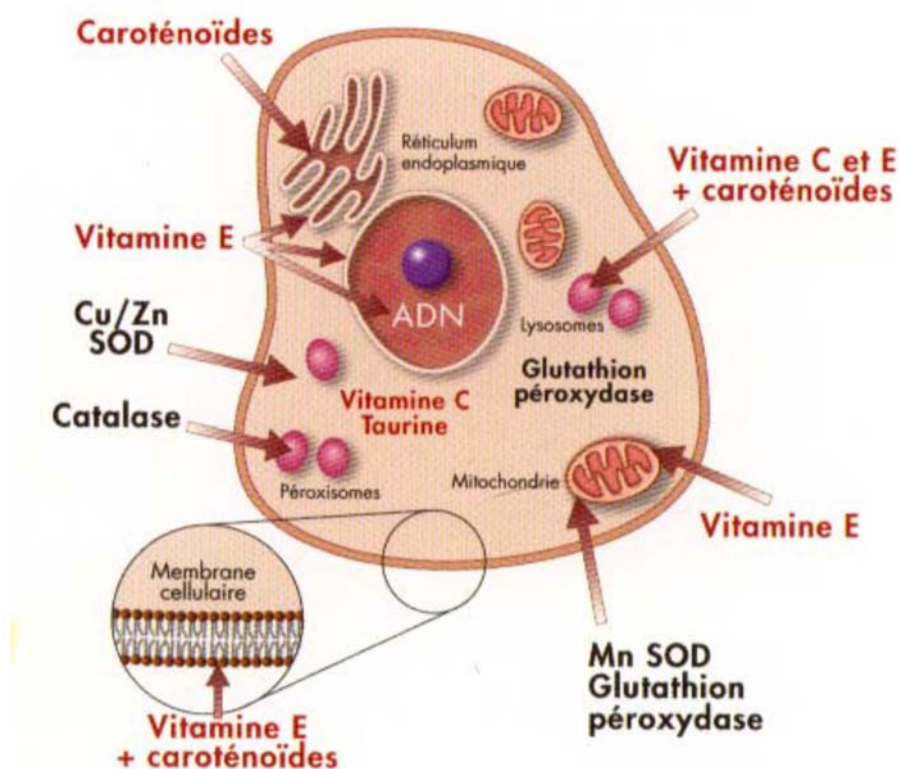
La molécule de l'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires (figure 7). Les modifications observées après l'action du radical HO• sont très nombreuses : conversion des résidus thymine en thymine glycol et 5-hydroxy méthyluracile, de la guanine en 8-hydroxy guanine, oxydation 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).

2.3. Les systèmes antioxydants

Les antioxydants sont définis par **Halliwell & Gutteridge (1995)** comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

2.3.1. Les différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement (Figure 6) (**Opara, 2002**).



Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydants (en noir)

Figure 6 : Système de défense antioxydant (Pastre, 2005)

2.3.2. Origines des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories (**Tableau 2**) avec :

- ⇒ Les enzymes antioxydants directement synthétisées par l'organisme.
- ⇒ Les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.

Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules.

Tableau 2 : Les types de protection antioxydant de l'organisme (les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants)

Système antioxydants enzymatiques endogènes	Système antioxydants non enzymatiques exogènes d'origine alimentaire
<ul style="list-style-type: none"> - Superoxyde dismutase - Glutathion peroxydase - Catalase (s) 	<ul style="list-style-type: none"> - Vitamine E (alpha tocophérol) - Vitamine C (acide ascorbique) - Caroténoïdes - Polyphénols - Minéraux et oligoéléments

2.3.3. Modes d'action des antioxydants dans l'organisme

Il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydant dont les mécanismes d'action sont différents (Tableau 3).

Tableau 3 : Principaux modes d'action de quelques antioxydants

	Molécules	Mode d'action
Défenses non enzymatiques	<i>Vitamine E</i>	<i>Piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes</i>
	<i>Vitamine C</i>	
	<i>Beta carotène</i>	
Défenses enzymatiques	<i>Superoxyse dismutase</i>	<i>Catalyse la dismutation de l'anion superoxydes en H₂O₂ et O₂</i>
	<i>Catalase</i>	<i>Catalyse la dismutation de H₂O₂ en H₂O et O₂</i>
	<i>Glutathion peroxydase</i>	<i>Action réductrice sur hydroperoxydes de R-OOH en R-OH</i>

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- ✓ *Système de défense primaire* : la catalase (CAT), le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- ✓ *Système de défense secondaire* : les tocophérols. Ces molécules sont dites *chain breaking*. Elles réagissent avec les ROO[•] et/ou les R[•], bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives (O₂^{•-}) à très réactives (OH[•]).

2.3.4. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro*

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes :

- ✓ Soit par le transfert d'atome d'hydrogène.
- ✓ Soit par le transfert d'un simple électron.

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (**Sánchez-Moreno & Larrauri, 1998**).

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habileté du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle (OH[•]), des anions superoxyde (O₂^{•-}), du peroxyde (ROO[•]) et de l'oxyde nitrique (NO[•]) (**Sánchez-Moreno, 2002**).

Parmi ces techniques, nous citons :

- ✓ La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (**Brand-Williams *et al.*, 1995**).
- ✓ La méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) (**Benzie & Strain, 1996**).
- ✓ La méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (**Cao *et al.*, 1993**).

- ✓ La méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) (**Miller *et al.*, 1993**).
- ✓ La méthode de DMPD (Balayage du radical cation N,N-diméthyle-phénylenediamine) (**Li *et al.*, 1994**).
- ✓ La méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) (**Winston *et al.*, 1998**).
- ✓ La méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) (**Wayner *et al.*, 1985**).
- ✓ La méthode photochimiluminescence (PCL) (**Lewin *et al.*, 2000**).

3. Les composés phénoliques

Ces polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux pour se défendre contre les agressions environnementales. Il s'agit des dérivés non azotés connus par une grande variété structurale dont environ 8000 composés ont été identifiés (Buchanan *et al.*, 2000).

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes, qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéine, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...).

Tableau 4 : Les principales classes de composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simple	<i>Catéchol</i>	
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	<i>p-hydroxybenzoïques</i>	Epices, Fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	<i>Acides p-coumarique</i> <i>Scopolétine, Esculétine</i>	Pomme de terre Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	<i>Juglone</i>	Noix
C6-C2-C6	Stilbène	<i>Resvératrol</i>	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes		
	– Flavonols	<i>Quercétine</i>	Fruits, Légumes
	– Anthocyanes	<i>Cyanidine</i>	Fleurs, Fruits rouges
	– Flavanols	<i>Catéchine</i>	Pomme, Raisin
	– Flavanones	<i>Naringénine</i>	Citrus
	Lignines	<i>Daidzéine</i>	Soja, Pois
(C6-C3) ₂	Tannins	<i>Pinorésinol</i>	Pin
(C6-C3) _n			Bois, Noyau de fruits
(C15) _n			Raisin rouge, Kaki

3.1. Les formes les plus simples

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proche (Macheix *et al.*, 2005).

3.1.1. Acides hydroxy-benzoïques

Les acides hydroxybenzoïques (*p*-hydroxybenzoïque, vinylique, gallique, salicylique...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1 (figure 7a). Ils sont particulièrement bien représentés chez les gymnospermes et les angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, en particulier de la lignine et de certains tannins.

Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides, à l'exemple de l'acide salicylique dont le glucoside ou les esters méthylique ou glycosylé (figure 7b).

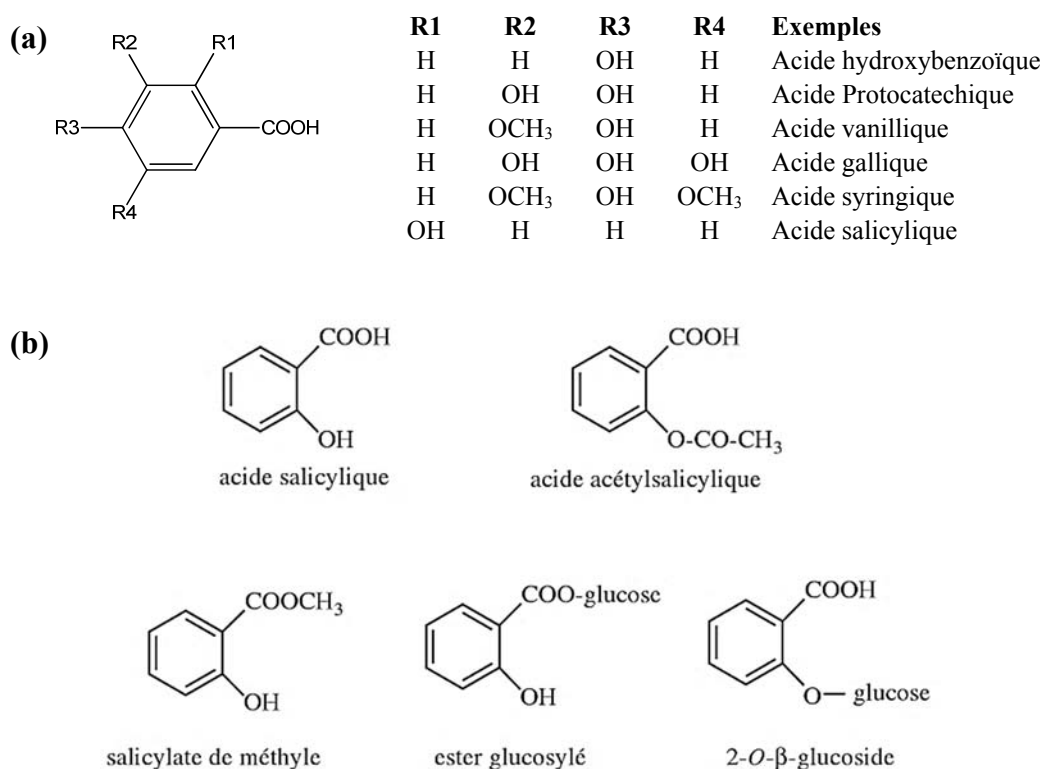


Figure 7 : (a) Structure de base des acides phénoliques (b) l'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels

3.1.2. Acides hydroxy-cinnamiques

Les acides hydroxy-cinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérivé de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides féruliques ou sinapique) sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules.

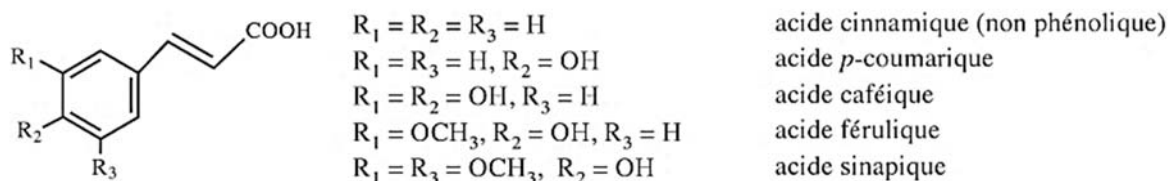


Figure 8 : Les principaux dérivés de l'acide hydroxy-cinnamique (Macheix *et al.*, 2005)

3.1.3. Les flavonoïdes

L'ensemble des flavonoïdes, de structure générale en C15 (C6-C3-C6), comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique : les anthocyanes, pigment rouge ou bleus, les flavones, les flavonols, de couleur crème ou jaune clair, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tannins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (Macheix *et al.*, 2005).

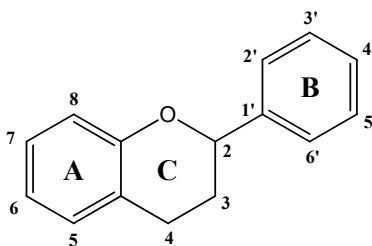
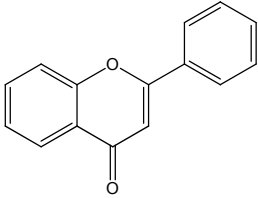
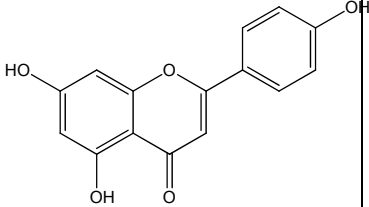
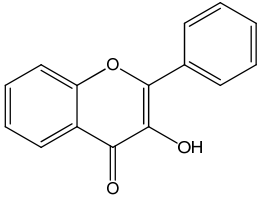
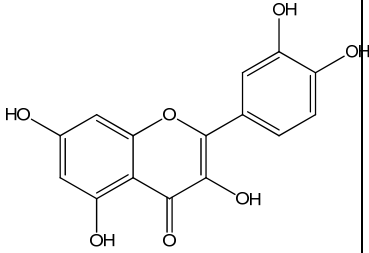
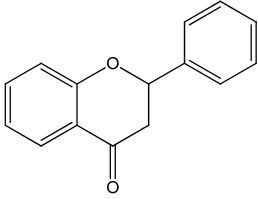
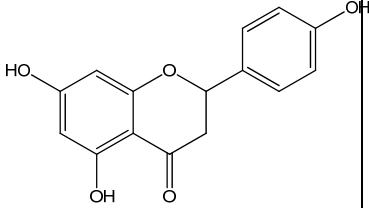
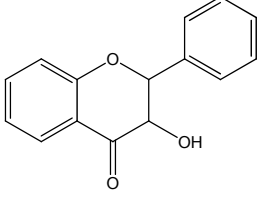
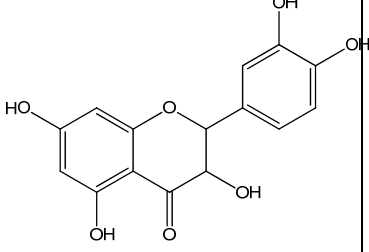
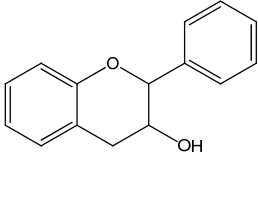
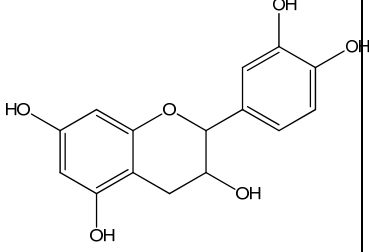
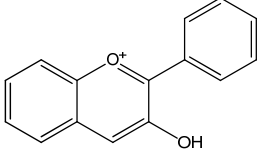
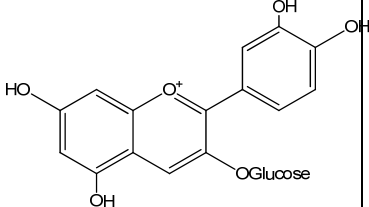


Figure 9 : Structure générale des flavonoïdes (Macheix *et al.*, 2005)

Tableau 5 : Les différentes classes des flavonoïdes d'après (Bruneton, 2009)

Structure de sous classe des flavonoïdes	Exemples
<p>Flavone</p> 	<p><i>Apigénine</i></p> 
<p>Flavonol</p> 	<p><i>Quercétine</i></p> 
<p>Flavanone</p> 	<p><i>Naringénine</i></p> 
<p>Dihydroflavonol</p> 	<p><i>Dihydroquercétine</i></p> 
<p>Flavanol</p> 	<p><i>Catéchine</i></p> 
<p>Anthocyanidine</p> 	<p><i>Cyanidine</i></p> 

3.2. Les formes condensées

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment citées, selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, on obtient des composés plus ou moins complexes pouvant encore présenter une hydro-solubilité suffisante pour être présents dans la vacuole (tannins, certains produits de brunissement) ou au contraire acquérir un caractère lipophile marqué et s'accumuler alors dans les structures pariétales (lignine, forme présentes dans la cutine et la subérine...).

3.2.1. Les tannins

Les tannins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter (protéines modèle : gélatine, albumine, hémoglobine). Les tannins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et des produits qui en sont dérivés (vin, thé, bière...), ils sont utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux. Ils sont classés en deux grands groupes de tannins : tannins hydrolysables et tannins condensés.

Les tannins hydrolysables : Sont abondants chez les dicotylédones et certains arbres, sont des sources industrielles, ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique, ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique soit un dimère de ce même acide. Une forme simple de tannins hydrolysables est le penta-galloyl-glucose (figure 10).

Les tannins condensés : Les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols dérivé de la (+)-catéchine ou de ses nombreux isomères (figure 11), contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et pour cette raison les formes dimères et oligomères sont dénommées (pro-anthocyanidines). Les tannins condensés sont très abondants dans certains organes végétaux consommés par l'homme, par exemple de nombreux fruits (pomme, prune, fraise...) ou des boissons fermentées ou non (thé, vin, cidre...).

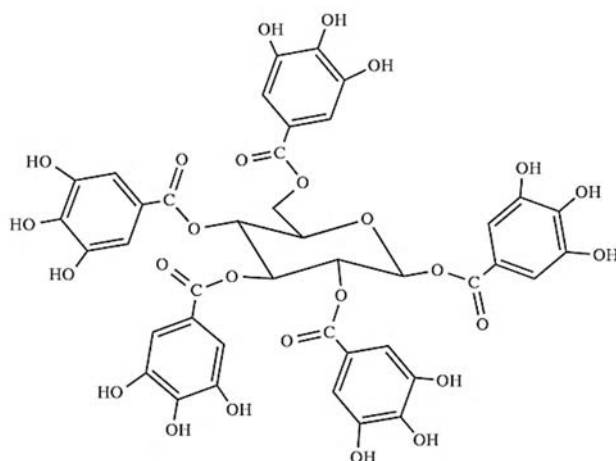


Figure 10 : Structure de penta-galloylglucose (tannin hydrosoluble) (Macheix *et al.*, 2005)

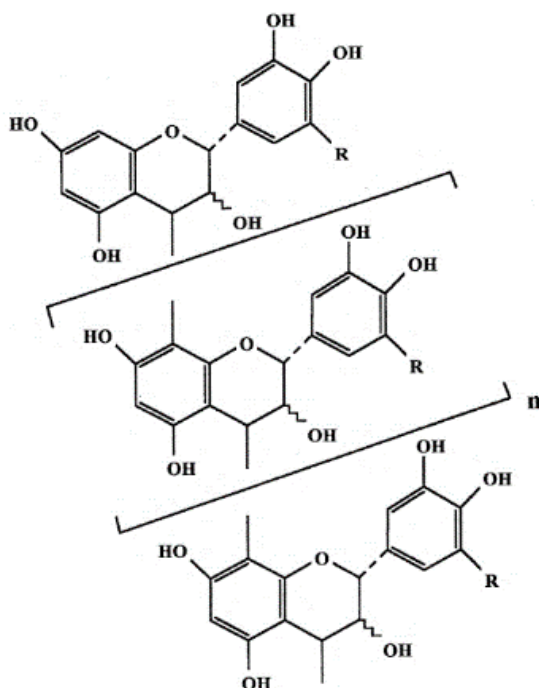


Figure 11 : La structure d'un tannin condensé (Macheix *et al.*, 2005)

3.2.2. Les lignines

Les lignines constituent une classe importante de substances naturelles du règne végétale. Il s'agit des dimères ramifiés de phénylpropaniques (C6-C3). Ces derniers sont formés par dimérisation de trois types d'alcools : alcool *p*-coumarique, alcool coniférique et alcool sinapique.

3.3. Activités biologiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical ou on leur reconnaît des activités antivirales, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antiallergiques.

3.3.1. Activité antimicrobienne

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antimicrobiennes (**Divya et al., 2014**), des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules. Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes après injection de la sophora-isoflavone par voie intra-péritonéale chez des souris infectées par *Salmonella typhimurium* (**Cushnie & Lamb, 2005**). Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5 hydroxy-isoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus sp.*, l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens (**Chen et al., 2012**).

3.3.2. Activité anti-inflammatoire

Bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) (**Benavente-García et al., 1997; Conforti et al., 2008**). De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La quercétine a un effet anti-inflammatoire en inhibant quelques enzymes de synthèse tel que la cyclooxygénase (**Gunawardena et al., 2014**).

3.3.3. Activité anti-tumorale

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse (**Galleano et al., 2012**). En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes. Les isoflavonoïdes peuvent prévenir les cancers hormonaux dépendants en agissant sur les récepteurs ER. Le soja est l'aliment le plus riche

en isoflavones avec 1-3 mg/g de poids sec, le composé majoritaire parmi ces isoflavonoïdes étant la génistéine. Il semble qu'un régime riche en génistéine inhibe la croissance des tumeurs de la prostate, en réduisant à la fois le nombre de tumeurs et la taille de ces tumeurs. Néanmoins, les métabolites de la génistéine (composés halogénés) apparaissent prépondérants dans cette activité (**Dee Boersma *et al.*, 2001**).

3.3.4. Activité antioxydants

Les flavonoïdes sont considérés comme des agents antioxydants très puissants en raison de leur structure, se rapportant en particulier à la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques, et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique.

Ces dernières années, un intérêt particulier a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes (**Chae *et al.*, 2013**), qui seraient attribuées à :

- leur capacité à piéger directement les radicaux libres.
- leur pouvoir de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives (EOR).
- leur capacité d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et d'inhiber les enzymes pro-oxydantes.

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique causée par les ERO dans la bicouche phospholipidique. Du fait de leur caractère hydrophile, les flavonoïdes peuvent interférer avec les réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi la propagation de ces réactions en chaîne.

Cette même activité antioxydante leurs permet de réguler les radicaux comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (**Mladěnka *et al.*, 2010**).

CHAPITRE 2 :

MATÉRIEL et MÉTHODES

1. Objectif

Notre travail a été réalisé dans laboratoire de biochimie au niveau de département de Biologie, Université Amar Télidji – Laghouat. Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante des fractions de solvant à polarité croissante de l'espèce *Lobaria pulmonaria* par différentes méthodes. Le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail sont décrits ci-dessous.

2. Matériel utilisé

2.1. Matériel et produits chimiques

Les appareils et les produits chimiques utilisés sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Les appareils et produits chimiques utilisé

Appareils et instruments	Caractéristiques/fabricant
Rota vapeur	<i>R220 BUCHI</i>
Spectrophotomètre UV/Visible	<i>SHIMADZU UV 1601</i>
Balance électronique de précision	<i>OHAUS 10-4g</i>
Agitateur magnétique plaque chauffante	<i>Stuart max 300°C</i>
Agitateur vortex	<i>Ficher Scientifique (40 Hertz)</i>
Micropipettes (variable)	<i>100 et 1000 µl</i>
Produits chimiques	Fabricant
Solvants organiques	
Méthanol	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Acétone	<i>Honeywell Fluka Germany</i>
Hexane	<i>Riedel-de-Haën Germany</i>
Chloroforme	<i>Riedel-de-Haën Germany</i>
Butanol	<i>Riedel-de-Haën Germany</i>
Acétate d'éthyle	<i>Honeywell Fluka Germany</i>
Composés pure	
Acide gallique monohydrate	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Quercétine	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Trolox	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Acide ascorbique (Vitamine C)	<i>Riedel-de-Haën Germany</i>
Réactifs	
DPPH	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
ABTS	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
FRAP	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>
Réactif de <i>Folin ciocalteau</i>	<i>Sigma-Aldrich Germany</i>

2.2. Matériel végétal

L'espèce *Lobaria pulmonaria* est achetée chez un herboriste qui est-elle récoltée sur des troncs d'arbres. Au laboratoire, le matériel végétal est lavé puis séché à l'abri de la lumière pendant quelques semaines (figure 12). Après séchage, la plante est broyée en poudre fine et conservée dans un sac en papier jusqu'à son utilisation.

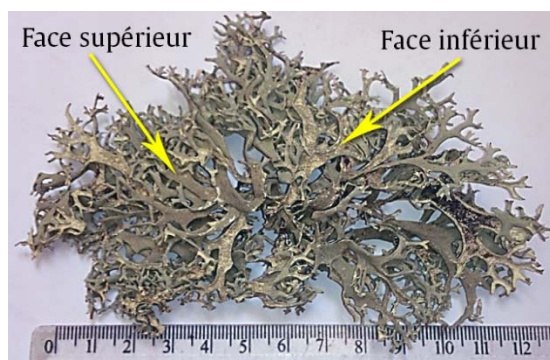


Figure 12 : Photos de l'espèce *Lobaria pulmonaria* séché (Boulerbaa & Maroufi, 2018)

3. Méthode d'extraction des composés phénolique

3.1. Préparation des extraits d'acétone

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules bioactives contenues dans la plante en utilisant l'acétone comme solvants organique qui accélère et augmente le rendement d'extraction (figure 13). Vingt gramme d'échantillon finement broyé, a été macérée par 200ml d'acétone pure pendant 24 heures à température ambiante, l'extrait est séparé par filtration à l'aide de papier filtre. L'opération a été répétée deux fois pour augmenter le rendement d'extraction.

3.2. Fractionnement de l'extrait d'acétone

L'extrait d'acétone a été fractionné par la méthode d'extraction liquide-liquide par des solvant à polarité croissante décrite par **Ondua et al. (2019)**. L'extraction liquide-liquide est basée sur le degré de solubilité des polyphénols dans les solvants organiques. Le fractionnement de l'extrait d'acétone a été mené en utilisant successivement 5 solvants organiques de polarités différentes : le chloroforme, l'hexane, l'acétate d'éthyle, le méthanol-eau 35% et le *n*-butanol. Les fractions sont conservés à froid jusqu'à utilisation. La figure 14, résume les étapes de fractionnement de l'extrait brut d'acétone.

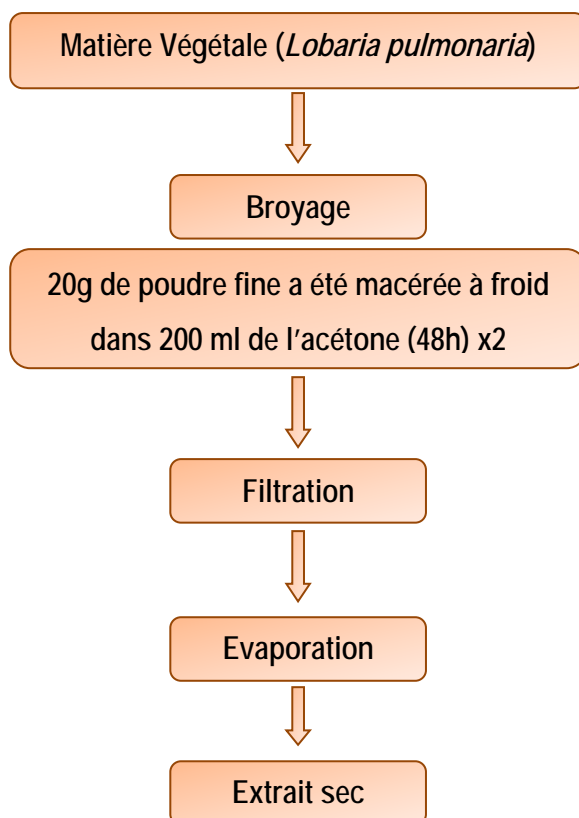


Figure 13 : Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction par l'acétone

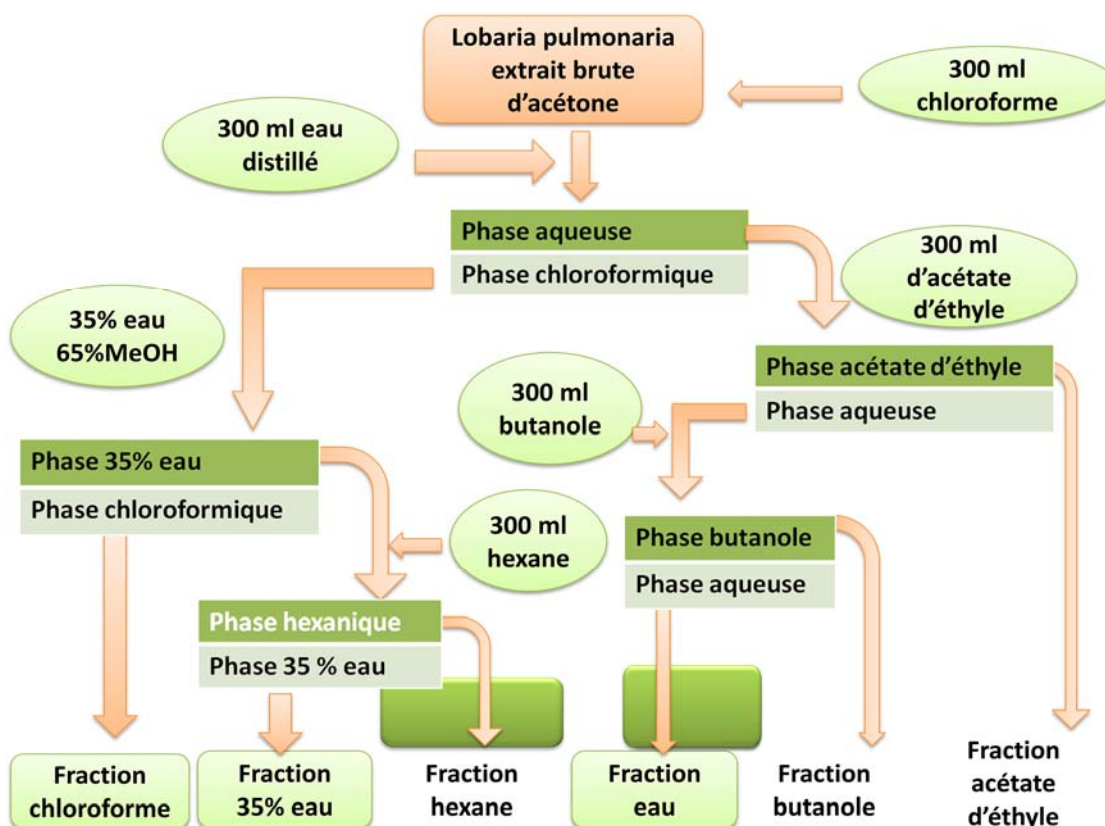


Figure 14 : Les étapes de fractionnement de l'extrait d'acétone Ondua *et al.* (2019)

3.3. Calcule de rendement d'extraction

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

$$R\% = \frac{\text{masse résidu sec (g)}}{\text{masse de la poudre végétale (g)}} \times 100$$

4. Tests phytochimique

Les tests phytochimique consiste dans la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés (**Harbone, 1973; Trease & Evans, 1989; Hagerman *et al.*, 1998; Bruneton, 2009**).

4.1. Les tanins

La présence de tanins est mise en évidence en ajoutant, à 2 ml de l'extrait (50µl d'extrait + 1.95 ml méthanol) quelques gouttes (50µl) de solution de FeCl₃ (2%). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou vert-noire.

4.2. Les flavonoïdes

La réaction de détection de flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait (100µl d'extrait + 4,9ml méthanol) avec 1ml d'HCl (1%) et 100µl de NaOH. La présence des flavonoïdes est mise en évidence par l'apparition d'une coloration jaune.

4.3. Les glucosides cardiotoniques :

A 2.5 ml de chaque extrait (100µl d'extrait + 2,4 ml méthanol) ajouter 1ml d'acide acétique glaciale quelques gouttes (100µl) FeCl₃ (2%) et 0,5 ml d'acide sulfurique. La présence des glucosides cardiotoniques est confirmée par la formation de deux phases, une sous forme d'un anneau colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique).

4.4. Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait (50µl d'extrait + 0,95 ml méthanol) avec 2ml d'eau distillée et 20 gouttes (500µl) de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique.

4.5. Les phénols

A 1ml de l'extrait (50µl d'extrait + 0.95 ml méthanol) 2ml d'eau distillée est ajouter avec quelques gouttes (50µl) FeCl₃ (10%). La présence des phénols est mise en évidence par l'apparition d'une coloration bleu ou verte.

4.6. Les résines

Leur détection consiste à traiter 5ml de l'extrait (50µl d'extrait + 4,5 ml méthanol) avec 2,5 ml d'acide acétique glaciale, puis chauffer quelques minutes et en fin ajouter 0,125 ml d'acide sulfurique. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration pourpre brillante.

4.7. Les glycosides

A 1 ml de chaque extrait (100µl d'extrait + 0,9 ml méthanol) ajouter 1 ml d'acide sulfurique (5%), chauffer pendant 1 minute puis centrifuger 5 minutes. Prendre des volumes identiques ; 1ml de surnageant mélanger avec 1ml de chloroforme, ce mélange est incubé 5min et enfin ajouter 100µl NaOH à la phase chloroforme. La présence des glucosides est confirmée par l'apparition d'une coloration jaune.

4.8. Les acides aminés

Ce test est basé sur la réaction des acides aminés avec la ninhydrine. A 10mg des résidus obtenus après évaporation de chaque solvant d'extraction solubilisée dans 1ml d'eau distillée ajouter 1ml de solution de ninhydrine préparée dans l'acétone (ou éthanol) dont la concentration est de 1%. Chauffer dans le bain marie et observer le changement de couleur. La présence des aminoacides est confirmée par l'apparition d'une couleur violette.

4.9. Les stéroïdes

A 10mg des résidus obtenus après évaporation de chaque solvant d'extraction solubilisée dans 2 ml de chloroforme. Ajouter 10 gouttes (70µl) d'acide acétique glacial puis 2 gouttes (10µl) d'acide sulfurique concentré. La solution devenue rouge puis bleu et enfin bleu claire qui indiquent la présence des stéroïdes.

5. Dosages des métabolites secondaires

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur les teneurs en phénol totaux, les flavonoïdes, les chlorophylles et les caroténoïdes.

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 & Singleton (1977)**, le réactif est formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PM_{12}O_{40}$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène.

Mode opératoire

250 μ l de réactif de *Folin* (10 fois dilué) est ajouté à 50 μ l 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 0,05 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.*, 1970**), ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm.

Mode opératoire

Un millilitre de chaque solution diluée dans le méthanol ou de l'extrait végétal dilué est mélangé avec 1ml 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 0,1g/l préparé dans le MeOH a été diluée pour obtenir des solutions filles de concentrations différentes varient entre 0,01g/l et 0,1g/l.

5.3. Dosage des anthocyanes

La teneur en anthocyanes des extraits de plantes ont été déterminés par la méthode modifiée de **Padmavati *et al.* (1997)**.

Les plantes finement brayé ont été macérés dans le méthanol acidifié (1% HCl/méthanol) à la raison de 25mg/ml, pendant 24h à 4°C dans le réfrigérateur. Une centrifugation a été fait à 1000g pendant 15min, la concentration des anthocyanine dans le surnageant a été mesurée par spectrophotomètre à 530 et 657nm, le coefficient d'extinction 31,6 M⁻¹cm⁻¹ a été utilisé pour convertir les valeurs l'absorbance en concentrations des anthocyanine.

La concentration a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$[\text{Anthocyanin}](\mu\text{mol/g}) = \left(\frac{A_{530} - 0.33 \cdot A_{657}}{31.6} \right) \times \left(\frac{V(\text{ml})}{m(\text{g})} \right)$$

- ⇒ *A* : Absorbance.
- ⇒ *V* : volume de méthanol acidifie en ml.
- ⇒ *m* : la masse de plante macéré en g.

5.4. Dosage de chlorophylles totales et caroténoïdes

La teneur en chlorophylle totale et les caroténoïdes totaux ont été déterminées selon le procédé de **Peksel *et al.* (2010)**. 10 mg d'extrait des plantes a été dissous dans 10 ml d'eau distillée. On mesuré L'absorbance de l'échantillon à 450, 645 et 663 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La chlorophylle totale et la teneur en caroténoïdes totaux ont été calculés à l'aide des équations suivantes :

$$\text{Chlorophylle (a)} = 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$$

$$\text{Chlorophylle (b)} = 22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}$$

$$\text{Chlorophylle Totale} = 20,2 \times A_{645} - 8,02 \times A_{663}$$

$$\text{Caroténoïde Total} = 4,07 \times A_{450} - [(0,0435 \times \text{chlorophylle (a)}) + 0,367 \times \text{chlorophylle (b)}]$$

6. Evaluation de l'activité antioxydante

6.1. Méthode de 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 technique d'analyse on a utilisé le test DPPH' (2,2 diphenyle-1-pikryl-hydrazyle), joue sur le transfert d'électron singulet pour déférentes concentration de l'extrait et une comparaison avec des antioxydants de références (Trolox, BHA et 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 15).

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**).

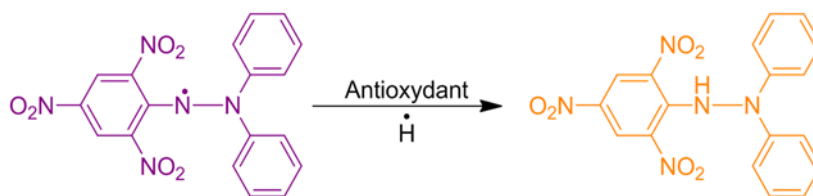


Figure 15 : Réduction du radical libre DPPH• (Molyneux, 2004)

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 A_0 (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

A_0 : 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 EC_{50} ont été déterminées en (µg/ml), qui représentent les concentrations des échantillons à 50% de neutralisation des radicaux libres (DPPH•).

6.2. Méthode de piégeage de radical ABTS^{•+}

Ce test est basé sur la réaction entre un radical cationique stable ABTS^{•+} (2,2-azinobis-(3-éthyl benzothioazoline-6-sulfonic acide) (générateur de radicaux libres) et une substance donneur de protons, se produit immédiatement après l'ajout d'une solution de potassium persulfate $K_2S_2O_8$, ce radical cation ABTS^{•+} est un chromogène stable à température ambiante, peut être mesure dans un spectromètre à $\lambda = 734$ nm.

Mode opératoire

Utilisant la méthode modifiée de **Re et al. (1999)**. Le radical ABTS^{•+} a été préparé par l'ajout de 7mM de ABTS avec 2,45mM de potassium persulfate incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 24 heures. Une série des dilutions ont été préparés en MeOH de volume 1ml, est ajouté à 1ml d'une solution d'ABTS^{•+} (Absorbance ≈ 0,700). Le mélange est incubé pendant 15 min à l'obscurité. Ensuite l'absorbance a été mesurée contre le blanc à 734nm par spectrophotomètre (UV-Visible). Le pourcentage de piégeage du radical ABTS^{•+} a été calculé par la formule suivante :

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

A : Absorbance de la solution de ABTS^{•+} en présence de l'échantillon

A₀ : Absorbance de la solution de ABTS^{•+} en absence de l'échantillon

6.3. Méthode de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺). En effet le Fe³⁺ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 750 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Berker et al., 2007**).

Mode opératoire

400 µl de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 1ml de l'acide chlorhydrique HCl (1M) et 200 µl de SDS (1%) et 300µl d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ (1%), L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes puis refroidi à température ambiante. 200µl d'une solution de chlorure ferrique FeCl₃ (0,1%) a été ajouté au mélange réactionnel.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 750nm à l'aide de spectrophotomètre UV-Vis contre, un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil. Les résultats ont été exprimés par *Trolox Equivalent antioxidant capacities* (TEAC).

7. Etude statistique

Tous les expériences ont été faite en trois essais, et les résultats sont présenter en « moyenne \pm l'erreur standard (SD) ». Le logiciel SigmaPlot® 12.0 a été utilisé pour tracer les courbes nécessaires (courbes d'étalonnages, courbes du pouvoir antioxydant). Les modèles choisis pour nos données expérimentales sont :

- Les courbes d'étalonnages :

$$y = ax + b$$

- Détermination d'EC₅₀ de piégeage de radical DPPH :

$$y = ax + b$$

- Détermination d'EC₅₀ de piégeage de radical ABTS^{•+} :

$$y = ax + b$$

- Détermination de TEACE par FRAP Test :

$$y = ax + b$$

Tel que a et b sont des paramètres calculés par le logiciel.

Le test statistique « *Pearson Correlation* » a été appliqué pour déterminer le coefficient de corrélation (R) entre les valeurs 1/EC₅₀ et les teneurs en polyphénols, les flavonoïdes.

CHAPITRE 3 :

RÉSULTATS et DISCUSSION

1. Résultats du rendement d'extraction

Six fractions sont obtenues : la fraction chloroforme (F1), la fraction Méthanol-Eau 35% (F2), la fraction d'hexane (F3), la fraction aqueuse (F4), la fraction butanol (F5) et la fraction d'acétate d'éthyle (F6).

Le rendement et la couleur ainsi que l'aspect de chaque fraction, sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Rendement, aspect et couleur des fraction obtenus

Fractions		Rendement %	Couleur de résidu sec	Aspect de résidu sec
F1	<i>Chloroforme</i>	1,97	<i>Vert foncé</i>	<i>Pâte</i>
F2	<i>MeOH-H₂O 35%</i>	0,03	<i>Jaune</i>	<i>Poudre</i>
F3	<i>Hexane</i>	0,05	<i>Vert clair</i>	<i>Poudre</i>
F4	<i>H₂O</i>	0,27	<i>Marron clair</i>	<i>Pâte</i>
F5	<i>Butanol</i>	0,10	<i>Marron clair</i>	<i>Pâte</i>
F6	<i>Ac-O-Et</i>	0,98	<i>Marron clair</i>	<i>Poudre</i>

Le rendement d'extraction est varié de 0,03% à 1,97 % dans des différentes fractions de solvants (Chloroforme, MeOH-H₂O 35%, Hexane, H₂O, Butanol et Ac-O-Et) de la plante étudiée.

La fraction chloroforme et la fraction Ac-O-Et, présentent le rendement le plus élevé avec un pourcentage de 1,97% et 0,98% respectivement. Par contre le rendement le plus faible a été marqué pour la fraction MeOH-H₂O 35% (0,03%).

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.

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale. L'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage.

Le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature de solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité. L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leurs degrés de solubilité dans le solvant d'extraction (Herzi, 2013).

2. Résultats des tests phytochimique

Les tests phytochimique consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante. Les résultats des tests phytochimique sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Résultats des tests phytochimique (+ positif, - négatif, +/- faible)

Fractions	F1	F2	F3	F4	F5	F6
<i>Tanins</i>	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+
<i>Flavonoïdes</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Glucosides cardiotoniques</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Composés réducteurs</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Phénols</i>	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+
<i>Résines</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Glycosides</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Acides amines</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Stéroïdes</i>	+	-	-	-	-	+/-

Les principaux constituants chimiques présents dans les six fractions sont identifiés par des réactions colorées. Les réactifs de caractérisation classique ont permis de mettre en évidence les groupes chimiques suivants : les composés réducteurs (réactif de *Fehling*), les tanins (réaction par FeCl_3), les flavonoïdes (réaction de la *cyanidine*), les glucosides cardiotoniques, les phénols, les résines, les glycosides, les acides aminés et les stéroïdes.

Les tests phytochimique réalisés sur les différentes fractions (Chloroforme, MeOH-H₂O 35%, Hexane, H₂O, Butanol et l'Ac-O-Et) de l'espèce *Lobaria pulmonaria* ont révélé la richesse de cette plante en métabolites secondaires.

Ces tests ont montré la richesse de cette plante en tanins, flavonoïdes, phénols et glucosides cardiotoniques, avec la présence des résines et des composés réducteurs et l'absence des glycosides.

3. Résultats de dosage des métabolites secondaires

3.1. Résultats du dosage des composés phénoliques

Le dosage de polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de *Folin-Ciocalteu*. La teneur en composés phénoliques de chaque fraction a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (figure 16) qui est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec de la plante (mg EAG/g d'extrait sec). Les teneurs en polyphénols totaux sont présentés dans le tableau 9.

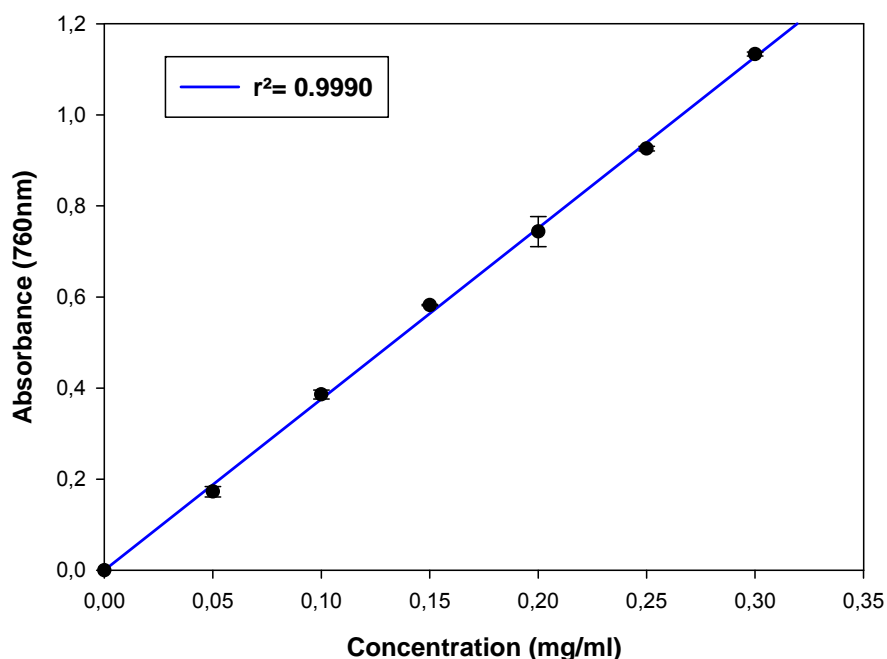


Figure 16 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique

Tableau 9 : La teneur en polyphénols totaux (mg AG/g) de différentes fractions

Fractions		Composés Phénoliques (mg AG/g)
F1	<i>Chloroforme</i>	93,23
F2	<i>MeOH-H₂O 35%</i>	58,36
F3	<i>Hexane</i>	4,27
F4	<i>H₂O</i>	3,08
F5	<i>Butanol</i>	10,88
F6	<i>Acétate d'éthyle</i>	209,04

Selon les résultats illustrées dans le tableau ci-dessus (tableau 9), on distingue que la fraction d'acétate d'éthyle possède la plus haute teneur en polyphénols totaux (209,04mg EAG/g extrait sec), suivi par la fraction chloroforme et la fraction MeOH-H₂O 35%, avec une teneur de 93,23mg EAG/g extrait sec et 58,36mg EAG/g d'extrait sec, respectivement. Tandis que les trois fractions butanol, hexane et eau, présentent les plus faibles teneurs par rapport les autres fractions (10,8 ; 8,4.27 et 3,08 mg EAG/g extrait sec respectivement).

Par ailleurs, le réactif de *Folin-ciocalteu* utilisé dans ce dosage n'est pas spécifique des polyphénols, car il réagit également avec les protéines, les sucres réducteurs, l'acide ascorbique...etc. De telles interférences peuvent être négligées car ces composés sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (**Boizot & Charpentier, 2006**). Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses, et sont peu solubles dans les solvants organiques apolaires (**Bruneton, 2009**).

3.2. Résultat du dosage des flavonoïdes

Concernant la détermination de la teneur en flavonoïdes totaux de nos fractions, elle a été effectuée au moyen d'un dosage spectrophotométrie par la méthode d'AlCl₃.

Les taux des flavonoïdes des extraits ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage tracée, en utilisant la quercétine comme standard (figure 17). Les résultats sont exprimés en termes de mg EQ/g d'extrait sec. Le tableau 10 représente la teneur des flavonoïdes dans différentes fractions.

Tableau 10 : La teneur en flavonoïdes en (mg QR/g) de différentes fractions

Fractions		Flavonoïdes (mg QR/g)
F1	<i>Chloroforme</i>	48,51
F2	<i>MeOH-H₂O 35%</i>	26,84
F3	<i>Hexane</i>	0,36
F4	<i>H₂O</i>	0,09
F5	<i>Butanol</i>	0,51
F6	<i>Acétate d'éthyle</i>	5,41

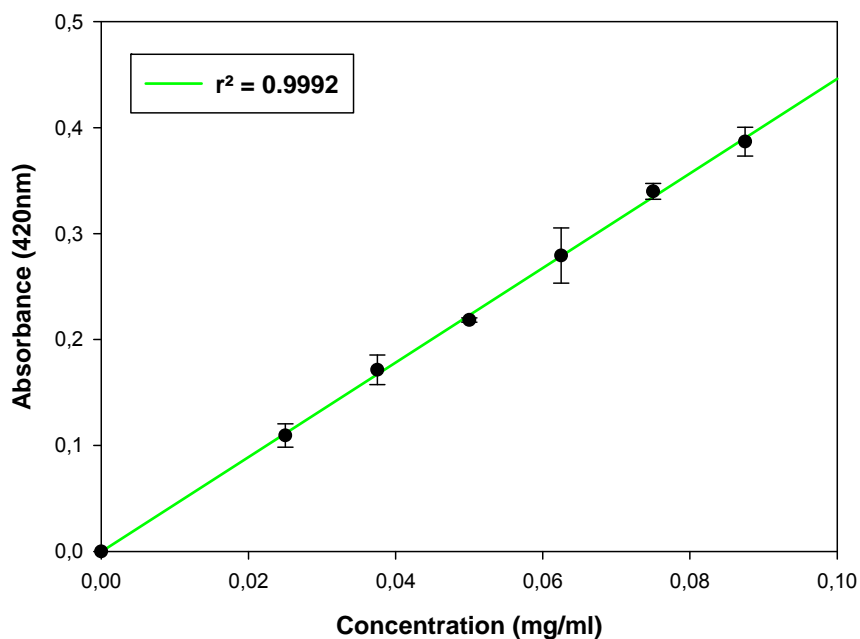


Figure 17 : La courbe d'étalonnage de la quercétine

D'après les résultats, nous avons constaté que tous les fractions préparés contiennent des flavonoïdes mais à des concentrations très variables. La fraction chloroforme présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes (48,51 mg EQ/g extrait sec), suivi par la fraction MeOH-H₂O 35% et la fraction d'acétate d'éthyle (26,84 et 5,41 mg EQ/g extrait sec) par contre les autres fractions présentent des teneurs faible en flavonoïdes avec des valeurs (0,36 ; 0,09 et 0,51 mg EQ/g extrait sec) respectivement fraction d'hexane, d'eau et butanol).

Selon **Benazzouz & Benabderrahmane (2017)**, le contenu en polyphénol varie qualitativement et quantitativement d'une plante à autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

- ✓ Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol agressions et maladies.
- ✓ Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante.
- ✓ La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux.

3.3. Résultats de dosage des anthocyanes,

Le résultat de dosage des anthocyanes, dans l'extrait brut d'acétone est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Résultat de dosage des anthocyanes

<i>Anthocyanin</i>	0,386 $\mu\text{mol/g}$
--------------------	-------------------------

Les anthocyanines sont des pigments flavonoïdes rouges, violets et bleus produits principalement dans les cellules épidermiques des plantes, où ils s'accumulent dans des vacuoles, ce qui provoque la coloration du tissu. La voie de biosynthèse du composé polyphénolique est étroitement liée à celle des anthocyanes (**Ghorbanli *et al.*, 2012**).

3.4. Résultats de chlorophylles et caroténoïdes

Le résultat de dosage de chlorophylles totales et caroténoïdes dans l'extrait brut d'acétone sont présenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12 : Résultat de dosage de chlorophylles totales et caroténoïdes

Chlorophylle (a)	0,282 mg/g
Chlorophylle (b)	0,533 mg/g
<i>Chlorophylle totale</i>	0,414 mg/g
<i>Caroténoïde total</i>	1,181 mg/g

La détermination quantitative de la chlorophylle (a) et (b), et des caroténoïdes dans un extrait de pigment complet de tissu végétal vert par spectroscopie UV-VIS est compliquée par le choix de l'échantillon, du système de solvant et du spectrophotomètre utilisé. Les différents pigments végétaux absorbent la lumière dans les régions spectrales qui se chevauchent, selon le système choisi.

Selon **Feret *et al.* (2008)**, le magnésium participe aux propriétés optiques de la molécule de la chlorophylle, donc la différence des teneurs en chlorophylles de l'espèce *Lobaria pulmonaria* peut être expliquée par les différences de concentrations du sol de la plante associé en métaux tels que Mg^{2+} et Cu^{2+} .

On a trouvé une teneur en caroténoïdes de 1,181mg/g, en comparaison avec les résultats obtenus par **Mehenni & Rahmouni (2017)**, qui a trouvé une valeur de 6,63mg/g, en constate donc une grande différence et cela pourrait être dû au type de solvant utilisé pour l'extraction et aux conditions opératoires.

4. Résultats de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* de nos fractions a été évaluée par trois méthodes colorimétriques complémentaires à savoir le test de DPPH, ABTS et FRAP et les résultats sont comparés aux étalons de référence Trolox, BHA et de la vitamine C.

4.1. Résultats de l'activité antioxydante par Test DPPH

La capacité antioxydant des différentes fractions a été déterminée à partir de valeurs d'EC₅₀ à l'aide de la figure 18, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50% du radicale DPPH. Les valeurs d'EC₅₀ de six fractions sont figurées dans le tableau ci-dessous (tableau 13).

Tableau 13 : Les valeurs d'EC₅₀ du test DPPH des six fractions et de trois standards

Fractions et standards		Valeur EC ₅₀ en (µg/ml)
F1	<i>Chloroforme</i>	66,84
F2	<i>MeOH-H₂O 35%</i>	18,17
F3	<i>Hexane</i>	408,25
F4	<i>H₂O</i>	298,14
F5	<i>Butanol</i>	88,71
F6	<i>Ac-O-Et</i>	19,67
<i>Vitamine C</i>		3,77 ± 0,17
<i>Trolox</i>		1,85 ± 0,12
<i>BHA</i>		3,17 ± 0,13

Une variation de valeurs d'EC₅₀ a été remarque sur les six fractions, la fraction F2 et F6 présentent une forte activité antioxydante avec des valeurs EC₅₀ de 18,17 et 19,67µg/ml respectivement. Tandis que la fraction F3 et F4 montrent une faible activité antioxydante avec des valeurs EC₅₀ de 408,25 et 298,14µg/ml.

Généralement les fractions sont capable de réduire le radical libre DPPH, mais cette activité antioxydante est faible relativement aux valeurs des standard Trolox, BHA et Vitamine C : 1,85µg/ml ; 3,17µg/ml et 3,77µg/ml, respectivement.

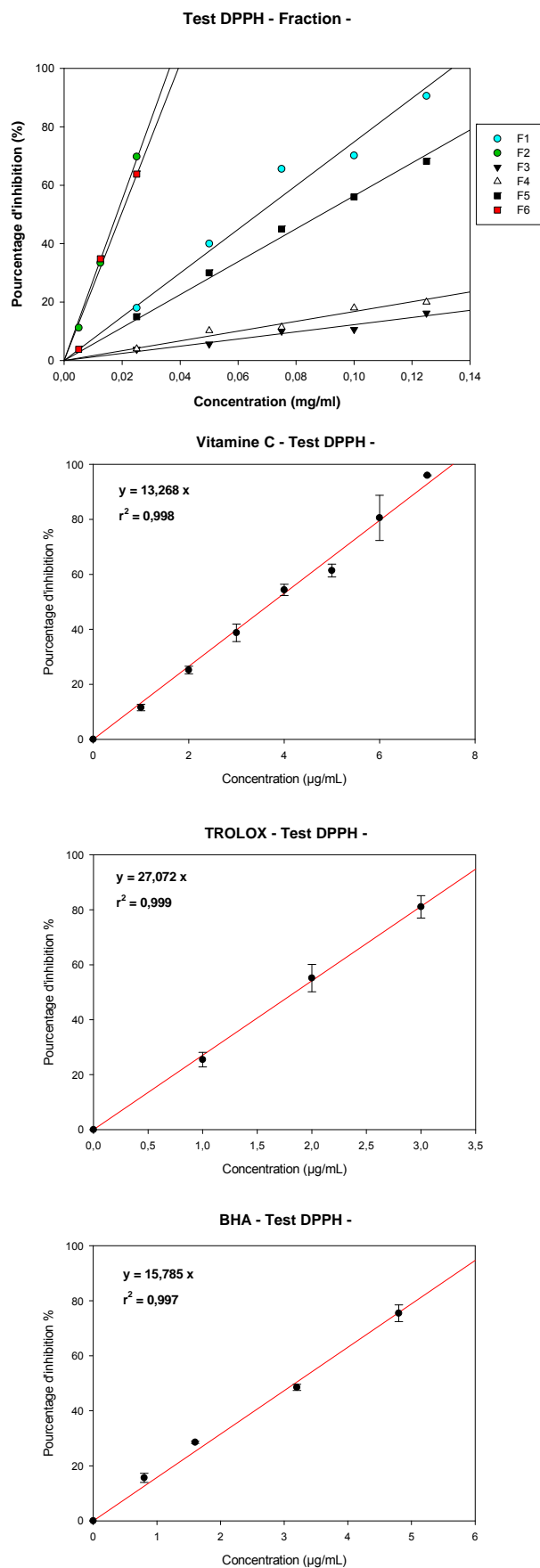


Figure 18 : Courbes représentes le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des fractions de *Lobaria pulmonaria* avec les standards

4.2. Résultats de l'activité antioxydante par Test ABTS

La méthode d'ABTS présente une coloration bleue turquoise lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes. La forme réduite confère à la solution une décoloration.

Les valeurs d'EC₅₀ ont été déterminées pour nos fractions à partir des représentations graphiques (figure 19) également, on a testé l'activité antioxydants de référence (trolox , vitamine C et BHA) a fin de les comparer avec nos fractions. Les valeurs d'EC₅₀ de six fractions et les standards sont figurées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 14 : Les valeurs d'EC₅₀ du test ABTS des six fractions et de trois standards

Fractions et standards		Valeur EC ₅₀ en (µg/ml)
F1	<i>Chloroforme</i>	36,48
F2	<i>MeOH-H₂O 35%</i>	8,58
F3	<i>Hexane</i>	75,72
F4	<i>H₂O</i>	85,77
F5	<i>Butanol</i>	33,54
F6	<i>Ac-O-Et</i>	23,62
<i>Vitamine C</i>		1,38 ± 0,01
<i>Trolox</i>		2,84 ± 0,03
<i>BHA</i>		1,59 ± 0,03

D'après les résultats obtenus, la meilleure activité antioxydante a été marquée pour la fraction MeOH-H₂O 35% (F2) avec un EC₅₀ de l'ordre de 8,58µg/ml, suivi par la fraction d'acétate d'éthyle (F6) et respectivement, butanol (33,54 µg/ml), chloroforme (36,48µg/ml) l'hexane avec EC₅₀ de 75,72µg/ml et Enfin, la fraction eau a donné un EC₅₀ de l'ordre de 85,77µg/ml.

Donc nous constatons que la fraction MeOH-H₂O 35% et l'acétate d'éthyle ont présentées une activité plus élevée que celles des autres fractions.

En comparant les valeurs EC₅₀ des fractions avec celle des standards, on constate que ces valeurs sont relativement faible aux valeurs des standards 1,38 ; 2,84 et 1,59µg/ml, respectivement, Vitamine C, Trolox, BHA.

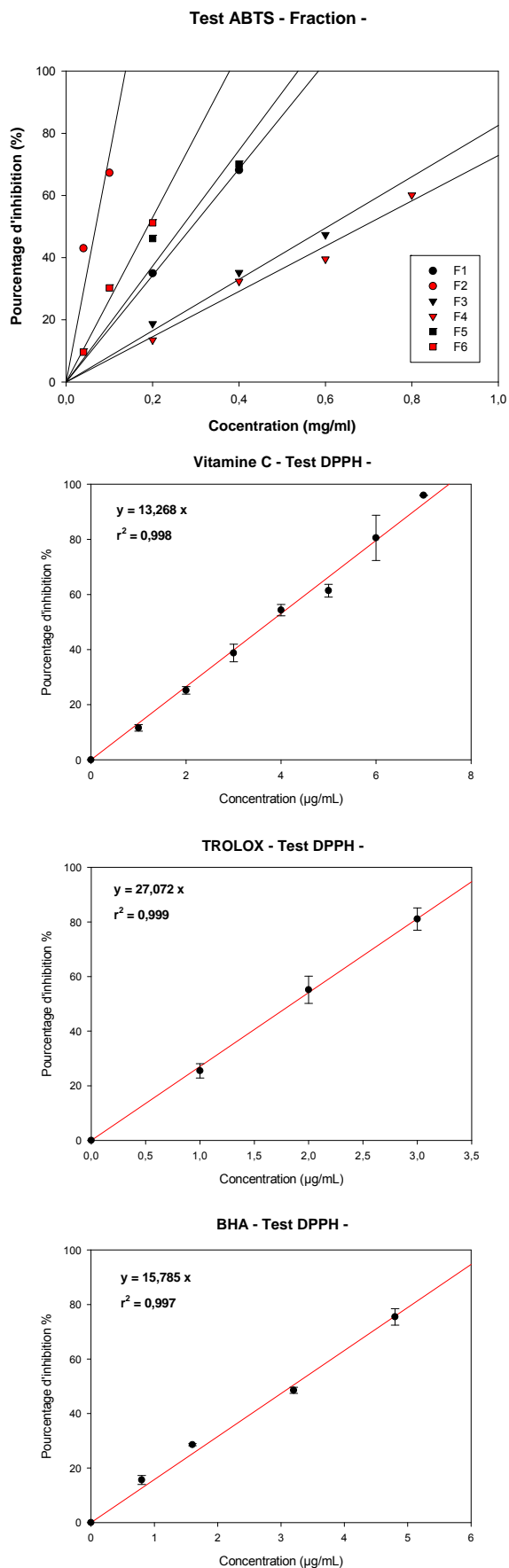


Figure 19 : Courbes représentes le pourcentage d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations des fractions de *Lobaria pulmonaria* avec les standards

4.3. Résultats du pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) par les antioxydants qui donnent la couleur verte. Les valeurs du TEAC obtenu par le test FRAP sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 15 : Les valeurs d' EC_{50} du test ABTS des six fractions

Fractions		TEAC (mg Trolox/g)
F1	<i>Chloroforme</i>	5,80
F2	<i>MeOH-H₂O 35%</i>	9,32
F3	<i>Hexane</i>	4,68
F4	<i>H₂O</i>	6,45
F5	<i>Butanol</i>	7,38
F6	<i>Acétate d'éthyle</i>	3,77

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus dans le tableau montre que la fraction (F2) MeOH-H₂O 35% présente un pouvoir réducteur plus important par rapport aux autres fractions. Quand la valeur de TEAC augmente signifie que l'extrait est un bon réducteur. Selon la figure 20 toutes les fractions montrent une activité réductrice de fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}).

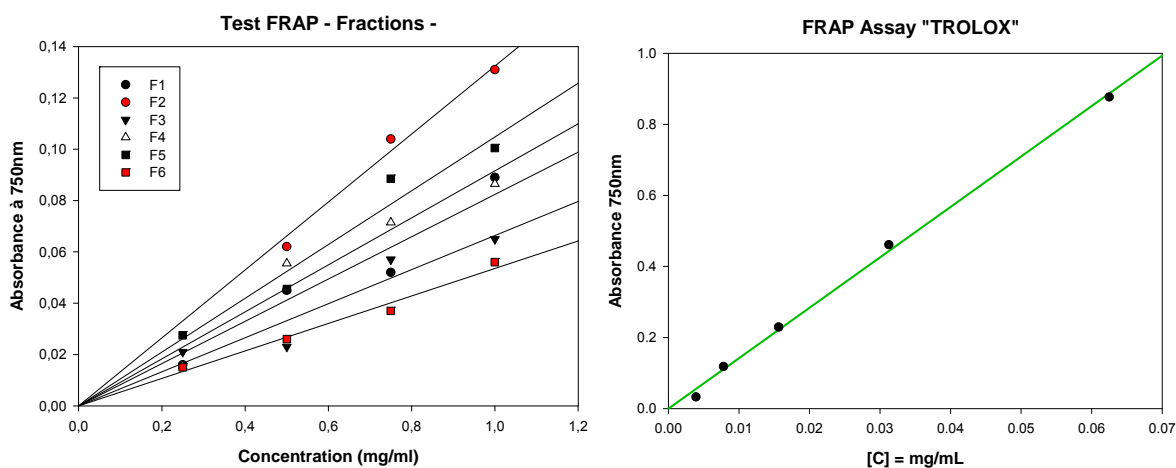


Figure 20 : Courbes représentes pouvoir réducteur des fractions et de Trolox, en (mg/ml) par Test FRAP

5. Résultats de test de corrélation

La relation entre les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et la capacité antioxydante totale de différentes fractions est montrée dans le tableau 16.

Tableau 16 : Test de corrélation entre l'activité antioxydante et le taux des composés phénoliques (CP, FL)

Coefficient « R »	Test (DPPH)	Test (ABTS)	Test FRAP	CP	FL
Test (DPPH)	1				
Test (ABTS)	0,8292	1			
Test FRAP	0,2047	0,6717	1		
CP	0,7029	0,2178	-0,4659	1	
FL	0,2564	0,3655	0,2460	0,2590	1

Les résultats obtenus nous montre la présence d'une bonne corrélation entre le test ABTS et le test DPPH (R=0,8292), et aussi une corrélation modérée entre Test ABTS et FRAP (R=0,6717). Concernant la corrélation entre les composés phénolique (CP et FL) et les tests antioxydants, une corrélation assez bonne a été montré entre le test DPPH et les composés phénoliques avec R=0,7029 (figure 22) ; mais les autres tests ne montre pas une corrélation.

La figure 21 représente la corrélation entre les teneurs en composés phénoliques totaux et les flavonoïdes.

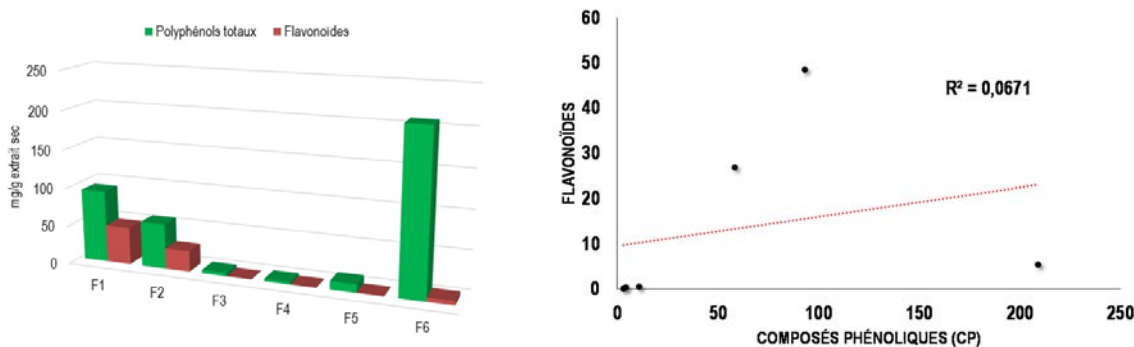


Figure 21 : Graphe de corrélation entre les composés phénoliques et les flavonoïdes

Selon le coefficient de détermination ($R^2 = 0,0671$ ou $R=0,2590$), les composés phénolique et les flavonoïdes ne sont pas corrélé. Nous avons comparés ces résultats obtenus avec d'autre résultats mené par **Adjila & Dakmoussi (2014)** sur le même espèce, un coefficient de détermination a été calculé ($R^2 = 0,0210$), les résultats confirme clairement qu'il n'existe aucune corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et la quantité des flavonoïdes.

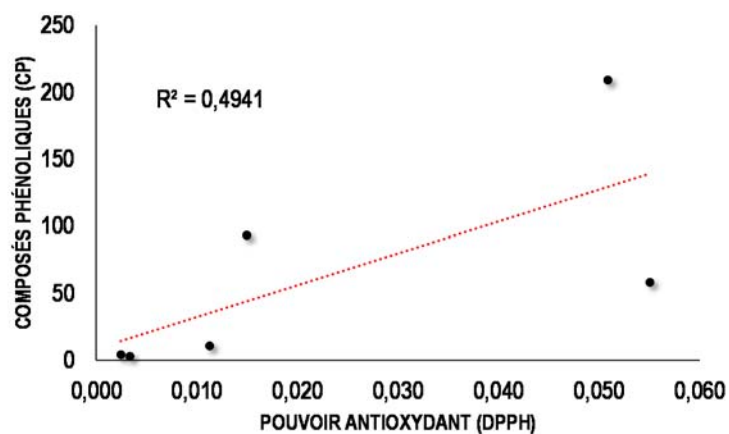


Figure 22 : Graphe de corrélation entre les composés phénoliques et le pouvoir antioxydant (DPPH)

Selon la figure 22 Ci-dessous nous avons trouvé une corrélation assez bonne ($R^2=0,4941$) entre le pouvoir antioxydant par le test DPPH et la teneur en polyphénols totaux.

6. Discussion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans l'activité antioxydante. De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés pour confirmer les résultats de nos travaux. La présente étude qui est consacrée à la recherche d'éventuels effets antioxydant des extraits : acétate d'éthyle, chloroforme, H₂O, eau-méthanol 35%, hexane, et *n*-butanol par test DPPH, ABTS et FRAP.

La capacité antioxydante des différentes fractions ont été déterminée à partir de l'EC₅₀. C'est la concentration nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres (DPPH, ABTS). Plus la valeur d'EC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Hebi et Eddouks, 2016).

En comparant nos résultats avec ceux de **Boulerbaa & Maroufi (2018)**, sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts de lichen *Lobaria pulmonaria*, ils ont montrés que l'extrait d'acétone a présenté une activité plus élevée que celles des autres extraits avec de valeur d'EC₅₀ de 56,31µg/ml. Ce qui confirme nos résultats qui ont été mené sur le fractionnement de l'extrait d'acétone.

Dans notre travail nous avons marqué une activité antioxydante plus importante selon les valeurs d'EC₅₀ du test de DPPH et ABTS trouvées avec des valeurs d'EC₅₀ de 18,7µg/ml et 8,58µg/ml respectivement.

Les résultats montrent une activité plus importante pour la fraction acétate d'éthyle, MeOH-Eau 35% et la fraction *n*-butanol par rapport aux autres fractions chloroforme, hexane, et l'eau. Donc le fractionnement de l'extrait d'acétone augmente et localisé l'activité antioxydantes.

D'autre travaux mené par **Adjila & Dakmoussi (2014)**, sur l'activité antioxydantes de l'espèce *Lobaria pulmonaria* des extrait brute par différentes solvant à polarité croissantes montre que la fraction d'acétate d'éthyle de *Lobaria pulmonaria* a une forte activité antioxydante par le teste DPPH et FRAP. Concernant la concentration des polyphénols, la plus élevée est enregistré pour la fraction d'acétate d'éthyle. Ces résultats concordent avec nos résultats.

Selon les travaux mené par **Ondua et al. (2019)**, sur l'activité antioxydante de plusieurs plante médicinale, l'extrait d'acétone de *Typha capensis* présentait la meilleure activité antioxydante dans les tests DPPH et ABTS. Après fractionnement du matériel végétal de *Typha capensis*, la fraction d'acétate d'éthyle et la fraction méthanol/eau (35%) montre un pouvoir antioxydant plus important par rapport aux autres fractions.

Les anthocyanes, chlorophylles totales sont parmi les principaux constituants responsables de l'activité antioxydante des lichens. Les caroténoïdes sont des antioxydants puissants et piègeurs des radicaux libres (**Grassmann et al., 2002; Wong & Chye, 2009**).

CONCLUSION

Conclusion

Un grand nombre des plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui sont utilisées dans plusieurs applications et dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, agriculture et cosmétologie. Depuis plusieurs années, l'utilisation de plantes médicinales ou de préparations à base de plantes connaît un succès croissant. Aujourd'hui, plus de la moitié de la population mondiale pratique la phytothérapie.

Et comme la phytothérapie suscite un renouveau d'intérêt, nous sommes intéressés dans ce travail à l'effet de l'extrait phénolique de la plante médicinale *Lobaria pulmonaria* et son activité antioxydante.

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 différentes fractions, dont la fraction acétate d'éthyle possède la plus haute teneur en polyphénols totaux (209,04 mg EAG/g extrait sec) par contre la plus haute teneur en flavonoïdes a été marquée pour la fraction chloroforme (48,51 mg EQ/g extrait sec).

Le fractionnement des extraits choisis a conduit à l'obtention de quelques fractions plus actives que les extraits ayant conduit à leur obtention.

L'activité antioxydante des différentes fractions de l'extrait d'acétone de *Lobaria pulmonaria* a été évaluée par trois méthodes : piégeage de radical libre DPPH, piégeage du radical-cationique ABTS et la méthode de la réduction du fer (FRAP). Pour le test de DPPH et le test ABTS, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans la fraction eau 35% MeOH et la fraction acétate d'éthyle. Cette activité a aussi été remarquée par le test FRAP pour les deux fractions eau 35% MeOH et butanol.

Enfin, comme suite à ce travail, on propose d'étudier :

- la composition chimique par HPLC afin d'identifier les molécules bioactives,
- Etudier d'autres activités biologiques (anti-inflammatoire).

-Il serait alors intéressant d'effectuer des études toxicologiques sur les fractions ayant présentées une bonne activité afin de vérifier leur innocuité.

Références bibliographiques

- Adjila, S. & Dakmoussi, K. (2014). *Evaluation in-vitro de l'activité antioxydante des extraits phénoliques de deux plantes médicinales « Lobaria pulmonaria et Ammodaucus leucotrichus »*. (Master en Biochimie), Université Amar Téliidji - Laghouat. 65p.
- Atalay, F.; Odabasoglu, F.; Halici, M.; Cakir, A.; Cadirci, E.; Aslan, A., . . . Kazaz, C. (2015). Gastroprotective and Antioxidant Effects of Lobaria pulmonaria and Its Metabolite Rhizonyl Alcohol on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer. *Chemistry & biodiversity*, 12(11), 1756-1767.
- Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9(1), 5-21.
- Bauwens, A. (2004). *Les Lichens et la qualité de l'aire* Fascicule enseignants, U. C. Louvain (Ed.) (pp. 41). Retrieved from <http://www.sciences.be/wp-content/uploads/dossier%20lichens.pdf>
- Benavente-García, O.; Castillo, J.; Marin, F. R.; Ortuño, A. & Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(12), 4505-4515.
- Benazzouz, N. E. H. & Benabderrahmane, W. (2017). *Etude de l'activité antioxydante des extraits de feuilles d'aloë vera (l.) burm et de Solenostemma argel (delile) hayne*. (Matsier - Microbiologie fondamentale et appliquée), Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. 62p.
- Benhammou, N. (2011). *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien*. (Doctorat en Biologie), Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 174p.
- Benzie, I. F. & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berker, K. I.; Guclu, K.; Tor, I. & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157-1165.
- Boizot, N. & Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, In: Numéro spécial*, 79-82.
- Boulerbaa, R. & Maroufi, F. (2018). *Evaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts de lichen Lobaria pulmonaria*. (Master Biochimie Appliquée), Université Amar Téliidji Laghouat. 70p.
- 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* (4^e ed.). Paris: Lavoisier, 1269p.
- Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones, R. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists. Courier Companies. Inc. Waldorf, MD.

- Cao, G.; Alessio, H. M. & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303-311.
- Chae, S. C.; Lee, J.-H. & Park, S. U. (2013). Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities. *EXCLI journal*, 12, 226.
- Chen, Y.-H.; Yang, Z.-S.; Wen, C.-C.; Chang, Y.-S.; Wang, B.-C.; Hsiao, C.-A. & Shih, T.-L. (2012). Evaluation of the structure–activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae. *Food chemistry*, 134(2), 717-724.
- Conforti, F.; Sosa, S.; Marrelli, M.; Menichini, F.; Statti, G. A.; Uzunov, D., . . . Della Loggia, R. (2008). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 144-151.
- Crawford, S. D. (2015). Lichens Used in Traditional Medicine. In B. Ranković (Ed.), *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential* (pp. 27-80). Cham: Springer International Publishing.
- Cushnie, T. T. & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
- Dee Boersma, P.; Kareiva, P.; Fagan, W. F.; Alan Clark, J. & Hoekstra, J. M. (2001). How Good Are Endangered Species Recovery Plans? The effectiveness of recovery plans for endangered species can be improved through incorporation of dynamic, explicit science in the recovery process, such as strongly linking species' biology to recovery criteria. *BioScience*, 51(8), 643-649.
- Divya, N.; Thenmozhi, S.; Sureshkumar, B. & Selvan, M. (2014). Antibacterial activity of medicinal plant against wound infected pathogens. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(11), 4942.
- 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.
- Feret, J.-B.; François, C.; Asner, G. P.; Gitelson, A. A.; Martin, R. E.; Bidet, L. P., . . . Jacquemoud, S. (2008). PROSPECT-4 and 5: Advances in the leaf optical properties model separating photosynthetic pigments. *Remote sensing of environment*, 112(6), 3030-3043.
- Galleano, M.; Calabro, V.; Prince, P. D.; Litterio, M. C.; Piotrkowski, B.; Vazquez-Prieto, M. A., . . . Fraga, C. G. (2012). Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259(1), 87-94.
- Ghorbanli, M.; AMIRKIAN, T. T. & NIYAKAN, M. (2012). Seasonal changes in antioxidant activity, flavonoid, anthocyanin and phenolic compounds in *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale and *Physcia dubia* (Hoffm.) Lettau from Babol forest sites in north of Iran.
- Grassmann, J.; Hippeli, S. & Elstner, E. F. (2002). Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 471-478.
- Guillouty, A. (2016). *Plantes médicinales et antioxydants*. (Doctorat en Pharmacie), Université Toulouse III Paul Sabatier. (2016/TOU3/2103): 102p.

- Gunawardena, D.; Govindaraghavan, S. & Münch, G. (2014). Anti-inflammatory properties of cinnamon polyphenols and their monomeric precursors *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 409-425): Elsevier.
- Hagerman, A. E.; Riedl, K. M.; Jones, G. A.; Sovik, K. N.; Ritchard, N. T.; Hartzfeld, P. W. & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(5), 1887-1892.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125-126.
- Harbone, J. (1973). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd Chapman and Hall: London.
- Herzi, N. (2013). *Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles*. (Doctorat de l'Université de Toulouse), INPT. 185p.
- Honda, N. K. & Vilegas, W. (1999). The chemistry of lichens. *Quimica Nova*, 22(1), 110-125.
- Karakus, B.; Odabasoglu, F.; Cakir, A.; Halici, Z.; Bayir, Y.; Halici, M., . . . Suleyman, H. (2009). The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species, on indometacin-induced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(5), 635-639.
- Kumar, K. S.; Ganesan, K. & Rao, P. V. S. (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. *Food Chemistry*, 107(1), 289-295.
- Lacolley, P.; Babuty, D.; Boulanger, C.; Ghaleh, B.; Loirand, G.; Pinet, F. & Samuel, J. (2008). *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux* (1 ed.): JOHN LIBBEY EUROTEXT, 664p.
- Lee, J.; Koo, N. & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
- Leverve, X.; Cosnes, J.; Erny, P. & Hasselmann, M. (2001). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte* (2nd ed.): Springer Paris, 931p.
- Lewin, G.; Magin, D.; Ismailov, D. Y. & Popov, I. (2000). Photochemiluminescence as a tool to determine the antioxidant activity in biological systems. Mathematic modeling. *Voprosy meditsinskoi khimii*, 46(4), 419-426.
- Li, C.; Oldham, C. D. & May, S. W. N. (1994). N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochemistry Journal*, 300, 31-36.
- Mabry, T.; Markham, K. & Thomas, M. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. 1970. Paper presented at the Library of Congress Catalog Card.
- Macheix, J. J.; Fleuriet, A. & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique* (P. p. e. u. romandes Ed. 1^{er} ed.)p.

- Mahmoudi, S.; Khali, M. & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*(9), 35.
- Marsy, S. (2015). *Lobaria pulmonaria, inventaire et écologie sur la Réserve Naturelle Nationale du Tanet Gazon du Faing (Vosges 88) : vers un indicateur de continuité biologique des forêts ?* (Master 2), Université de Nantes. Retrieved from <http://enquetelichensauvergne.mnhn.fr/wp-content/uploads/sites/8/2015/08/Fiche-Lobaria-pulmonaria.pdf>: 60p.
- Mehenni, R. & Rahmouni, M. (2017). *Propriétés antioxydantes d'extraits d'une plante médicinale: Globularia alypum. Application pharmaceutique : solution hydro alcoolique.* (Master Génie des Procédés), l'Université A. MIRA- Bejaia. 56p.
- Milane, H. (2004). *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques.* (Thèse de doctorat), Université Luis Pasteur (Strasbourg 1). p.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V. & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Mladěnka, P.; Zatloukalová, L.; Filipský, T. & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(6), 963-975.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
- Nishitoba, Y.; Nishimura, I.; Nishiyama, T. & Mizutani, J. (1987). Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry*, 26(12), 3181-3185.
- Odabasoglu, F.; Aslan, A.; Cakir, A.; Suleyman, H.; Karagoz, Y.; Halici, M. & Bayir, Y. (2004). Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(11), 938-941.
- OMS. (2002). *Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005.* Genève. 78p.
- Ondua, M.; Njoya, E. M.; Abdalla, M. A. & McGaw, L. J. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 234, 27-35.
- Opara, E. C. (2002). Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 122(1), 28-34.
- Padmavati, M.; Sakthivel, N.; Thara, K. V. & Reddy, A. R. (1997). Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, 46(3), 499-502.
- Parrot, D. (2014). *Etude de quatre lichens marins, maritime ou terrestre et des bactéries associées: Evaluation de la diversité bactérienne et recherche de métabolites d'intérêt.* (Doctoral dissertation), Rennes, INSA. Retrieved from <http://www.theses.fr/2014ISAR0018/document> (2014ISAR0018): 272p.

- Pascal, C. & Yorick, F. (2015). Le point des connaissances sur la répartition du lichen pulmonaire (*Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.) en Franche-Comté. *Les Nouvelles Archives de la Flore jurassienne et du nord-est de la France*, 13, 45-50.
- Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, 1995(276), 87-92.
- Pastre, J. (2005). *Interêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques*. (DOCTEUR VÉTÉRINAIRE), Université Paul-Sabatier de Toulouse. Retrieved from http://oatao.univ-toulouse.fr/1341/1/celdran_1341.pdf (2005 – TOU 3 – 4116): 120p.
- Peksel, A.; Arisan-Atac, I. & Yanardag, R. (2010). Evaluation of antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of the extracts of *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. *Journal of Food Biochemistry*, 34(3), 451-476.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231-1237.
- Roux, C. (2014). *Catalogue des lichens et champignons lichénicoles de France métropolitaine* (Fougères (Ille-et-Vilaine) ed.): Association française de lichénologie; Henry des Abbayes, 1525p.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Sánchez-Moreno, C. & Larrauri, J. A. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci Technol Int*, 4, 391-399.
- Slinkard, K. & Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Trease, G. & Evans, W. (1989). *Pharmacognosy*. 11th edn. Brailliar Tiridel Can: Macmillian publishers.
- Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U. & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS letters*(187), 33-37.
- Winston, G. W.; Regoli, F.; Dugas, A. J.; Fong, J. H. & Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med*, 24, 480-493.
- Wong, J. Y. & Chye, F. Y. (2009). Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(4), 269-277.
- Yamamoto, Y.; Miura, Y.; Kinoshita, Y.; HIGUCHI, M.; Yamada, Y.; Murakami, A., . . . Koshimizu, K. (1995). Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43(8), 1388-1390.