

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم : بيولوجيا جزيئية و خلوية

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**
Filière: Sciences Biologiques

Option : Sciences Pharmacologiques

Thème

Evaluation de l'activité anti-oxydante d'un lichen du désert Algérien «*PSEUDEVERNIA FURFURACEA*»

Membres de Jury

Présidente : Dr. AZOUZ Ouassila
Examinatrice : Dr. LEBSIR Dalila
Encadrante : Dr. MEDJAHED Zeineb

Présenté par

M^{elle} HAMADOU Nihed
M^{elle} ZERMANI Habiba



Année Universitaire 2021-2022

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciements

*On remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire*

*En premier lieu, Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide de notre encadrante **Dr. Medjahed Zeineb**, on la remercie très vivement Pour nous avoir encadré, conseillé, et consacré de son temps tout au long de ce travail*

Nous souhaitons exprimer nos sincères remerciements au ;

***Dr. Azzouz Ouassila** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance*

***Dr. Lebsir Dalila** en acceptant d'examiner et de juger ce travail*

Enfin. Nous remercions tous ceux qui nous ont soutenus durant ce travail

Dédicaces

Ce mémoire est dédié :

*A nos parents, la seule chose qui nous pousser à vivre, que dieux les
protège*

A nos familles, nos amis, à tous qui nous aimes

Et tous ceux qui ont laissé un beau sentiment dans nos cœurs

Sommaire

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Annexes

Introduction. 1

Partie théorique

Chapitre I : Stress oxydant et activité antioxydante

I.1. Stress oxydant	3
I.1.1. Généralités	3
I.1.2. Définition	3
I.1.3. Sources des radicaux libres	4
I.1.4. Types des radicaux libres	4
I.1.4.1. Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	5
I.1.4.2. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	5
I.1.4.3. Radical hydroxyle (OH^{\cdot})	6
I.1.4.4. Radical peroxyde (ROO^{\cdot})	6
I.1.4.5. Radical oxyde nitrique (NO^{\cdot})	7
I.1.4.6. Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$)	7
I.1.4.7. Oxygène singulet (1O_2)	7
I.1.4.8. Hypochlorite (ClO)	8
I.1.5. Marqueurs biologiques de stress	8
I.1.5.1. Peroxydation lipidique	8
I.1.5.2. Oxydation des protéines	8
I.1.5.3. Oxydation de l'ADN	9
I.1.5.4. Myéloperoxydase	9
I.2. Activité antioxydante	9
I.2.1. Généralités	9
I.2.2. Définition	10
I.2.3. Niveaux d'action des antioxydants	10

Chapitre II : *Pseudevernia furfuracea*

I.1. Généralités	12
I.2. Morphologie et anatomie	12
I.3. Usage traditionnel de <i>Pseudevernia furfuracea</i>	13
I.4. Molécules bioactives de <i>Pseudevernia furfuracea</i>	13
I.5. <i>Pseudevernia furfuracea</i> comme bio-indicateur.	14
I.6. Propriétés biologiques de <i>Pseudevernia furfuracea</i>	15
I.6.1. Activité anti-oxydante	15
I.6.2. Activité anti-tumoral	16
I.6.2.1. Activité anti-angiogénique	16
I.6.2.2. Effet contre le cancer colorectal	16
I.6.2.3. Effet contre le cancer hépatique	16
I.6.2.4. Activité anti-Leucémique	17
I.6.3. Activité anti-génotoxique.	17
I.6.4. Activité anti-microbienne et anti- biofilm.	18
I.6.5. Activité inhibitrice des enzymes	18
I.6.5.1. Effet Anti-Alzheimer	18
I.6.5.2. Anti-hyperpigmentation	19
I.6.5.3. Anti-diabétique	19
I.6.6. Activité anti-inflammatoire et anti-nociceptif	19

Partie pratique

I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal	21
I.1.1. Récolte	21
I.1.2. Broyage et tamisage	21
I.2. Extraction	22
I.2.1. Procédure expérimentale	22
I.3. Screening chimique.	23
I.3.1. Dosage des phénols totaux	23
I.3.1.1 Principe	23

I.3.1.2. Procédure expérimentale.	23
I.3.2. Dosage des flavonoïdes.	24
I.3.2.1. Principe.	24
I.3.2.2. Procédure expérimentale	24
I.4. Evaluation de l'activité Anti-oxydante.	24
I.4.1. Test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	24
I.4.1.1. Principe.	24
I.4.1.2. Procédure expérimentale	24
I.4.2. Test de l'ABTS (l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)	25
I.4.2.1. Principe.	25
I.4.2.2. Procédure expérimentale	25
I.4.3. Test du radical hydroxyle (OH).	25
I.4.3.1. Principe.	25
I.4.3.2. Procédure expérimentale	26
I.4.4. Test de pouvoir réducteur de fer (FRAP)	26
I.4.4.1. Principe.	26
I.4.4.2. Procédure expérimentale	26
I.4.5. Test du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	27
I.4.5.1. Principe.	27
I.4.5.2. Procédure expérimentale.	27
I.4.6. Test de blanchissement β-carotène.	27
I.4.6.1. Principe.	27
I.4.6.2. Procédure expérimentale	27
I.4.7. Test de Phosphomolybdate d'ammonium (PPM).	28
I.4.7.1. Principe.	28
I.4.7.2. Procédure expérimentale.	28
I.5. Activité hémolytique	28
I.5.1. Principe	28
I.5.2. Procédure expérimentale.	29
I.6. Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS).	29
I.6.1. Principe	29
I.6.2. Procédure expérimentale.	29

I.6.3. Analyse statistique.	29
----------------------------------	----

II. Résultats et discussion

II.1. Analyse chimique de l'extrait de <i>Pseudevernia furfuracea</i>	31
II.1.1. Taux d'extraction.	31
II.2. Teneur en composés phénoliques.	32
II.2.1. Teneur en Polyphénols totaux.	32
II.2.2. Teneur en Flavonoïdes.	33
II.3. Evaluation de l'activité anti-oxydante.	34
II.3.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire (anti DPPH)	34
II.3.2. Inhibition du radical ABTS.	36
II.3.3. Effet de piégeage du radical hydroxyle (OH)	37
II.3.4. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)	38
II.3.5. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	39
II.3.6. Test de blanchissement de β-carotène.	40
II.3.7. Test au phosphomolybdate d'ammonium (PPM)	42
II.4. Activité anti-hémolytique	43
II.5. Caractérisation des extraits par Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS)	44
Conclusion.	46
Références bibliographiques.	47

Annexes

List des Figures

Figure 1 :	Schémas des voies de production du stress oxydatif.	4
Figure 2 :	Génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule.	5
Figure 3 :	Systèmes de défense contre le stress oxydant	10
Figure 4 :	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf.	13
Figure 5 :	Structures chimiques et nomenclature.	14
Figure 6 :	Photographie originale de <i>Pseudevernia furfuracea</i>	20
Figure 7 :	Poudre de <i>Pseudevernia furfuracea</i>	20
Figure 8 :	Macération des extraits : 15 minutes, 30 minutes et 1 heure	21
Figure 9 :	Filtration des extraits et l'élimination du vinaigre.	21
Figure 10 :	Extraits secs de : 15 minutes, 30 minutes et de 1 heure sous forme sec. ...	22
Figure 11 :	Teneur en Polyphénols des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i>	32
Figure 12 :	Teneur en Flavonoïdes des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i>	33
Figure 13 :	Activité antioxydant anti DPPH des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i> et l'acide ascorbiques.	34
Figure 14 :	Activité antioxydant ABTS des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i> et l'acide ascorbiques.	36
Figure 15 :	Activité antioxydant OH des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i> et l'acide ascorbiques	37
Figure 16 :	Activité antioxydant FRAP des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i>	38
Figure 17 :	Réaction du fenton	39
Figure 18 :	Activité antioxydant du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i> et l'acide ascorbiques.	40
Figure 19 :	Pourcentage de l'inhibition de blanchissement de β-carotène des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i> et l'acide ascorbiques.	40
Figure 20 :	Réduction de Phosphomolybdène par les extraits de <i>Pseudevernia furfuracea</i> et l'acide ascorbique.	42
Figure 21 :	Activité anti-hémolytique des extraits du <i>Pseudevernia furfuracea</i>	43

List des Tableaux

Tableau I :	Rendement d'extraction de la plante.	31
Tableau II :	Composés identifiés chez <i>Pseudevernia furfuracea</i>	45

List des Annexes

Annexe I :	Courbe d'étalonnage pour dosage des polyphénols totaux.	I
Annexes II :	Courbe d'étalonnage pour dosage des Flavonoïdes	I
Annexes III	Courbe d'étalonnage pour le test FRAP	II
Annexes IV		II

Liste des Abréviation

XO: Xanthine oxydase	GPX: Glutathion peroxydase
ABTS: Acide 2,2'-azinobis (3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)	GSH-Px: Glutathion peroxydase
AChE: Acétylcholinestérase	LAL: Leucémie aiguë lymphoblastique
ANOVA: Analyse de la variance	LH: Lymphocyte humaine
AO: Acide olivétorique	LOOH: Hydroperoxyde lipidique
AP: Acide physodique	LS174 : Lignées cellulaires LS174 (carcinome du côlon humain)
ATCC: <i>American Type Culture Collection</i>	MA: Maladie d'Alzheimer
ATM : <i>Protéine</i> -kinase impliquée dans la détection des cassures double- brin de l'ADN	MAPK: Mitogen-activated protein kinases
ATP: Adénosine triphosphate	MDA: Malondialdéhyde
BHA: Butylhydroxyanisole	mg EAG/g: Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme
BChE: Butyrylcholinestérase	mg ER/g : Milligramme équivalent de la Rutine par gramme
CAT: Catalase	MPO: Myéloperoxydase
CHC: Carcinome hépatocellulaire	MRC-5: Lignée de cellules de type fibroblastes embryonnaires humains (lignées cellulaires normales)
CLO: Hypochlorite	MET: Microenvironnement tumoral
CG/MS: Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	NADPH: Nicotine adénine dinucléotide phosphate
COX 2: Cyclooxygénase	OMS: Organisation mondiale de la santé
CPG: Chromatographie de phases gazeuse	<i>P. furfuracea:</i> <i>Pseudevernia furfuracea</i>
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil	PH: Potentielle d'hydrogène
eNOS: Monoxyde d'azote synthase endothéliale dysfonctionnelle	PPM: Phosphomolybdate d'ammonium
ERO: Espèce réactive de l'oxygène	<i>PSE:</i> <i>Pseudevernia furfuracea Extract</i>
FemX: Lignées cellulaires FemX (mélanome humain)	RL: Radicaux Libres
FRAP: Pouvoir réducteur de fer	RO•: Radical alkoxyle
JNK: Kinases c-Jun N-terminales	ROO•: Radical pyroxyle
HA2.X: Glycoprotéine d'hémagglutinine type 2.X	Radical peroxyde
HepG2: Lignée cellulaire de cancer du foie humain	ROS: Espèces réactives d'oxygènes
HCT-116: Lignée cellulaires de cancer du côlon humain	PI3K/Akt: Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/ Sérine-thréonine kinase (Akt)
	UAE: Extractions assistées par ultrasons

SMC1 : Protéine de maintenance
structurelle des chromosomes type 1

SOD: Superoxydase dismutases

TAC: Capacité antioxydante totale

TCA: Acide trichlorure acétique

THLE2: Épithélial du foie humain
transformé-2 (Transformed Human Liver
Epithelial-2)

INTRODUCTION

Les plantes médicinales jouent un rôle essentiel dans la prévention et le traitement des maladies. À cet égard, des plantes entières ou des parties spécifiques de plantes peuvent être utilisées à des fins médicinales. Alternativement, ils peuvent être utilisés comme matières premières dans l'industrie pharmaceutique (**Fitzgerald et al., 2020**). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale utilise régulièrement des traitements traditionnels pour répondre aux besoins de soins de santé primaires. De plus, plus de 50% des nouveaux médicaments développés et approuvés pour l'industrie sont directement issus de produits transformés de plantes médicinales ou des principes actifs de ces dernières (**Yeboah et al., 2022**). En 2017, la valeur mondiale du marché de la phytothérapie et des suppléments à base de plantes estimée à 107 milliards de dollar; la demande et la consommation substantielles de ces produits ont entraîné des pénuries, et dans certains cas l'épuisement, de plusieurs ressources de plantes médicinales, entraînant la destruction de l'habitat et la perte de la diversité génétique (**Wang et al., 2020**).

Le stress oxydatif, défini comme un excès relatif d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par rapport aux antioxydants, les effets nocifs du stress oxydatif causé par la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'organisme humain, exprimé par l'émergence de diverses maladies chroniques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, l'inflammation et le diabète sucré (**Hayes et al., 2020**). Il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant pour préserver les performances physiologiques de l'organisme grâce à l'utilisation de composés antioxydants naturels tels que les composés phytochimiques phénoliques (**Aoussar et al., 2021**). Il a été démontré que les antioxydants dérivés de produits naturels présentent de forts effets protecteurs contre divers problèmes de santé chroniques en reportant les dommages causés par le stress oxydatif.

Les lichens, organismes symbiotiques entre un partenaire photobionte, un partenaire mycobionte et des communautés bactériennes, sont utilisés à des fins médicales depuis des siècles pour traiter les infections rénales, respiratoires et hépatiques, et aussi comme antiseptique. L'utilisation de lichens en médecine traditionnelle ont été justifiés par le fait qu'ils contiennent des molécules bioactives uniques et variées, qui sont produites par un partenaire fongique ou par la communauté bactérienne et accumulées sous forme de cristaux sur la surface supérieure des hyphes (**Petrzik et al., 2019; Aoussar et al., 2021**). En effet, environ 1050 métabolites secondaires du lichen ont été découverts, dont l'acide usnique, les depsidones et les depsides qui ont montré un intérêt pharmacologique important (**Aoussar et al., 2021**). *Pseudevernia furfuracea* est un lichen foliose bien connu, utilisé dans le mélange d'épices, la

préparation des aliments, comme agent de conservation et les préparations à base de plantes (Kalra et al., 2021).

L'utilisation médicinale du *Pseudevernia furfuracea* a été bien documentée dans un vieux tonique comme la sensibilité intestinale en Égypte. En Europe, il est utilisé comme décoction pour les troubles respiratoires, en Andalousie (Espagne), il est recommandé comme traitement antiasthmatique, anti catarrhal, hypotenseur, cicatrisant, et contre l'eczéma et les hémorroïdes dans la province de Kutahya (Turquie) (Mitrović et al., 2014).

Le travail ci-présent vise à l'évaluation des constituants chimiques et l'activité antioxydante *in vitro* ainsi que l'activité hémolytique de l'extrait du lichen *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. Récolté du Sahara algérienne.

L'étude est répartie en deux axes, le premier axe traite deux sous parties d'une recherche bibliographique sur le stress oxydant et l'activité antioxydante ainsi que l'intérêt de l'étude des lichens *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. Le deuxième axe se focalise sur la partie expérimentale et met en évidence différents tests pour évaluer l'activité antioxydante, un test de pouvoir hémolytique suivie d'une caractérisation par chromatographie phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre (CG-MS) pour prédire les composés majoritaires.

PARTIE
THEORIQUE

CHAPITRE I :

Stress Oxydant et Activité Anti-oxydante

I. Stress oxydant et activité antioxydante

I.1. Stress Oxydant

I.1.1. Généralités

L'oxygène est considéré comme une molécule indispensable à notre vie, notre survie, et à notre développement. Cet élément ayant un rôle principal au transfert des électrons mitochondriale et la production d'énergie ATP (molécules d'adénosine triphosphate) via la phosphorylation oxydative mais il peut attribuer aussi à des effets néfastes pour l'organisme par la production accrue des radicaux oxygénés libre (ROS) qui sont capable d'attaqué toutes les molécules biologiques. L'effet nocif des radicaux libres causant des dommages biologiques potentiels est appelé stress oxydatif (**Jauniaux et Burton, 2016**).

I.1.2. Définition

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, entraînant une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et / ou des dommages moléculaires (**Sies, 2020**).

Cependant, s'il y a une augmentation significative de la génération de radicaux libres (RL), ou une diminution de l'élimination de ces derniers de la cellule, un stress cellulaire oxydatif s'ensuit (**Jauniaux et Burton, 2016**). De nombreuses molécules biologiques (lipides, protéines, glucides, acides nucléiques) peuvent être « oxydées » par les radicaux libres générées lors d'un stress oxydant. (**Sharifi-Radet *al.*, 2020**). De ce fait, le stress oxydatif a été impliqué dans un certain nombre de maladies humaines (**Leyane, 2022**).

Un radical libre est défini comme toute espèce moléculaire contient un électron non apparié dans une orbitale atomique, ce qui le rend très réactif (**Taylor *et al.*, 2022**).

D'après **Poprac et ses collaborateurs, (2017)**, les radicaux libres peuvent être générés à partir de sources endogènes et/ou exogènes (Figure 1), tel que les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase (XO) et l'Oxyde nitrique synthétase (NO), le monoxyde d'azote synthase endothéliale dysfonctionnelle (eNOS), le fer et le cuivre.

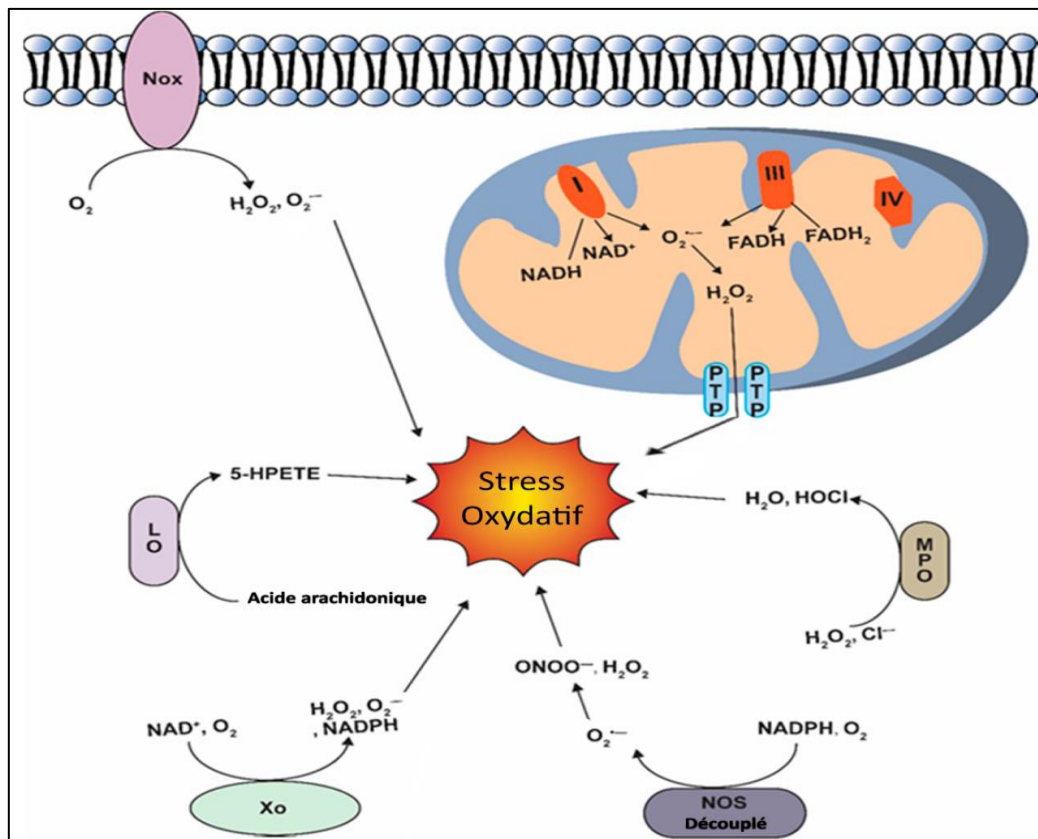


Figure 1 : Schémas des voies de production du stress oxydatif (Wang et Kang, 2020)).

I.1.3. Sources des Radicaux Libres

Les sources les plus importantes de ROS générées dans les cellules endothéliales comprennent les nicotinamide dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases (NOX), la xanthine oxydase, les mitochondries, la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et dans des cas spécifiques, les NO synthases endothéliales et le cytochrome P450 (Rochette et al., 2013 ; Ayala et al., 2014). Néanmoins, on parle de sources endogène, précédemment cités, et de sources exogènes dont la lumière UV occupe une place importante dans cette classe, elle peut soit induire une oxydation directe par l'extraction d'électrons ou d'atomes d'hydrogène, soit par transfert d'énergie à l'oxygène moléculaire (O_2) pour donner de l'oxygène singulet (1O_2) ou des radicaux (Hawkins et Davies, 2019).

I.1.4. Types des radicaux libres

Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). Il y a encore des espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des stimuli de radicaux (Figure 2) (Neha et al., 2019).

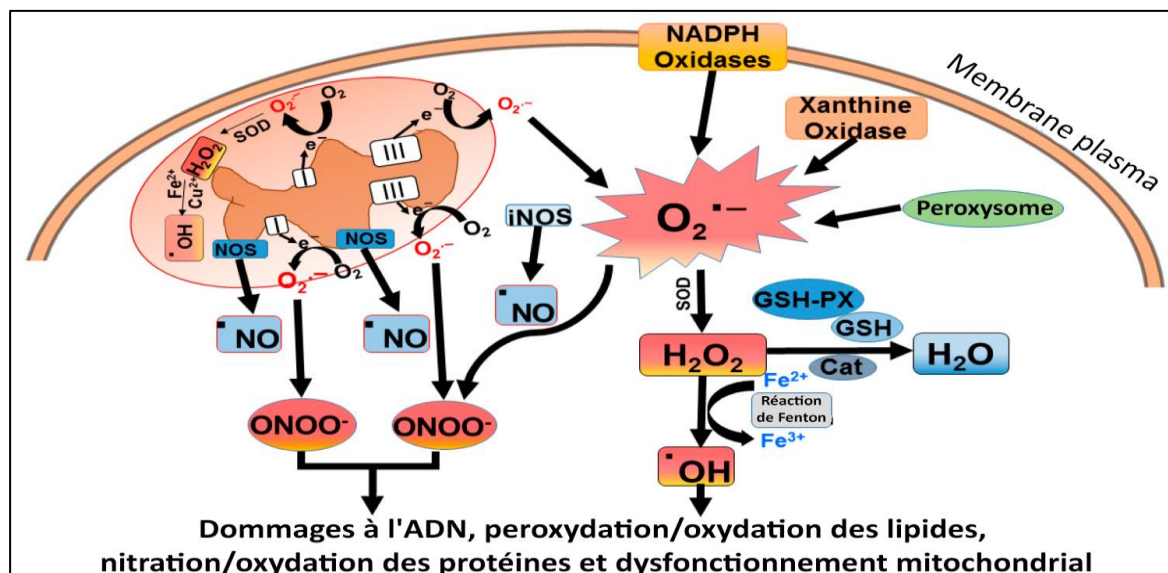
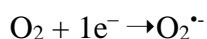
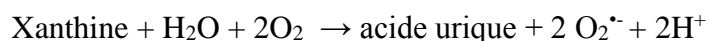


Figure 2 : Génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule (Kaushal *et al.*, 2019).

I.1.4.1. Anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

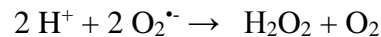
Il est généré par l'ajout d'un électron à l'oxygène moléculaire. Ce processus implique la nicotine adénine dinucléotide phosphatooxydase (NADPH) ou xanthine oxydase ou par le système de transport d'électrons mitochondrial pour produire l'adénosine triphosphate (ATP) (Winterbourn, 2020). Au cours de la transduction d'électrons le long des enzymes de la chaîne respiratoire, un petit nombre d'électrons s'échappe vers l'oxygène, en particulier, des complexes I et III ce qui forme le superoxyde qui a été impliqué dans la physiopathologie de plusieurs maladies (Carcy *et al.*, 2021). Le superoxyde n'est pas particulièrement réactif en soi, mais peut être converti catalytiquement par les superoxydase dismutases (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Wu *et al.*, 2013).



I.1.4.2. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est reconnu comme la principale espèce réactive de l'oxygène (ROS) dans la régulation du redox des activités biologiques. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est principalement produit à partir de l'oxygène moléculaire (O_2) par la NADPH oxydase et la superoxyde dismutase (SOD) via la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et de nombreuses autres enzymes (Sies et Jones, 2020). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) n'est pas un radical libre, en revanche, il est considéré comme une espèce

réactif de l'oxygène (ROS) à cause de sa capacité à provoquer la formation de ROS (Hirschenson *et al.*, 2022).

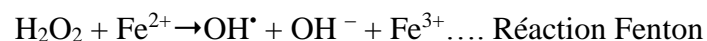
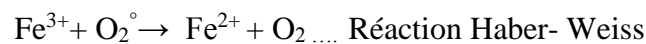


Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) diffuse à travers les membranes, les cellules et les tissus pour initier des effets cellulaires immédiats, tels que des changements de forme cellulaire, l'initiation de la prolifération et le recrutement de cellules immunitaires; c'est une molécule centrale de signalisation redox dans le stress oxydatif physiologique (Sies, 2017). En présence d'ions métalliques (Fe^{2+} , Cu^+) il se décompose en radical hydroxyle selon la réaction de fenton (Żukowski *et al.*, 2018).



I.1.4.3. Radical hydroxyle (OH^{\cdot})

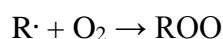
Le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) est l'un des deux principales espèces réactives de l'oxygène, il se forme dans un processus de réduction de l'oxygène en eau. Dans une succession des réactions Haber-Weiss et fenton, Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut se décomposer en radical hydroxyle (OH^{\cdot}) en présence des ions métalliques comme le Fe^{2+} ou Cu^{2+} (Hirano *et al.*, 2022).



Les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) sont des oxydants puissants qui attaquent toutes les cibles moléculaires biologiques (ADN, protéines, lipides...), donnant naissance à d'autres radicaux libres localisés sur les cibles elles-mêmes (Chatgililoglu *et al.*, 2021).

I.1.4.4. Radical peroxyde (ROO^{\cdot})

La forme la plus simple de ces radicaux est le radical hydroperoxyde (HOO^{\cdot}), il est considéré comme une cause de la peroxydation des acides gras. Ils peuvent déclencher des réactions en chaîne de peroxydation lipidique en extrayant un atome d'hydrogène d'un carbone de méthylène à chaîne latérale. Le radical lipidique entré en réaction avec l'oxygène pour produire un radical peroxyde (ROO^{\cdot}) (Guo *et al.*, 2021).



La détection et la mesure de la peroxydation lipidique sont le plus souvent citées comme preuves dans les maladies humaines et la toxicologie. Les radicaux peroxyde sont impliqués dans le clivage de l'ADN et la modification du squelette protéique (Guo et al., 2021).

I.1.4.5. Radical oxyde nitrique (NO[•])

L'oxyde nitrique (NO[•]) est un gaz qui est produit dans le corps par une famille de trois NO synthases (NOS). Les enzymes utilisent l'oxygène et la L-arginine pour produire du NO et de la L citrulline via une réaction oxydative (Yu et al., 2019). Ils sont soluble dans les milieux aqueux et lipidiques, a ce fait, il diffuse facilement à travers le cytoplasme et les membranes plasmiques. Le (NO[•]) a des effets sur la transmission neuronale ainsi que sur la plasticité synaptique du système nerveux central. Ce radical libre peut produire des radicaux hydroxyle et des radicaux de dioxyde d'azote (Wu et al., 2013).

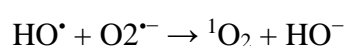
L'oxyde nitrique (NO[•]) réagit lentement avec la plupart des cibles biologiques, ce qui correspond à son rôle de molécule de signalisation (Hawkins et Davies, 2019). Au cours des processus inflammatoire, les cellules du système immunitaire produisent à la fois l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et l'oxyde nitrique (NO); Dans ces conditions, le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde (O₂^{•-}) peuvent réagir ensemble et donner naissance à des quantités significatives d'une molécule beaucoup plus active sur le plan oxydatif, l'anion peroxydrite (ONOO^{•-}) (Winterbourn, 2020).

I.1.4.6. Peroxydrite (ONOO^{•-})

Une génération excessive de superoxyde (O₂^{•-}) peut entraîner des interactions avec l'oxyde nitrique (NO) et donner du peroxydrite (ONOO^{•-}), qui est un puissant pro-oxydant pouvant provoquer la fragmentation de l'ADN et l'oxydation des lipides (Winterbourn, 2020).

I.1.4.7. Oxygène singulet (¹O₂)

L'oxygène singulet (¹O₂) est principalement produit à cause d'une exposition à des rayons lumineux, Il peut être produit également par voie chimiques et enzymatiques. Il est possible que l'oxygène singulet (¹O₂) soit partie d'un processus similaire à la réaction de Fenton ; ainsi la réaction entre le radical superoxyde (O₂^{•-}) et le radical hydroxyle (OH[•]) peut produire l'oxygène singulet (¹O₂) (Sjöberg, 2013). l'oxygène singulet (¹O₂) provoque des dommages dans l'organisme par interaction avec les cellules (Frochot et al., 2019).



I.1.4.8. Hypochlorite (ClO)

L'acide hypochloreux (HOCl) est produit par la réaction *in vivo* de la myéloperoxydase (MPO) entre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les ions chlorure. En tant qu'espèces réactives de l'oxygène (ROS) très importantes, l'acide hypochloreux (HOCl)/hypochlorite (OCl⁻) joue un rôle important dans divers processus physiologiques et pathologiques. Cependant, une production excessive ou mal placée de HOCl/OCl⁻ peut entraîner une variété de lésions tissulaires et de maladies humaines (Song et al., 2021).

I.1.5. Marqueurs biologiques de stress

La perturbation de l'homéostasie redox est un phénotype clé de nombreuses conditions pathologiques. Bien que, de multiples composés oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène soient largement reconnus comme médiateurs et inducteurs du stress oxydatif (Gaschler et stockwell, 2017).

I.1.5.1. Peroxydation lipidique

Les lipides contrôlent l'état physiologique des organites membranaire, ils jouent également un rôle clé dans la signalisation. La peroxydation des lipides insaturés résulte des produits d'oxydation primaires comme les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) et des produits secondaires sont aldéhydes, parmi les différents aldéhydes qui peuvent être formés lors de la peroxydation lipidique, la malondialdéhyde (MDA), le propanal, l'hexanal et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) (Ayala et al., 2014).

D'après Ayala et ses collaborateurs, (2014) les deux ERO les plus répandus qui peuvent affecter profondément les lipides sont principalement le radical hydroxyle (HO[•]) et l'hydroperoxyde (HOO[•]). L'oxydation excessive des lipides altère les propriétés physiques des membranes cellulaires et peut provoquer une modification covalente des protéines et des acides nucléiques (Gaschler et stockwell, 2017).

I.1.5.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont des cibles majeures pour les dommages oxydatifs. La majorité des réactions radicalaires avec les protéines se produisent par trois voies principales: l'extraction d'atomes d'hydrogène à partir de liaisons C-H, S-H, N-H ou O-H, l'abstraction d'électrons à partir de sites riches en électrons et l'addition à des centres riches en électrons (Hawkins et Davies, 2019). Le mécanisme d'oxydation des protéines décrit par Stadman, (2006), montre que l'oxydation des protéines par voie radicalaire contribue à la fragmentation de la chaîne

polypeptidique, à l'oxydation des chaînes latérales d'acides aminés et à la génération de liaisons croisées protéine-protéine.

I.1.5.3. Oxydation de l'ADN

L'ADN peut être attaqué principalement par les radicaux hydroxyles (OH°), et divers produits peuvent être générés (**Lee et Kang, 2019**). **Wu et ses collaborateurs, (2013)** indiquent que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) perturbent le maintien de l'état normal des nucléotides d'adénine et de pyridine, affectant ainsi la viabilité de l'ADN, introduisant des mutations et altérant l'expression des gènes.

L'intégrité du génome est menacée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) formées dans les cellules vivantes en tant que sous-produits métaboliques. Les réactions d'oxydation finissent par produire plusieurs lésions d'ADN non volumineuses (oxydations de base purine/pyrimidine) et volumineuses (réticulations, ruptures de brins et bases cycliques). Ces lésions peuvent interférer avec les métabolismes essentiels de l'ADN, y compris la transcription, la recombinaison et la réplication, ce qui peut finalement donner lieu à des résultats défavorables comme la sénescence cellulaire et la mutagénèse (**Lee et Kang, 2019**).

I.1.5.4. Myéloperoxydase

La myéloperoxydase (MPO) est un élément du système immunitaire, et est libérée par les neutrophiles, pour fournir une défense contre les agents pathogènes. Lors de l'activation des neutrophiles, la fusion des lysosomes avec les phagosomes entraîne la libération de (MPO); cependant, l'assemblage du complexe NADPH oxydase sur la surface de la membrane interne entraîne la production d'anions superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), qui se dismutent rapidement pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La MPO catalyse la réaction de H_2O_2 avec les ions chlorure (Cl^-) pour former de l'acide hypochloreux (HOCl), agent puissamment oxydant (**Davies et Hawkins, 2020**).

I.2. Activité antioxydante

I.2.1. Généralités

De manière générale, les tissus possèdent des systèmes de défense antioxydants endogènes de type non enzymatique (glutathion, bilirubine et coenzyme Q10...etc.) et de type enzymatique le Superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px...). Ces molécules assurent la scission de la réaction en chaîne auto-oxydante, la conversion des espèces radicalaires en espèces non radicalaires ou moins toxiques et diminuent

les concentrations localisées en oxygène. Cependant, sous la pression d'une grande variété de facteurs perturbateurs de l'homéostasie cellulaire, allant des conditions de stress métaboliques et mentales, au mode de vie, à l'alimentation et aux conditions de vieillissement, les maladies endogènes, les antioxydantes peuvent s'avérer insuffisants pour neutraliser la génération des espèces réactif d'oxygène (ROS) et, par conséquent, nécessitent des systèmes de défense antioxydants exogènes de type végétale pour maintenir des fonctions cellulaires optimales (Figure 3). Parmi les antioxydants naturels, les métabolites secondaires et primaires présents dans les plantes aromatiques et médicinales ont montré un puissant potentiel antioxydant (Kamal et al., 2022).

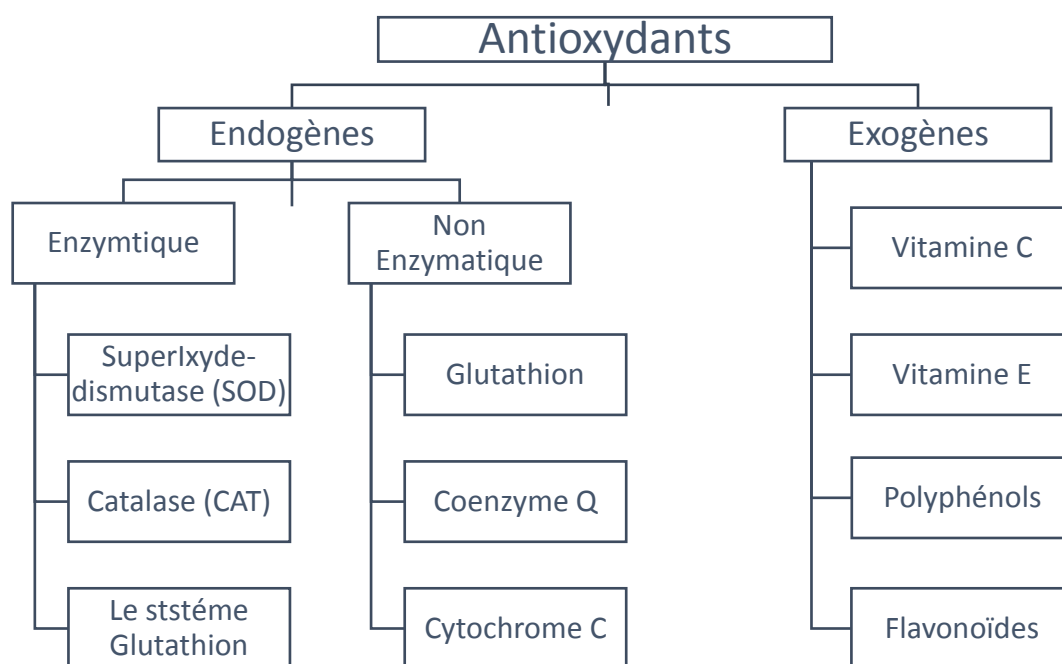


Figure 3 : Systèmes de défense contre le stress oxydant (Kamal et al., 2022).

I.2.2. Définition

Les antioxydants apparaissent aujourd'hui comme les clés de la longévité et nos alliés dans la lutte contre les maladies modernes. Ce sont des éléments protecteurs qui ont une extrême variété de structures et d'activités biologiques et agissent comme des piègeurs de radicaux libres capables d'empêcher ou de ralentir l'oxydation d'autres molécules (Bita et al., 2022).

I.2.3. Niveaux d'action des antioxydants

Selon Ighodaro et Akinloye, (2018), Les molécules antioxydantes constituent l'agent grille de défense dans les systèmes vivants, agissent à différents niveaux, à savoir préventif, et réparateurs de dommages induits par les radicaux. Ils peuvent être classés en 4 lignes :

Antioxydants de défense de première ligne : comme le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX). Ces enzymes décomposent les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes en molécules inoffensives (H_2O_2 /alcool et O_2).

Antioxydants de défense de deuxième ligne : comme l'acide ascorbique, l'acide urique, le glutathion, alpha tocophérol (vitamine E) et l'ubiquinol appartiennent à cette catégorie.

Antioxydants de troisième ligne de défense : représente les systèmes de réparation de l'ADN (polymérase, glycosylases et nucléases), les enzymes protéolytiques (protéinases, protéases et peptidases).

Antioxydants de défense de quatrième ligne : Le signal généré par le radical libre formé induit la formation et le transport d'un antioxydant au bon site (**Ighodaro et Akinloye, 2018**).

CHAPITRE II

Pseudevernia furfuracea

I. *Pseudevernia furfuracea*

I.1. Généralités

Les lichens sont des organismes autosuffisants qui constituent une relation symbiotique entre un champignon hétérotrophe et des algues autotrophes et/ou des cyanobactéries. En raison de l'absence de système racinaire et de cuticules protectrices, ils sont particulièrement sensibles à divers polluants et substances toxiques (**Chowaniec et Rola., 2022**). Selon **Yavuz, (2018)**, les lichens sont des organismes uniques d'une association symbiotique entre des partenaires fongiques (mycobiontes) et des algues photo-autotrophes (photobiontes). Selon **Phinney et ses collaborateurs, (2021)**, les lichens se reproduisent à la fois sexuellement et clonales. *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf est une espèce épiphyte cosmopolite. Elle est couramment utilisée comme bio moniteur des éléments traces en suspension dans l'air et d'autres polluants et largement utilisé dans les études de bio indication évaluant le degré de pollution environnementale en fonction des changements de son état physiologique (**Chowaniec et Rola, 2022**). *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf appartient à la famille des *Parmeliaceae* (**Sarikurkcu et al., 2016**). Est représentée par deux races, *Pseudevernia var. furfuracea* contenant l'acide physodique, l'atranorine et la chloroatranorine comme principaux métabolites (**Mitrović et al., 2014**), et *Pseudevernia var. ceratea* contenant l'acide olivétorique, atranorine et chloroatranorine (**Mitrović et al., 2014**).

I.2. Morphologie et anatomie

P. furfuracea (L.) Zopf possède un thalle fruticuleux mesurant 8 cm de hauteur présentant sous forme de bandes ramifiées de manière dichotomique (Figure 4 A). La face supérieure grise avec des isidies cylindriques, la face inférieure blanche avec des taches noires (Figure 4 C). Le cortex supérieur jaune mesure 16 µm avec une couche gonidiale mesurant 43 µm, et le cortex inférieur jaune mesurant 16 µm (Figure 4 D) (**Aoussar et al., 2017**).

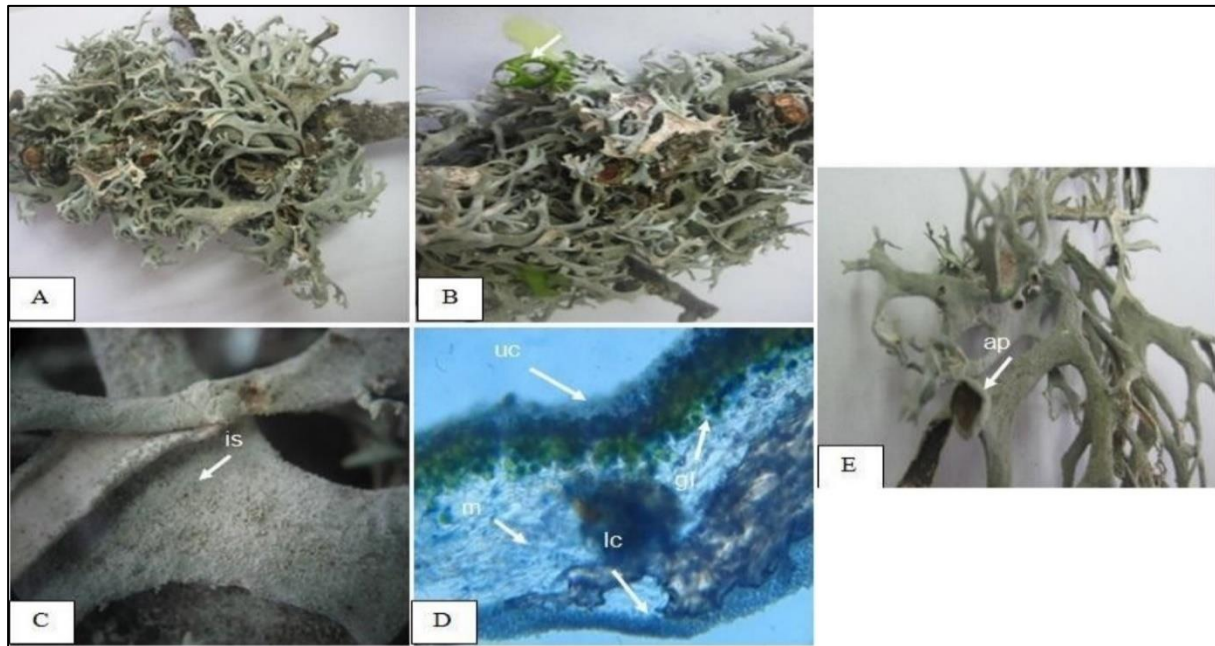


Figure 4 : *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf (Aoussar, 2017).

A : Thalle attaché au cèdre. B : Effet du KOH sur le thalle. C : Thalle montrant les isidies (est). D : Coupe transversale du thalle montrant les caractéristiques anatomiques. Cortex supérieur (uc), couche gonidiale (gl), medulla (m), cortex inférieur (lc). E : Thalle montrant l'apothécie (ap).

I.3. Usage traditionnel de *Pseudevernia furfuracea*

P. furfuracea est traditionnellement utilisée en Turquie dans le traitement des plaies, de l'eczéma et des hémorroïdes à cause de sa richesse en acide usnique, comme épices et dans les préparations alimentaires (Kalra et al., 2021). Elle a été utilisée comme diurétique pour le traitement de la lithiase rénale (*Ramalina bourgeana*), les traitements des affections hépatiques (*Peltigera canina*), des troubles menstruels (*Xanthoria parietina*), comme antiseptique (*Usnea barbata*) contre les affections respiratoires et les maladies pulmonaires (Aoussar et al., 2020). Les lichens ont été largement utilisés dans la médecine traditionnelle comme laxatifs et antiémétiques, ce qui renforce leur application dans le traitement des troubles gastro-intestinaux. Les lichens synthétisent une multitude de métabolites secondaires aux activités biologiques diverses. En outre, une étude a montré que des extraits d'espèces de lichens obtenus dans différentes régions de Serbie ont un potentiel antioxydant, antimicrobien et antiprolifératif. *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf a démontré un effet cytotoxique (dans l'extrait d'acétone) sur les lignées cellulaires FemX (mélanome humain) et LS174 (carcinome du côlon humain) (Šeklić et al., 2018).

I.4. Molécules bioactives de *Pseudevernia furfuracea*

L'extrait de *Pseudevernia furfuracea* est riche en composés phénoliques et flavonoïdes. L'extrait de la plante est connu être riche en kaempférol, hespéridine, ériodictyol, acide

gallique, acide protocatéchique, acide syringique, vanilline, acide férulique, acide p-hydroxybenzoïque et l'acide caféique en faible quantité. De plus l'extrait aqueux est riche en hespéridine, acides caféique et p-hydroxybenzoïque (Sarikurkcu et al., 2016).

Plusieurs recherches ont prouvé la présence de l'acide atrarique, de l'atranorine, chloroatranorine, l'acide olivétorique, le méthylhematommate, le méthylchlorohematommate, acide absisique, les polyamines (putrescine et spermidine), l'acide physodique, l'acide oxyphysodique et le virensique et l'acide furfurique (Mitrović et al., 2014 ; Sarikurkcu et al., 2016 ; Emsen et al., 2018 et Şahin et al., 2021).

Deux composés majoritaires chez *Pseudevernia furfuracea* ont été élucidés, à savoir les depsides qui contiennent deux ou parfois trois cycles aromatiques dérivés d'orcinol ou de β -orcinol reliés par des liaisons ester, et les depsidones qui ont une liaison éther supplémentaire entre les anneaux (Figure 5) (Singh et al., 2021).

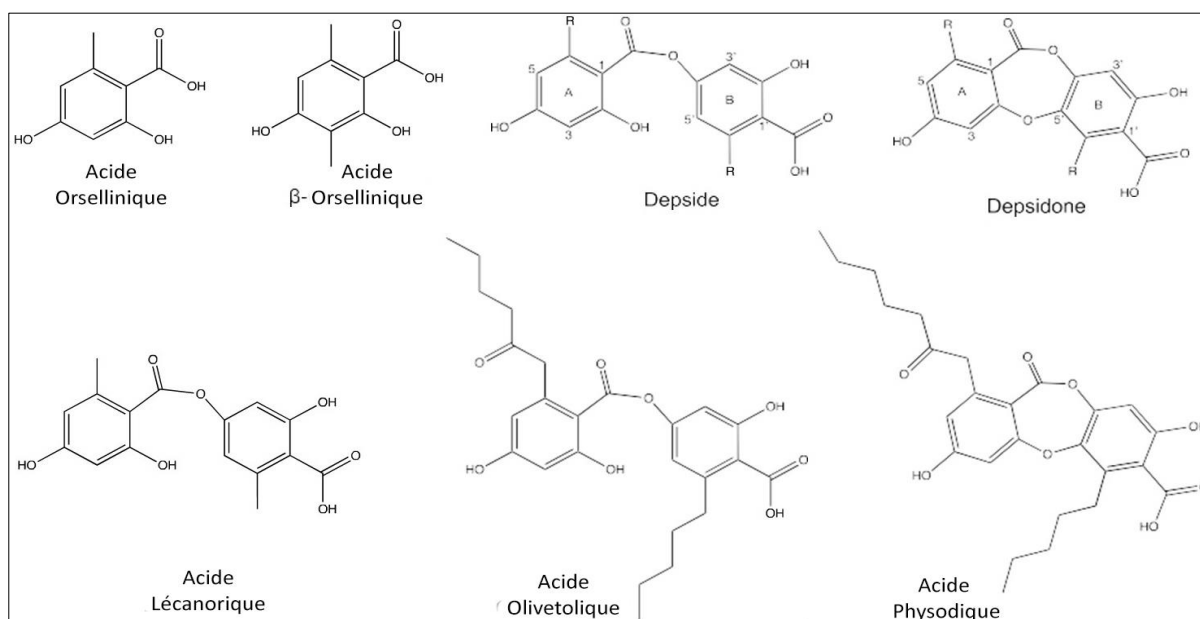


Figure 5 : Structures chimiques et nomenclature (Singh et al., 2021).

Rangée du haut : précurseurs monocycliques et structures génériques de depsides et depsidones ; les lettres et les chiffres s'appliquent à toutes les depsides et depsidones. Rangée du bas : les principaux de ses composés.

I.5. *P.furfuracea* comme bio-indicateur

Selon Topal et ses collaborateurs, (2021), Les lichens peuvent être contaminés par des éléments toxiques qui atteignent l'environnement. La consommation de lichens contaminés par des éléments toxiques/nocifs entraîne des risques potentiels pour la santé humaine. Par conséquent, il est très important de déterminer les risques potentiels pour la santé des lichens comestibles contenant des éléments toxiques pour les humains. Les risques potentiels pour la santé humaine de certains éléments toxiques/nocifs liés à la consommation de *Pseudevernia*

furfuracea (L.) Zopf ont été enquêtés. Les éléments toxiques (cadmium (Cd), chrome (Cr), cuivre (Cu), plomb (Pb), manganèse (Mn), nickel (Ni) et zinc (Zn) ont été déterminés chez *P. furfuracea*. Les éléments potentiellement toxiques ont une toxicité à la fois pour les humains et les animaux et ont tendance à se bio-accumuler. Par conséquent, la pollution de l'environnement à cause de ces éléments est une préoccupation mondiale. Les humains sont exposés à des éléments potentiellement toxiques de différentes manières (contact cutané, inhalation, ingestion et consommation d'aliments pollués). Cette situation entraîne des impacts défavorables sur la santé humaine. Une exposition à long terme à des concentrations élevées de nickel (Ni) peut causer des problèmes (p. ex. cancer du poumon). La consommation excessive de plomb (Pb) peut avoir des effets négatifs sur les systèmes nerveux, immunitaire et endocrinien. L'empoisonnement au plomb, qui est l'un des principaux risques pour la santé, représente 0,6 % de la charge mondiale de morbidité. L'exposition au plomb a représenté 1,06 million de décès et 24,4 millions d'années de vie ajustées sur l'incapacité. L'exposition chronique au chrome (Cr) est liée au cancer et à l'atrophie de la cloison nasale. Une exposition prolongée à des concentrations élevées de Cr, de zinc (Zn) et de cuivre (Cu) peut entraîner une détérioration de la fertilité, de la fonction hépatique et du cholestérol. Cadmium (Cd) en raison de sa longue demi-vie (15–30 ans) et ses effets délétères multifformes (par exemple, effets squelettiques, tératogènes, hépatotoxiques, cancérigènes, néphrotoxiques et reproductifs) sur la santé humaine est l'un des métaux lourds les plus toxiques.

I.6. Propriétés biologiques de « *Pseudevernia furfuracea* »

I.6.1. Activité anti-oxydante

La surproduction de ROS au-delà de la capacité antioxydante des systèmes biologiques conduit à un stress oxydatif impliqué dans l'apparition de nombreuses maladies dont les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde, ou des troubles neurologiques comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. Pour échapper aux conséquences du stress oxydatif, le rétablissement de l'équilibre oxydant/antioxydant est important pour préserver les performances physiologiques de l'organisme par l'utilisation de composés extraites de plantes dont *P.furfuracea* (Aoussar et al., 2017).

Les travaux d'Aoussar et ses collaborateurs, (2021), ont rapportés le potentiel antioxydant de *Pseudevernia furfuracea*, en déterminant la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes et la capacité à piéger les radicaux libres. L'extrait de *Pseudevernia furfuracea* a montré l'effet le plus fort et la teneur en composés phénoliques la plus élevée. L'extrait est probablement responsable de l'activité antioxydante, en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres par

le transfert de l'atome d'hydrogène et d'un électron du groupe hydroxyle présent dans leur structure.

I.6.2. Activité anti-tumoral

I.6.2.1. Activité anti-angiogénique

L'angiogenèse étant impliquée dans la progression et la métastase de divers cancers, elle représente une autre cible thérapeutique importante dans des recherches rapportées par **Petrova et ses collaborateurs, (2021)**, les résultats de leur étude ont pour la première fois démontrée que l'extrait de *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf et l'un de ses métabolites, l'acide physodique, module le microenvironnement tumoral (MET). Les résultats ont montré que l'extrait régule le MET d'une façon plus prononcée que l'acide physodique seul. De plus, les composés testés ont pu moduler le MET à de très faibles concentrations (IC10), ce qui permet de préserver la viabilité cellulaire des lignées cellulaires testées. De plus, *P. furfuracea* modifié le processus d'angiogenèse, comme le confirme le test CAM. Cette étude a clairement démontré un rôle anti-angiogénique de *PSE* qui a été indiqué par la densité des vaisseaux, la longueur totale du réseau vasculaire et le nombre total de points de ramification.

I.6.2.2. Effet contre le cancer colorectal

Pseudevernia furfuracea a démontré des effets cytotoxiques, pro-apoptotiques, prooxydants et anti migratoires pertinents sur les cellules cancéreuses colorectales (*HCT-116* et *SW-480*), et sur les lignées cellulaires *MRC-5* normales. D'autre part, l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. furfuracea* a montré la plus forte activité anti-tumorale par rapport à d'autres extraits. Dans ces travaux ont pu élucider les facteurs liés à ces activités au sein de *P. furfuracea* et d'expliquer les mécanismes moléculaires de leur action (**Šeklić et al., 2018**).

I.6.2.3. Effet contre le cancer hépatique

L'utilisation des plantes médicinales et des métabolites secondaires augmente dans le traitement de nombreuses maladies telles que le carcinome hépatocellulaire (CHC), l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde. Le stress oxydatif contribue au développement du cancer du foie et la promotion des systèmes antioxydants pourrait fournir de meilleures informations pour le traitement. Dans la présente étude, le potentiel antioxydant des espèces de lichens *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf a été étudié. En outre, les effets des principaux métabolites secondaires, l'acide olivétorique (AO) et l'acide physodique (AP), qui ont été isolés de *P. furfuracea*, sur les expressions géniques hépatiques des enzymes

antioxydantes, ont été évalués chez des humains cancéreux (*HepG2*) et sains (*THLE2*). Cellules hépatiques. Selon les résultats, *P. furfuracea* a non seulement un potentiel antioxydant élevé, mais que ses métabolites secondaires (l'acide olivétorique (AO) et l'acide physodique (AP), pourraient également réduire le stress oxydatif dans les cellules cancéreuses en régulant à la hausse les enzymes antioxydantes, ce qui empêcherait l'oncogenèse et la progression tumorale du cancer du foie (**Şahin et al., 2021**).

I.6.2.4. Activité anti-leucémique

L'extrait du lichen *Pseudevernia furfuracea* (*L.*) Zopf (*PSE*) a été étudié pour son effet anti leucémique, plus particulièrement l'effet de l'acide physodique isolé (Phy). Il a été démontré pour la première fois que le traitement par *P. furfuracea* (*PSE*) et l'acide physodique (Phy) induit l'apoptose dans les cellules Jurkat (modèle *in vitro* de LAL : La lignée cellulaire de leucémie lymphoblastique T humaine Jurkat (*ATCC, Manassas, VA, USA*) d'une manière dépendante de la dose et du temps. Il a été confirmé que la production des ROS et les dommages de l'ADN qui en résultent jouent un rôle éminent dans l'apoptose médiée par *P. furfuracea* (*PSE*) et l'acide physodique (Phy). De plus, le mécanisme de réparation de l'ADN, y compris la phosphorylation des protéines ATM, HA2.X et SMC1, a ensuite été activé, suivi de l'activation de p21, p53, p27 et de l'arrêt du cycle cellulaire. Le traitement par *P. furfuracea* (*PSE*) et l'acide physodique (Phy) a conduit à la phosphorylation de la signalisation MAPK, y compris p38 MAPK, JNK et PI3K/Akt. De plus, une cytotoxicité nulle dans les lymphocytes périphériques normaux a été enregistrée, ce qui encourage l'utilisation de *P. furfuracea* (*PSE*) et de l'acide physodique (Phy) comme agents anti-leucémiques (**Kello et al., 2021**).

I.6.3. Activité anti-génotoxique

Des travaux menés par **Emsen et ses collaborateurs, (2018)** visent à évaluer les efficacités de l'acide olivétorique (AO) et de l'acide physodique (AP) isolés de *Pseudevernia furfuracea* (*L.*) Zopf dans les lymphocytes humaines (LH) *in vitro* ont été effectués. Il a été montré que des concentrations élevées d'acide olivétorique (AO) et de l'acide physodique (AP) induisent une toxicité chez les cellules HL, principalement par induction de stress oxydatif et de génotoxicité. D'après les résultats obtenus, il a été supposé que les applications d'acide olivétorique (AO) et d'acide physodique (AP) peuvent augmenter l'activité antioxydant total (TAC) chez les cellules HL sans aucun effet cytotoxique et génotoxique.

I.6.4. Activité antimicrobienne et anti-biofilm

La forte activité antimicrobienne et anti biofilm des extraits de *Pseudevernia furfuracea* pourrait être attribuée à ses métabolites spécifiques ayant des actions antimicrobiennes. Ils affectent des cibles spécifiques sur une cellule microbienne, y compris la paroi cellulaire, la membrane cellulaire, les enzymes métaboliques, la synthèse des protéines et les systèmes génétiques provoquant l'inhibition ou l'inactivation des micro-organismes. Les principaux métabolites de *Pseudevernia furfuracea* tels que : l'acide 3-hydroxyphysodalique, l'acide physodalique, l'acide physodique, l'acide olivetorique, l'atranorine, la chloroatranorine, l'acide orselinique et l'orselinate de méthyle ont été testé sur plusieurs souches bactériennes et ils ont tous montré un effet antimicrobien prometteur (Mitrović et al., 2014).

Une étude antérieure rapporté par Assouar et ses collaborateurs, (2020) évalue l'activité antibactérienne par la méthode de microdilution contre des isolats cliniques de *S. aureus* résistant à la méthicilline, a montré que l'activité antibactérienne de l'extrait de *P. furfuracea* présente un puissant effet antibactérien par rapport aux bactéries Gram-positives.

I.6.5. Activité inhibitrice des enzymes

Les activités inhibitrices enzymatiques in vitro de *Pseudevernia furfuracea* (L) Zopf ont été évaluées pour différentes maladies telles que le vieillissement, l'hyperpigmentation et le diabète. Les extraits ont montré une faible activité inhibitrice sur les cholinestérases, l'extrait aqueux a présenté l'activité inhibitrice de la tyrosinase la plus élevée. Tandis que l'extrait de méthanol avait une plus grande activité inhibitrice dans les dosages de l' α -amylase et de l' α -glucosidase. L'extrait au méthanol était riche à la fois en composés phénoliques et en flavonoïdes. L'extrait methanolique contenait également des quantités considérables de kaempférol et d'hespéridine. L'activité inhibitrice de *P. furfuracea* sur les cholinestérases, la tyrosinase, l' α -amylase et l' α -glucosidase n'a pas encore été rapportée par d'autres auteurs pour pouvoir comparer leur effets (Sarikurkcu et al., 2016).

I.6.5.1. Effet anti-Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neuro-dégénérative qui se développe progressivement. L'insuffisance cognitive et la perte de mémoire sont les principaux symptômes de cette maladie. Les cholinestérases ont un effet significatif sur le système nerveux. Suite à la dégradation de l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase (AChE) met fin à l'action de signalisation. La butyrylcholinestérase (BChE) joue également un rôle important dans le métabolisme des peptides neuroactifs. La dégradation métabolique de l'acétylcholine

favorise la progression de la MA, tandis que les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) peuvent empêcher la progression de cette maladie. Dans une étude, les activités inhibitrices des extraits organiques et aqueux de *P. furfuracea* ont été testés sur l'acétylcholinestérase (AChE), la butyrylcholinestérase (BChE), les extraits n'ont montré aucune activité inhibitrice sur la butyrylcholinestérase (BChE), d'autre part une faible inhibition de l'acétylcholinestérase a été enregistré (**Sarikurkcu et al., 2016**).

I.6.5.2. Anti-hyperpigmentation

Les mélanocytes sont situés dans la couche basale de la peau humaine. La mélanine, qui est sécrétée par ces cellules, peut être surproduite suite à une exposition excessive au soleil ou à des maladies d'hyperpigmentation. La synthèse de cette molécule est catalysée par la tyrosinase dans les mélanocytes. Les molécules ayant un effet inhibiteur de la tyrosinase sont importantes dans l'industrie cosmétique pour leurs effets de blanchiment de la peau. Au cours de la dernière décennie, des dizaines de composés phytochimiques ont été signalés comme ayant une activité inhibitrice de la tyrosinase. Les activités inhibitrices des extraits ont été testés sur la tyrosinase, et les auteurs ont rapporté les effets inhibiteurs des composés isolés de *P. furfuracea* sur la trypsine. L'acide p-hydroxybenzoïque, ont été identifiés comme les inhibiteurs de tyrosinase les plus actifs. De plus, l'acide p-hydroxybenzoïque a également été identifié comme inhibiteurs compétitifs de la diphenolase de la tyrosinase de champignon (**Sarikurkcu et al., 2016**).

I.6.5.3. Effet anti-diabétique

L' α -amylase et l' α -glucosidase sont les principales enzymes digestives jouant un rôle crucial dans le métabolisme des glucides. Il a été démontré que ces enzymes sont associées au diabète de type 2 et à la peroxydation des lipides dans les tissus. Les composés ayant des effets inhibiteurs sur ces enzymes peuvent inhiber la digestion des glucides. Le taux de glucose sanguin des patients diabétiques et/ou obèses peut être réduit par les inhibiteurs de l' α -amylase et de l' α -glucosidase. **Sarikurkcu et ses collaborateurs, (2016)** ont étudiés l'effet inhibiteurs sur les enzymes clés de diabète, les activités inhibitrices des extraits de *P. furfuracea* ont été testés sur l' α -amylase et l' α -glucosidase. Les résultats ont montré que l'extrait exhibe un effet inhibiteur sur les deux enzymes d'une manière significatif (**Sarikurkcu et al., 2016**).

I.6.6. Activité anti-inflammatoire et anti-nociceptive

Dans une étude menée par **Güvenç et ses collaborateurs, (2012)**, l'extrait de *P. furfuracea* a été évalué pour son effet anti inflammatoire induit par la carraghénane et pour son

activité anti-nociceptive induite par la p-benzoquinone chez des souris. Les résultats ont révélé que l'extrait exerce un effet anti-inflammatoire et anti-nociceptif significative chez la souris sans induire de lésion gastrique. L'œdème induit par la carraghénane résulte de l'activation du système kinine, de l'accumulation de neutrophiles et de la libération de plusieurs médiateurs tels que les prostanoïdes et les cytokines. Les amines mastocytaires jouent un rôle mineur dans cette réaction inflammatoire. Les esters de phorbol (constituants de *P. furfuracea*), modifient la production de cytokines pro-inflammatoires, induisent l'infiltration de neutrophiles dans l'épiderme et l'activation de la COX-2. Par conséquent, les résultats de cette étude montrent que les activités anti-inflammatoires, anti-nociceptives et cicatrisantes des extraits de *Pseudevernia furfuracea* peuvent agir par le même mécanisme (Güvenç et al., 2012).

PARTIE
PRATIQUE

I. Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Récolte

Les feuilles et l'écorce de *Pseudevernia furfuracea* (Figure 6) ont été récoltées au mois de Mars de l'année 2022, dans un lieu isolé et loin de toute pollution, situé dans le désert Algérien, commune d'Oued Souf, localisée au Nord-est de la Wilaya d'Oued. Les échantillons de feuilles et d'écorce (Figure 6) ont été nettoyés puis séchés à température ambiante dans un endroit aéré et ombragé afin d'assurer une meilleure conservation des différents composés.



Figure 6 : Photographie originale de *Pseudevernia furfuracea*.

I.1.2. Broyage et tamisage

Les feuilles et l'écorce séchée sont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les poudres obtenues ont été tamisées à l'aide d'un tamis de 125 μ m puis de 63 μ m afin de récupérer une poudre de granulométrie inférieure à 63 μ m (Figure 7).



Figure 7 : Poudre de *Pseudevernia furfuracea*

I.2. Extraction

Le protocole d'extraction utilisé dans cette étude est celui décrit par **Dary et ses collaborateurs, (2022)** avec quelques modifications.

I.2.1. Procédure expérimentale

20 g de la poudre d'écorce de *Pseudevernia furfuracea* a été macéré dans de 200 ml de vinaigre préparé naturellement (9% d'acide acétique) avec un rapport de (1g / 10ml) sous agitation et à l'ombre dans des flacons scellés par un ultra-son de type (*RK 1028*) ayant des capacités suivantes : 230v/50 kHz et 300-1200 W, pendant : extrait 1 (15 minutes), extrait 2 (30 minutes), et l'extrait 3 (1 heure) (Figure 8).



Figure 8 : Macération des extraits : 15 minutes, 30 minutes et 1 heure.

Le macérât est décanté est ensuite filtré. Le filtrat récupéré est soumis à une température de 40C° à l'étuve jusqu'à l'élimination de l'acide acétique (Figure 9).



Figure 9 : Filtration des extraits et l'élimination du vinaigre

L'extrait est obtenu au fond de la boîte de pétrie sous forme d'extrait sec (Figure 10).



Figure 10 : Extraits secs de : 15 minutes, 30 minutes et de 1 heure sous forme sec.

Le taux d'extraction de chaque extrait est calculé comme suit :

$$(\%) = [(P1 - P0)/E] * 100$$

P1 : Poids d'extrait après évaporation (g).

P0 : Poids vide du cristalliseur ou la boîte de pétri (g).

E : Poids de la poudre ou de l'extrait sec de la phase précédente (g).

I.3. Screening chimique

I.3.1. Dosage des phénols totaux

La teneur totale en phénol a été déterminée par la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu avec quelque modification par **Amzad Hossain et ses collaborateurs, (2013)**.

I.3.1.1 Principe

Le réactif est constitué d'un mélange Folin-Ciocalteu et du carbonate de sodium (Na_2CO_3), Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange oxydé de coloration bleutée. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de poly phénols présents dans les extraits végétaux.

I.3.1.2. Procédure expérimentale

Un volume de 200 μl d'extrait (1 mg/ml de méthanol) a été mélangé avec 1.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10%), puis a été conservé à l'obscurité pendant 5 min. Enfin, du carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 5 % (1,5 ml) a été ajouté. Par la suite le mélange réactionnel a été maintenu à l'obscurité pendant 2 h. L'acide gallique a été préparé pour la réalisation de la courbe d'étalonnage à des concentrations de (400, 200, 100, 50, 25 et 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). L'absorbance a été mesurée à 750 nm à l'aide de spectrophotomètre UV-visible. ANAL YTIK (264v/50-60 Hz, Germany).

I.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon la méthode de **Maksimović et ses collaborateurs, (2005)**. En utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3).

I.3.2.1. Principe

Le principe du dosage est basé sur la capacité des flavonoïdes à chélater le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et former un complexe de coloration jaunâtre.

I.3.2.2. Procédure expérimentale

Un volume de 2 ml d'extrait (1 mg/ml du méthanol) a été mélangé avec 1 ml d'une solution contenant l' AlCl_3 (1,33 mg/ml) et l'acétate sodium (4 mg/ml). Le mélange réactionnel a été incubé à l'obscurité pendant 10 min. La quercétine a été préparée à des concentrations de (25, 12.5, 6.25, 3.125 et 1.56 $\mu\text{g/mL}$). L'absorbance a été mesurée à 750 nm.

I.4. Evaluation de l'activité Anti-oxydante

I.4.1. Test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

I.4.1.1. Principe

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été utilisé pour mesurer l'activité anti oxydante des composés capables de transférer des atomes d'hydrogène (**Yeo et Shahidi, 2019**).

I.4.1.2. Procédure expérimentale

Pour étudier l'activité anti-radicalaire du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) , nous avons opté pour la méthode décrite par **Khia et ses collaborateurs, (2019)**. 2.8 ml de la solution du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (2.8 g/100 ml d'éthanol) ont été ajoutés à 200 μl de chaque extrait à différentes concentrations (1; 0,5 ; 0,25 mg/ml), contre un control contenant seulement 2.8 ml du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). L'acide ascorbique a également été préparée dans les mêmes conditions et a été utilisé comme standard à différentes concentrations : (400, 200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$). La lecture est faite à 515 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$I(\%) = [A_1 - A_2 / A_1] \times 100$$

A₁ : Absorbance du control.

A₂ : Absorbance en présence de l'extrait

I.4.2. Test de l'ABTS (l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique))

I.4.2.1. Principe

Le teste de l'ABTS (l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) est basée sur la réaction entre l'ABTS incolore et le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) qui implique la production direct du bleu vert $ABTS^{\bullet+}$ chromophore (Figure 8), le cation radicalaire d' $ABTS^{\bullet+}$, est fréquemment utilisé pour piégeage des radicaux et la reproduction d'ABTS en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et donc estimer la capacité antioxydante totale (TAC) des produits naturels, y compris un extrait brut , des polyphénols, des acides phénoliques, des flavonoïdes et autres (Dong *et al.*, 2015).

I.4.2.2. Procédure expérimentale

Pour étudier l'activité anti-radicalaire d'ABTS, la méthode décrite par Dudonne et ses collaborateurs, (2009) a été adopté. L'ABTS a été dissous dans de l'eau bidistillée à une concentration de 7 mM. Le cation radical ($ABTS^{\bullet+}$) a été produit en faisant réagir une solution ABTS avec du persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) 2,45 mM et en laissant le mélange reposer dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 à 16 h avant utilisation. La solution $ABTS^{\bullet+}$ a été diluée dans de l'eau bi-distillée ou de l'éthanol jusqu'à une absorbance de 0,7 ($\pm 0,02$) à 734 nm.. Après addition de 100 μ L d'extrait de différentes concentrations à 3 ml de la solution radicalaire $ABTS^{\bullet+}$, la lecture d'absorbance a été prise à 30 °C 10 min d'incubation. Toutes les solutions ont été fraîchement préparées. Le pourcentage d'inhibition d' $ABTS^{\bullet+}$ (l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) a été calculé en utilisant la formule ci-dessus.

$$I(\%) = [A_1 - A_2 / A_1] \times 100$$

A_1 : Absorbance sans extrait.

A_2 : Absorbance avec de l'extrait

I.4.3. Test du radical hydroxyle (OH)

I.4.3.1. Principe

Le réactif est constitué d'un mélange de sulfate ferreux ($FeSO_4$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'acide salicylique-solution d'éthanol, Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange oxydé de coloration bleutée. La coloration produite, dont l'absorption maximum est 510 nm est proportionnelle à la quantité de radical hydroxyle présent dans les extraits végétaux (Zhong *et al.*, 2010).

I.4.3.2. Procédure expérimentale

L'activité de piégeage des radicaux hydroxyles a été mesurée selon la méthode de Fenton décrite précédemment **Zhong et ses collaborateurs, (2010)**, avec quelques modifications. 100 µl d'échantillons à concentrations différentes (1 ; 0,5 et 0,25 mg/ml) ont été préparés, l'acide ascorbique a été utilisé également comme un standard à concentrations différentes (400, 200, 100, 50, 25 et 12.5 µg/ml), puis incubés avec 9,0 mM du sulfate ferreux (FeSO₄) (1,0 ml), 0,3 % du peroxyde d'hydrogène(H₂O₂) (1,0 ml) dans 0,5 ml d'acide salicylique-solution d'éthanol (9,0 mM) pendant 30 min à 37 C°. Le radical hydroxyle a été détecté en surveillant l'absorbance à 510 nm. Le volume total du mélange dans chaque tube a été porté à 3 ml avec de l'eau distillée. L'effet de piégeage du radical hydroxyle a été calculé comme suit :

$$I(\%) = [A_1 - A_2 / A_1] \times 100$$

A₁ : Absorbance du control.

A₂ : Absorbance en présence de l'extrait.

I.4.4. Test de pouvoir réducteur de fer (FRAP)

I.4.4.1. Principe

Le test du pouvoir réducteur de fer (FRAP) mesure la capacité de réduction ferrique du plasma, la méthode est basée sur le transfert d'électrons de complexe d'ion ferrique jaune (Fe³⁺) en ion ferreux bleu (Fe²⁺) en l'exposant à des antioxydants dans un milieu acide. La capacité antioxydante est déterminée par l'intensité de la couleur bleue mesurée à une longueur d'onde de 593 nm (**Kadia et al., 2022**).

I.4.4.2. Procédure expérimentale

Le dosage du pouvoir réducteur a été étudié en suivant le protocole **d'Ahmad et ses collaborateurs, (2013)**. 2 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6), 2 ml d'échantillon et 2 ml de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) (10 mg/ml) ont été mélangés et incubés pendant 20 min à 50°C. Après incubation, 2 ml de TCA (Acide trichloracétique) (100 mg/ml) ont été ajoutés au mélange. 2 ml ont été prélevés et mélangé avec 2 ml d'eau distillée et 0,4 ml de chlorure ferrique (FeCl₃) (0,1 % ; p/v) et l'absorbance a été mesurée à 700 nm après 10 min.

I.4.5. Test du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

I.4.5.1. Principe

Le principe du test est basé sur la capacité des composés phénoliques des extraits de *Pseudevernia furfuracea* à chélater un radical libre (H⁺) du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et former un complexe de coloration blutée (Ahmed et al., 2013).

I.4.5.2. Procédure expérimentale

Cette activité a été évaluée en suivant le protocole de Ahmed et ses collaborateurs, (2013). Une solution de peroxyde d'hydrogène (2mM) a été préparée dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7,4). L'échantillon (100 µl) a été mélangé avec 400 µl de tampon phosphate et 600 µl de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La solution réactionnelle a été vortexée et incubée pendant 10 min à température ambiante, Puis l'absorbance a été mesurée à 230 nm. L'activité de piégeage de H₂O₂ a été calculée par la formule suivante:

$$\text{Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène} = \\ (1 - \text{absorbance de l'échantillon} / \text{absorbance du contrôle}) \times 100.$$

I.4.6. Test de β-carotène

I.4.6.1. Principe

Cette méthode consiste à mesurer, à 470 nm la décoloration du β-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween® 40. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) (El-Haci et al., 2012).

I.4.6.2. Procédure expérimentale

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de décoloration du β-carotène a été réalisée par le protocole expérimental décrit par El-Haci et ses collaborateurs (2012).

Pour préparer l'émulsion du β-carotène, 2 mg de ce dernier sont dissouts dans 10 ml de chloroforme, puis 1 ml de cette solution est mélangé avec 20 mg d'acide linoléique Purifié et, 200 mg du Tween® 40. Ensuite, Le chloroforme est évaporé sous pression réduite par un évaporateur rotatif, et le résidu obtenu est repris par 50 ml de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30% (p/v). Des tubes contenant 5 ml de cette émulsion sont préparés, pour lesquels 200 µl d'extraits bruts (2,5 mg/ml) sont ajoutés. Le mélange est bien agité, placés dans un bain-marie à 50 °C, et la lecture de l'absorbance est effectuée toutes les dix minutes pendant 60 minutes, à

470 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en termes de pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène par la formule suivant :

$$\% I = [1 - (A_0 - A_t / A'_0 - A'_t)] \times 100$$

A_0 : absorbance de l'échantillon à t_0 .

A_t : absorbance de l'échantillon après incubation de 60 minutes.

A'_0 : absorbance du contrôle négatif à t_0 .

A'_t : absorbance du contrôle négatif après incubation de 60 minutes.

I.4.7. Test de Phosphomolybdate d'ammonium (PPM)

I.4.7.1. Principe

Le principe du test est basé sur la capacité des composés phénoliques des extraits vinaigrier de la plante *Pseudevernia furfuracea* à chélates un radicale libre (H^+) du L'acide sulfurique (H_2SO_4) (Ahmed et al., 2013).

I.4.7.2. Procédure expérimentale

Selon Ahmed et ses collaborateurs, (2013). Le réactif de travail a été formé en mélangeant du L'acide sulfurique (H_2SO_4) 0,6 M, du phosphate de sodium 28 mM et du molybdate d'ammonium 4 mM. L'échantillon (100 μ l) a été mélangé avec 1 ml de réactif de travail pour former un mélange qui a été placé dans un bain-marie pendant 90 min à 95°C. Après refroidissement du mélange à température ambiante, l'absorbance a été lue à 765 nm contre un blanc. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard. L'activité antioxydante a été déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Effet antioxydant (\%)} = [(\text{absorbance témoin-échantillon}) / (\text{absorbance témoin})] \times 100$$

I.5. Activité hémolytique

I.5.1. Principe

Le principe de l'activité hémolytique est basé sur la capacité à détruire les globules rouges, conduisant à la libération d'hémoglobine (Chaouche et al., 2020).

I.5.2. Procédure expérimentale

L'étude de l'activité hémolytique a été réalisée par le protocole expérimental décrit par **Chaouche et ses collaborateurs, (2022)**. En utilisant le sang d'un volontaire sain. Dans des tubes à hémolyse, 20 µl de chaque extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 1980µl de la suspension d'érythrocytes préparée et incubés à 37C° pendant 60 minutes. Après incubation, des échantillons de 250 µl sont prélevés pour chaque tube à reprendre dans 750 µl de PBS. Ceux-ci sont délicatement mélangés et mis dans un bain de glace pour stopper la réaction, puis centrifugé à 2500 rpm pendant 10 minutes. Les absorbances ont été lues à 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS. Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage par rapport à l'hémolyse totale, après 60 minutes d'incubation, selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(\text{Extrait DO} - \text{contrôle négatif DO}) / \text{contrôle négatif DO}] \times 100$$

I.6. Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

I.6.1. Principe

La Chromatographie en phase gazeuse est une chromatographie "gaz-liquide" (**Coskun, 2016**). Une quantité de l'échantillon, sous forme liquide a été introduite dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire.

I.6.2. Procédure expérimentale

Les analyses GC/MS ont été effectuées sur un appareil CG-MS Shimadzu QP2010 de type EI 70ev quadripôle muni d'un détecteur masse couplé du type thermo trace GC 2000, équipé d'une colonne OVI 70I (25m) (5 % méthyl phénylpolysiloxane), de (30 m x 0.25 mm i.d. épaisseur de film 0.25 µm). La température de four étant programmées de 70°C (4 min), puis à une vitesse de 3°C lorsque la température atteint 280°C. Les paramètres MS étant : - Température de trappe d'ions : 200°C - Rapport split : 1 :10 - Potentiel d'ionisation : 70 ev - Bande de scans : 40400 u - Temps de scan : 5s - Résolution : 1000.

I.6.3. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type (SD). Les données expérimentales ont été analysées à l'aide de Graph Pad Prism 8.0.1 Software. L'analyse de

variance (ANOVA) a été utilisée. La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

$p > 0,05$ = la différence n'est pas significative ns ; $0,05 >$

$p < 0,05$ = différence significative * ; $0,05 >$

$p < 0,01$ = différence hautement significative ** ; $0,01 >$

$p < 0,001$ = différence très hautement significative *** ; $0,001 >$

II. Résultats et discussion

II. Résultats et Discussion

II.1. Analyse chimique de l'extrait de *Pseudevernia furfuracea*

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant d'extraction qui préserve leurs propriétés biologiques. Les résultats de l'extraction, et de l'étude phytochimique de *Pseudevernia furfuracea* utilisée dans cette étude sont représentés ci-dessous.

II.1.1. Taux d'extraction

Après macération, l'évaporation du solvant sert à l'extraction de *Pseudevernia furfuracea* a été effectuée à une température de 40 °C. Le poids sec a été pris afin de calculer le rendement d'extraction de la plante, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau I : Rendement d'extraction de la plante.

	Extrait 1 (15 min)	Extrait 2 (30 min)	Extrait 3 (1 h)
Rendement %	9.7 %	10.5 %	9.65 %

Les résultats obtenus montrent des rendements de 9,7 % pour l'extrait 1 (15 minutes), 10.5 % pour l'extrait (30 minutes) et de 9,65 % pour l'extrait 3 (1 heure), (Tableau 1).

Les extractions assistées par ultrasons (UAE) sont une technique utilisée pour améliorer le processus d'extraction en augmentant le transfert de masse entre le solvant et la matière végétale. L'extrait 2 (30 minutes) présente le meilleur rendement d'extraction, cela peut être expliqué par le temps laissé pour l'extraction qui est juste suffisant pour avoir le maximum d'extrait, le temps sert pour ouvrir le plus grand nombre de pores de la poudre végétale et donc de l'entrée de solvant.

De plus, l'effondrement des bulles de cavitation conduit à une meilleure perturbation des cellules via la formation de micro jets en raison de l'effondrement asymétrique des bulles près d'une surface solide. Cela permet une meilleure pénétration du solvant dans le corps de la plante lui-même et peut également décomposer les parois cellulaires. En conséquence, l'extraction à ultrasons présente des avantages en termes de transfert de masse accru, de meilleure pénétration du solvant, de moins de dépendance au solvant utilisé, d'extraction à des températures plus basses, de taux d'extraction plus rapides et de meilleurs rendements de produit. Ces caractéristiques font de la sonication une proposition attrayante pour de nombreuses extractions (Figure 11) (Mason et al., 2011).

D'autre part, les taux d'extraction des composés phénoliques dépendent de type du solvant, le rapport solide-liquide, la granulométrie de la poudre végétale, la température et le pH du milieu etc (Naczki et Shahidi, 2004).

II.2. Teneur en composés phénoliques

II.2.1. Teneur en Polyphénols totaux

La figure ci-dessous représente la teneur en Polyphénols totaux des trois extraits de *Pseudevernia furfuracea*.

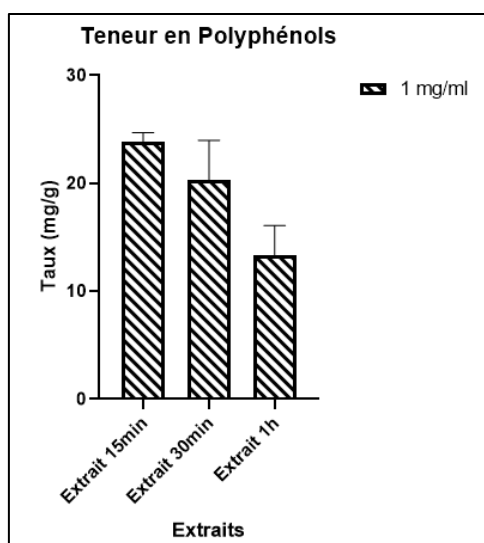


Figure 11 : Teneur en Polyphénols des extraits du *Pseudevernia furfuracea*.

Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1. Une analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée.

D'après l'histogramme, aucune différence significative n'a été enregistrée, en revanche la teneur en polyphénols totaux la plus élevée a été observée chez l'extrait de 15min avec une valeur de (23,84mg EAG/g d'extrait).

Des résultats semblables ont été obtenus dans des études antérieures (Mitrović et al., 2014 ; Sarikurkcu et al., 2016 ; Aoussar et al., 2017 ; Aoussar et al., 2020), dont la teneur en composés phénoliques varie entre 39,75 et 123,09 mg AG/g d'extrait chez *Pseudevernia furfuracea*. Il a été constaté que la teneur en polyphénols varie en fonction de solvant d'extraction dont la meilleure teneur a été observée avec l'acétone, puis l'acétate d'éthyle et en dernier lieu le méthanol (Mitrović et al., 2014). Selon Sarikurkcu et ses collaborateurs, (2016) les données obtenues à partir des dosages phénoliques totaux de *P. furfuracea* montrent que l'extrait méthanolique présente une teneur de 41,16 mg d'EAG/g, contre l'extrait aqueux (28,18 mg d'EAG/g d'extrait). Une autre étude menée par Aoussar et ses collaborateurs, (2020), montre une comparaison saisonnière de la teneur en composés phénoliques et les résultats révèlent une teneur moyenne de 328 ± 27 μ g EAG/mg d'extrait sec, la teneur la plus

élevé a été enregistrée au printemps avec 328 ± 27 lg EAG/mg d'extrait sec. Des travaux antérieurs de **Aoussar et ses collaborateurs, (2017)** consacré à l'étude comparative entre les solvants montre que les teneurs en polyphénols les plus élevés ont été enregistrés par l'extrait acétonique ($237,66 \pm 25,18$ μ g EAG / mg) suivi de l'extrait Dichlorométhanique puis l'extrait méthanolique ($105,33 \pm 13,27$ μ g EAG / mg).

II.2.2. Teneur en Flavonoïdes

La figure ci-dessous représente la teneur en flavonoïdes par les trois extraits de *Pseudevernia furfuracea* (Figure 12).

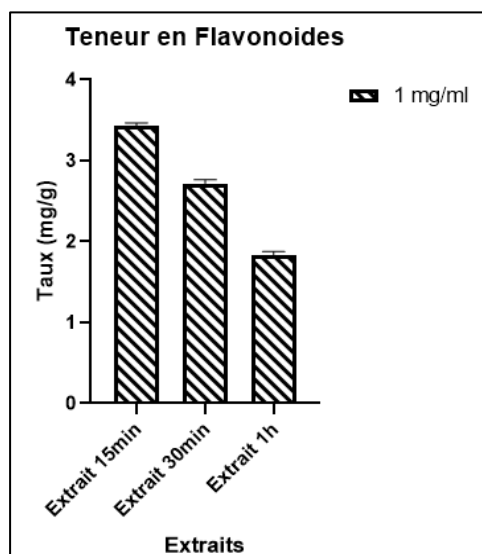


Figure 12 : Teneur en Flavonoïdes des extraits du *Pseudevernia furfuracea*.

Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1 Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé.

Encore une fois l'extrait de 15 min montre la teneur en flavonoïdes la plus élevée, une teneur qui s'élève à (3,44mg EAG/g d'extrait).

Ces résultats concordent avec les travaux de **Mitrović et ses collaborateurs, (2014)** dont la teneur en flavonoïdes varie entre 37,38 et 51,84 mg Ru/g d'extrait. D'autre part, il est mentionné que le solvant d'extraction joue un rôle important sur la teneur des flavonoïdes et les composés phénoliques d'une manière générale. Le taux des flavonoïdes le plus élevé a été obtenu par l'extrait d'acétate d'éthyle par rapport à d'autres solvants testés (**Mitrović et al., 2014**). Selon **Sarikurku et ses collaborateurs, (2016)**, l'extrait aqueux présente la teneur la plus faible en flavonoïdes (0,15 mg d'ER/g d'extrait), ce qui concorde avec les résultats obtenus dans la présente étude. Une étude comparative entre la teneur de trois solvants a été réalisée par **Aoussar et son équipe, (2017)**, et les résultats montrent que les teneurs variaient de $14,5 \pm 0,81$ à $19,2 \pm 1,15$ μ g EC /mg d'extrait sec, et la teneur la plus élevée a été observée pour l'extrait

acétonique (Aoussar et al., 2017). Dans une étude ultérieure, de Aoussar et ses collaborateurs, (2020), le taux de flavonoïdes le plus élevé chez *P. furfuracea* a été obtenu à la saison d'hiver ($13 \pm 0,26$ lg CE/ mg d'extrait sec) qui coïncide avec des périodes annuelles caractérisées par une augmentation du taux de précipitation et une diminution de la température.

II.3. Evaluation de l'activité antioxydante

II.3.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire (anti DPPH)

L'activité anti radicalaire a été évaluée par le test de DPPH, La figure ci-dessous représente le pourcentage de l'inhibition de DPPH par les trois extraits de *Pseudevernia furfuracea* (Figure13).

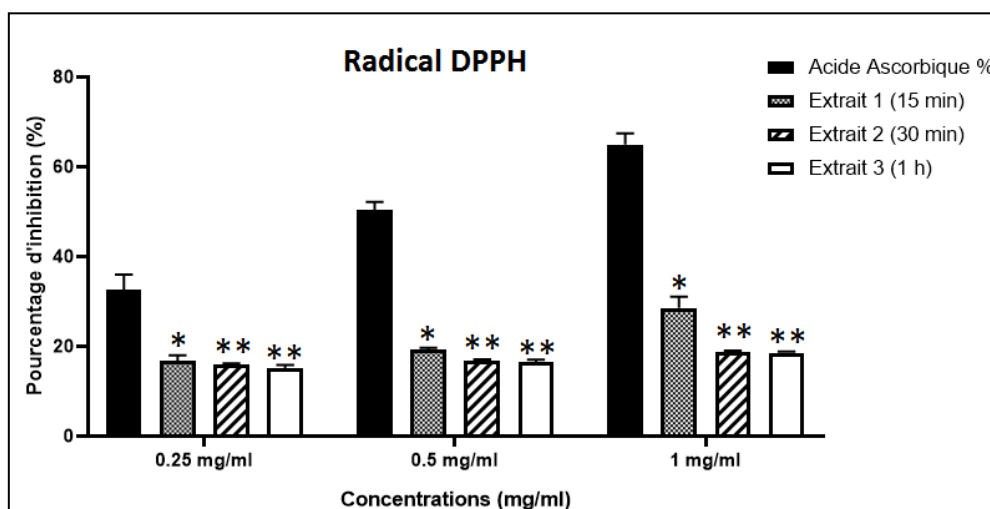


Figure 13 : Activité antioxydant anti DPPH des extraits du *Pseudevernia furfuracea* et l'acide ascorbiques. Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1 Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Tukey's. Les résultats ont été considérés comme : statistiquement significatifs à * P <0,05, hautement significatif à ** P < 0,01, et très hautement significatif à *** P <0,001

En analysant les histogrammes, une différence significative *P < 0,05 a été observé entre l'extraits à 15min de *P. furfuracea* et l'acide ascorbique. Quant aux extraits de 30min et 1h, on observe une différence hautement significatif à **P < 0,01 avec l'acide ascorbique.

Un taux d'inhibition modérée a été exhibé par les extraits, dont le pourcentage le plus élevé et de 28.5% qui a été enregistré par l'extrait de 15min à la concentration de 1mg/ml.

L'activité antioxydante de *Pseudevernia furfuracea* poussant dans la province de Kutahya en Turquie contre le radicale DPPH a été étudiée chez les extraits de butanol, de dichlorométhane, d'acétate d'éthyle et de méthanol ainsi que pour les composés isolés (acide atrarique et un mélange d'hématommate de méthyle et de chlorohématommate de méthyle). Il a été révélé que l'extrait methanolique exhibe l'activité de piégeage la plus faible, en revanche

l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait dichlorométhane manifestent les taux d'inhibition les plus élevés alors qu'elle est négative chez l'extrait au butanol. D'autre part, le mélange d'hématomate de méthyle et de chlorohématomate de méthyle était semblent être plus actifs que l'acide atrarique (Aoussar et al., 2017).

De plus, le potentiel antioxydant de l'extrait acétonique, méthanolique ainsi que l'extrait aqueux de *Pseudevernia furfuracea* de la montagne Kopaonik en Serbie a été évalué. Une relation étroite entre la teneur en polyphénols et l'activité anti radicalaire a été retrouvée dont l'extrait acétonique représente le taux le plus élevé et l'activité la plus prononcée ($86,94 \pm 0,010$ % conformément à l'augmentation de la concentration des extraits de 50 à 1000 $\mu\text{g/mL}$), ce qui concorde avec les résultats obtenus avec notre extrait de 15 min. L'effet antioxydant *in vitro* est corrélé à la teneur en phénols totaux, par contre, aucune corrélation significative entre la teneur en flavonoïdes de l'extrait de lichen et l'effet antioxydant n'y a été rapportée. Cela signifie que les composants du lichen (depsides, depsidones et dibenzofuranes) sont les principaux composés responsables des activités antioxydantes. Quant à l'extrait aqueux, il présente le pourcentage d'inhibition le plus faible, cela a été expliqué par le fait que les composés les plus actifs ne se retrouvent pas chez l'extrait aqueux qui représente le taux d'extraction le plus faible (Aoussar et al., 2020).

Les travaux menés par Mitrović et ses collaborateurs, (2014), se sont focalisés sur le piégeage du radical DPPH par l'acide physodique isolé de *Pseudevernia furfuracea*, il a été remarqué que ce composé majoritaire montre une inhibition prometteuse, ce qui laisse à confirmer qu'il est le composé responsable de cette activité chez l'extrait brut de *P. furfuracea* (Mitrović et al., 2014).

Une étude de Sarikurkcü et ses collaborateurs, (2016) qui étudie le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques et aqueux comparés aux composés isolés (l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide gallique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchuique et l'acide syringique) a été réalisée, les résultats montrent que l'extrait méthanolique présente une activité 2 fois supérieures à celle de l'extrait aqueux (44,69 mg TEs/g d'extrait contre 21,45 mg TEs/g d'extrait) ce qui confirme une autre fois les résultats obtenus par la présente étude. Quant aux composés isolés, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide syringique présentent une activité de piégeage des radicaux supérieure à 80,0 % à une concentration de 2 mg/mL. L'acide gallique et l'acide protocatéchuique présente une activité à 73,62 % et 70,12 % respectivement (Sarikurkcü et al., 2016).

En fin, de nombreux composés phénoliques semblent être actifs, sont synthétisés par les espèces de lichens telles que les xanthones, les depsides et les depsidones, présentent une importance pharmaceutique et considérés comme alternatifs aux traitements chimiques (Şahin et al., 2021).

II.3.2. Inhibition du radical ABTS

La figure ci-dessous représente le pourcentage de l'inhibition du radical ABTS par les trois extraits de *Pseudevernia furfuracea* (Figure 14).

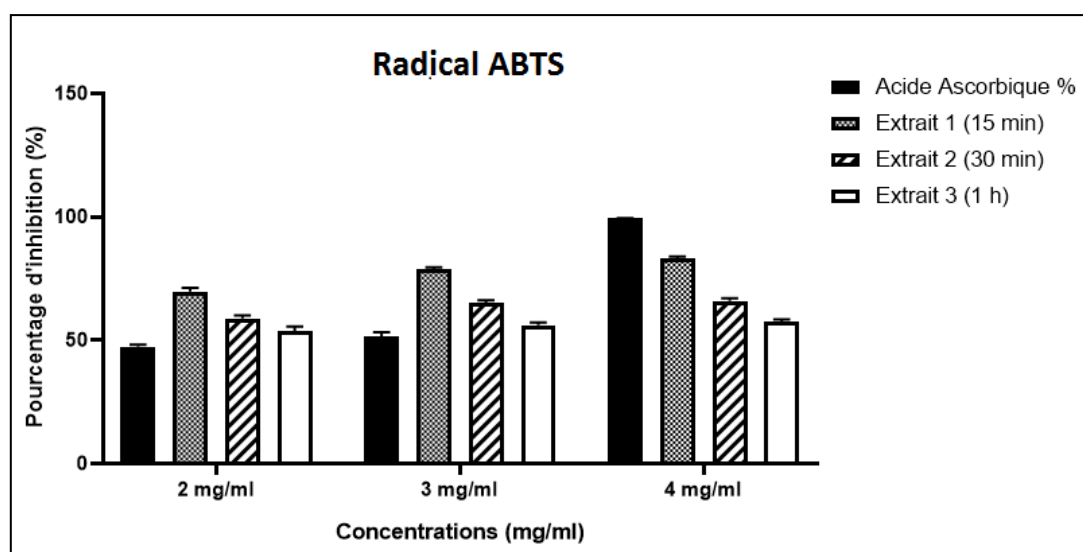


Figure 14 : Activité antioxydant ABTS des extraits du *Pseudevernia furfuracea* et l'acide ascorbiques. Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1 Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Tukey's. Les résultats ont été considérés comme : statistiquement significatifs à * P < 0,05, hautement significatif à ** P < 0,01, et très hautement significatif à *** P < 0,001.

D'après les histogrammes, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les trois extraits testés de *P. furfuracea* et l'acide ascorbique et cela aux trois concentrations testées.

Un taux d'inhibition plus que moyen a été exhibé par les extraits, dont le pourcentage le plus élevé (82.9%) a été enregistré par l'extrait de 15min à la concentration de 4mg/ml.

Les trois extraits à la concentration de 2 et 3 mg/ml, révèlent des pourcentages d'inhibition plus importante que l'acide ascorbique.

Une étude récente menée par **Kalra et ses collaborateurs, (2021)**, montrant des taux des inhibitions du radical ABTS et leurs relation avec la méthode d'extraction révèlent que l'extrait obtenu par sonicateur utilisant le méthanol à 70% présente le meilleur taux d'inhibition du radical.

II.3.3. effet de piégeage du radical hydroxyle (OH)

La figure ci-dessous présente le pourcentage de piégeage du radical hydroxyle (OH) par les trois extraits de *Pseudevernia furfuracea* (Figure 15).

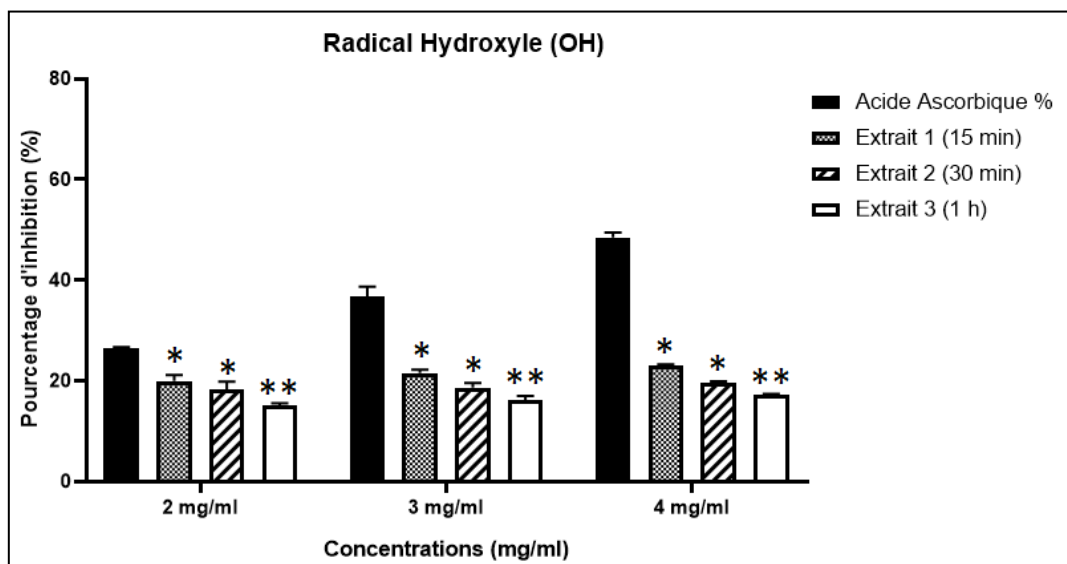


Figure 15 : Activité antioxydant OH des extraits du *Pseudevernia furfuracea* et l'acide ascorbiques.

Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1 Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Tukey's. Les résultats ont été considérés comme : statistiquement significatifs à * $P < 0,05$, hautement significatif à ** $P < 0,01$, et très hautement significatif à *** $P < 0,001$.

D'après la figure des pourcentages de piégeage de radical hydroxyle (OH), une différence significative (* $P < 0,05$) a été enregistrée entre l'acide ascorbique et les extraits de 15 et 30 min. par contre une différence hautement significative (** $P < 0,01$) a été retrouvé pour l'extrait de 1 heure.

Un taux d'inhibition modérée a été exhibé par les extraits, dont le pourcentage le plus élevé (23.21%) a été enregistré par l'extrait de 15 min à la concentration de 4 mg/ml contre un pourcentage avoisinant les 50% exhibé par l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus confirment les travaux menés par **Kalra et son équipe, (2021)** qui ont enregistrés une activité modéré de l'extrait aqueux. D'autre part le pourcentage le plus élevé a été manifesté par l'extrait methanolique à 70%. Ils ajoutent qu'une corrélation a été retrouvé entre la teneur en polyphénols et l'activité de piégeage du radicale (OH).

Kalra et ses collaborateurs, (2021) ont suivi les dommages causés par le radical hydroxyle sur la molécule d'ADN et l'effet protecteur de l'extrait *P. furfuracea*. Les radicaux hydroxyles générés la réaction de Fenton ont entraîné la dégradation de la forme super enroulée de l'ADN plasmidique (piste 1, type 1) en formes linéaires d'ADN entaillé et double brin simple

brin (piste 2, types II et III) (Figure 4). Les résultats ont montré que la présence de curcumine à des certaines concentrations de (piste 3) protège l'ADN sous forme super enroulée. De même, la présence d'extrait de *P. furfuracea* à différentes concentrations (200 à 25 µg/ml, voies 4 à 7, respectivement) dans le mélange réactionnel a diminué les dommages de l'ADN (Kalra et al., 2021).

II.3.4. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

La figure ci-dessous représente pouvoir réducteur de fer (FRAP) par les trois extraits de *Pseudevernia furfuracea* (Figure 16).

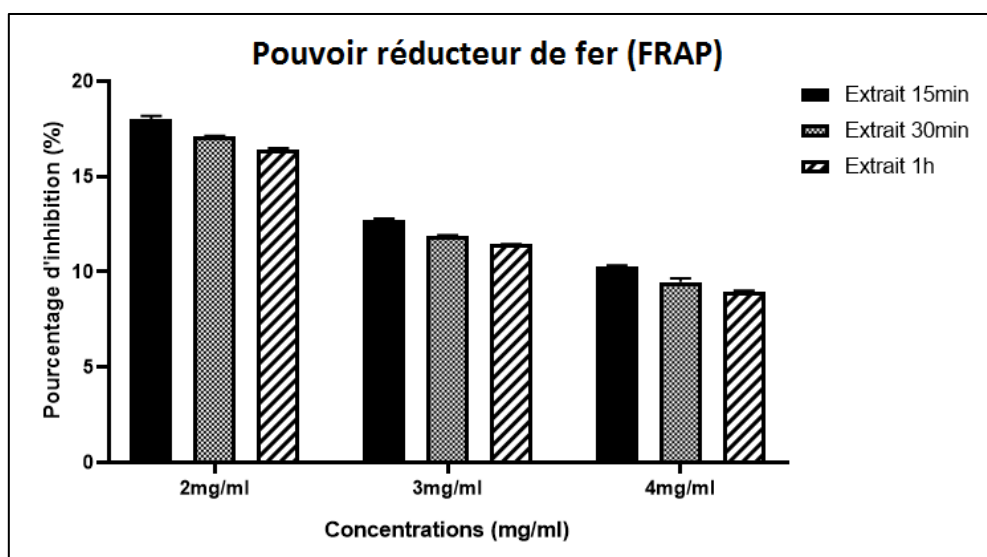


Figure 16 : Activité antioxydant FRAP des extraits du *Pseudevernia furfuracea*. Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1 Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Tukey's. Les résultats ont été considérés comme : statistiquement significatifs à $^*P < 0,05$, hautement significatif à $^{##}P < 0,01$, et très hautement significatif à $^{###}P < 0,001$.

D'après les histogrammes, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les trois extraits testés de *P. furfuracea* et l'acide ascorbique et cela aux trois concentrations testées.

Un pouvoir réducteur remarquable a été exhibé par les extraits, dont le taux le plus élevé (17,99mg EAA/g d'extrait) a été enregistré par l'extrait de 15 min à la concentration de 2mg/ml.

D'autres travaux ont été réalisés par l'équipe de Sarikurku, (2016), montrent que l'extrait aqueux exhibe le meilleur pouvoir réducteur de Fer (FRAP) (105,97 mg d'ET/g d'extrait) par rapport à l'extrait du méthanol (88,10 mg d'ET/g d'extrait). Le pouvoir réducteur de l'acide caféique, de l'acide férulique, de l'acide gallique, de l'acide p-hydroxybenzoïque, de l'acide protocatéchuïque et de l'acide syringique, ont été aussi testé et les résultats rapportent que l'acide caféique a montré une activité remarquable avec une valeur d'absorbance de 1,862 à 700 nm suivie des acides férulique et syringique (1,798 et 1,769, respectivement), quant au

pouvoir réducteur des acides p-hydroxybenzoïque, protocatéchuïque et gallique a été déterminé respectivement à 1,623, 1,548 et 1,407 (Sarikurkcu et al., 2016).

Cela est interprété par la richesse de ces extraits en composés phénoliques, on peut déduire alors de ce test que les polyphénols notamment les flavonoïdes jouent un rôle très important dans la chélation des métaux de transition impliqués dans la réaction de Fenton (formation de radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène) (Figure 17). La complexation des ions métalliques par les polyphénols induit typiquement un déplacement bathochrome de leurs bandes d'absorption dans le domaine UV-Visible. Les études menées par Taylor et ses collaborateurs, (2022) sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B (les fonctions catéchol), les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C (le motifénone), les groupes 4-oxo et 5-hydroxy en position 3. Ainsi, la quercétine qui combine tous ces substituants est un complexant métallique particulièrement efficace. Ce processus d'auto-oxydation dépend de multiples paramètres tels que la concentration de l'ion métallique et du polyphénol, la température, le pH, la présence d'agents complexant.

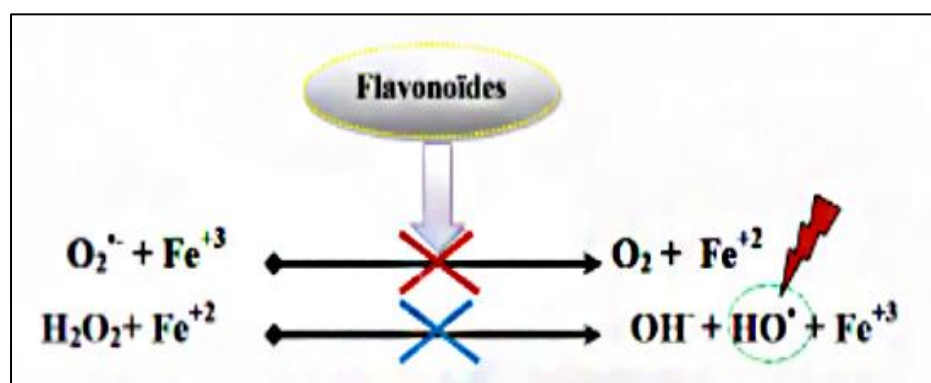


Figure 17 : Réaction du fenton (Taylor et al., 2022)

II.3.5. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé non-radicalaire d'oxygène et considéré comme toxique pour les cellules car il permet la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur de la cellule. Le piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits de *Pseudevernia furfuracea* a été étudié et les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 18) :

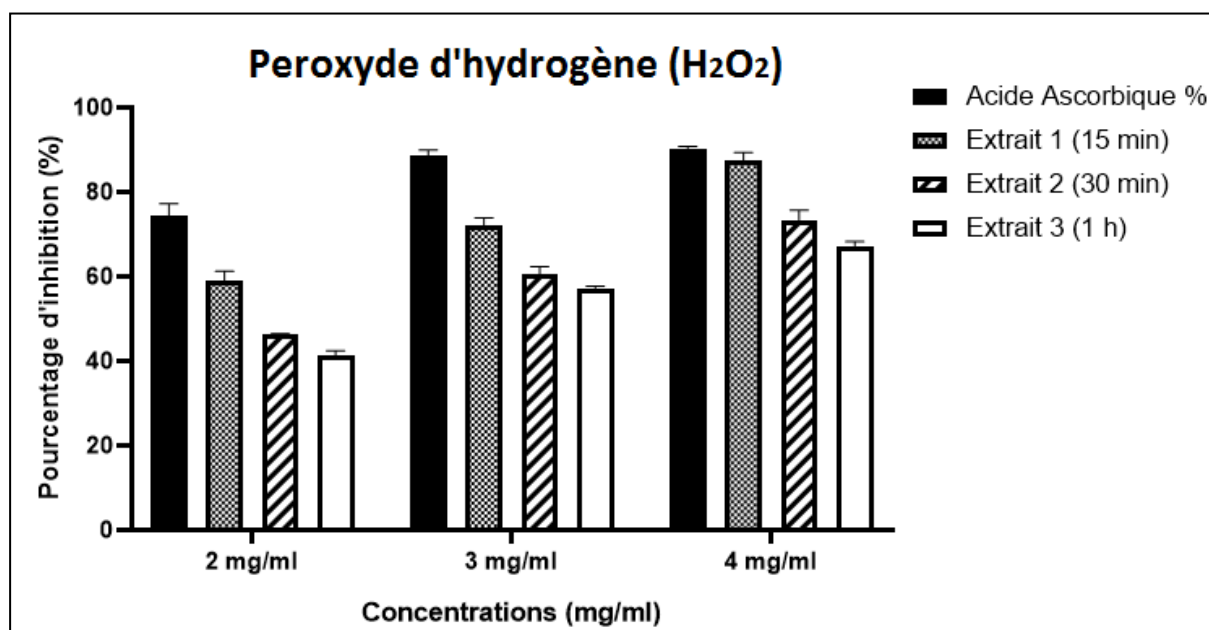


Figure 18: Activité antioxydant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) des extraits du *Pseudevernia furfuracea* et l'acide ascorbiques.

Les résultats ont été exprimés en moyennes ± écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1 Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Tukey's. Les résultats ont été considérés comme : statistiquement significatifs à * P < 0,05, hautement significatif à ** P < 0,01, et très hautement significatif à *** P < 0,001.

D'après les histogrammes des pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), aucune différence significative n'a été enregistrée entre les extraits de *P. furfuracea* et l'acide ascorbique et cela aux trois concentrations testées.

Un taux d'inhibition très remarquable a été exhibé par les extraits, dont le pourcentage le plus élevé (87.6 %) a été enregistré encore une fois par l'extrait de 15min à la concentration de 4mg/ml.

Emsen et ses collaborateurs, (2018), mène une étude dans le but d'expliquer la relation entre la structure des composés isolés de lichen *P. furfuracea* tel que l'acide olivétorique (AO) et en particulier l'acide physodique (PA) et leur pouvoir de piégeages de peroxyde d'hydrogène ils ont pu prouver que l'activité des extraits de *P. furfuracea* est dû essentiellement à ces deux composés (**Emsen et al., 2018**).

II.3.6. Test de blanchissement de β-carotène

La cinétique de blanchissement du β-carotène en présence et en absence des extraits de *Pseudevernia furfuracea* de l'antioxydant standard et les activités antioxydantes relatives (AAR) sont représentés dans la figure ci-dessous (Figure19) :

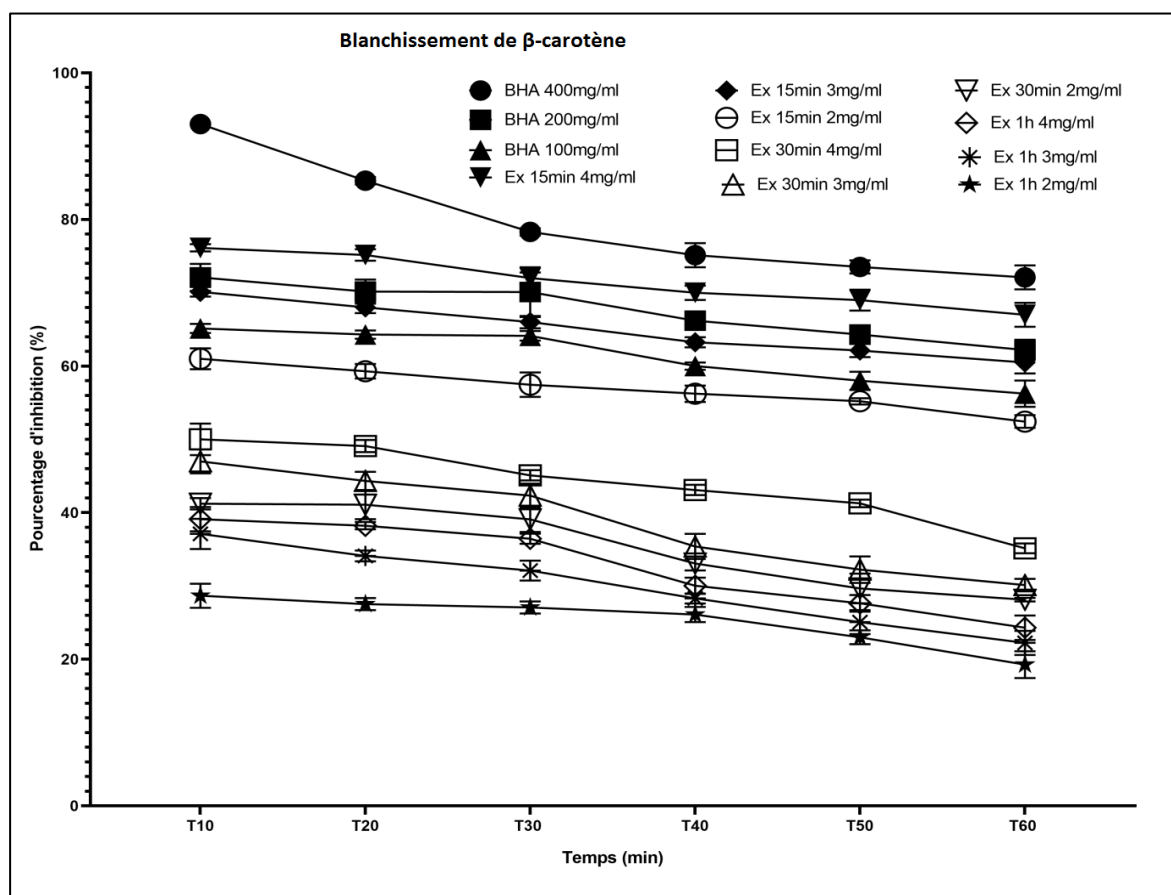


Figure 19 : Pourcentage de l'inhibition de blanchissement de β -carotène des extraits du *Pseudevernia furfuracea* et l'acide ascorbiques.

Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1 Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Tukey's. Les résultats ont été considérés comme : statistiquement significatifs à * $P < 0,05$, hautement significatif à ** $P < 0,01$, et très hautement significatif à *** $P < 0,001$.

BHA : butylhydroxyanisole

Comme l'indique cette Figure, des pourcentages d'inhibition de blanchissement de β -carotène, au temps (t:10min) l'absorbance commence à diminuer progressivement pour tous les extraits et le standard, ce qui indique sans doute le début de la formation des radicaux libres (RLs) dans le milieu réactionnel généré par l'acide linoléique suite à la rupture des doubles liaisons par le tween 40, c'est la phase de propagation. Après ce temps (t 30min) l'étude de cinétique de blanchiment du β -carotène montre que celui-ci diminué graduellement avec le temps, pour atteindre un état stationnaire au bout de 60min, étant donné que le nombre de RLs devient important. Après ce temps-là, il reste constant, ce qui montre que toutes les doubles liaisons présentes dans le β -carotène sont dégradées, ce qui s'achève à l'épuisement irréversible de la coloration jaune par la transformation en une couleur blanche, c'est donc le blanchiment total du β -carotène, c'est la phase de terminaison (**Ghedadba et al., 2015**).

L'activité antioxydante des extraits pourrait s'expliquer par leur richesse en substances poly phénoliques. C'est pourquoi, on remarque la présence d'une corrélation linéaire entre la teneur de ces extraits en polyphénols totaux, en flavonoïdes et le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique, ce qui indique la contribution de ces composés qui sont les antioxydants dominants dans ces extraits. Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs publications, qui ont rapporté une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydante (Kosanić et al., 2014 ; Şahin et al., 2021). L'activité antioxydante dépend de plusieurs facteurs, dont la concentration des extraits, la méthode d'évaluation, la sensibilité des antioxydants à la température de l'essai et la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant. Des résultats semblables ont été obtenus par les travaux réalisés par Şahin et ses collaborateurs, (2021), dont ils ont approuvé un pouvoir d'inhibition très prononcé a l'extrait éthanolique de *P. furfuracea*. Ce pouvoir est significativement corrélé à la teneur en polyphénols, du fait que la structure de ces composés leur permette une meilleure activité.

II.3.7. Test au phosphomolybdate d'ammonium (PPM)

Le test de réduction du phosphomolybdate d'ammonium a été réalisé et les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous (Figure 20) :

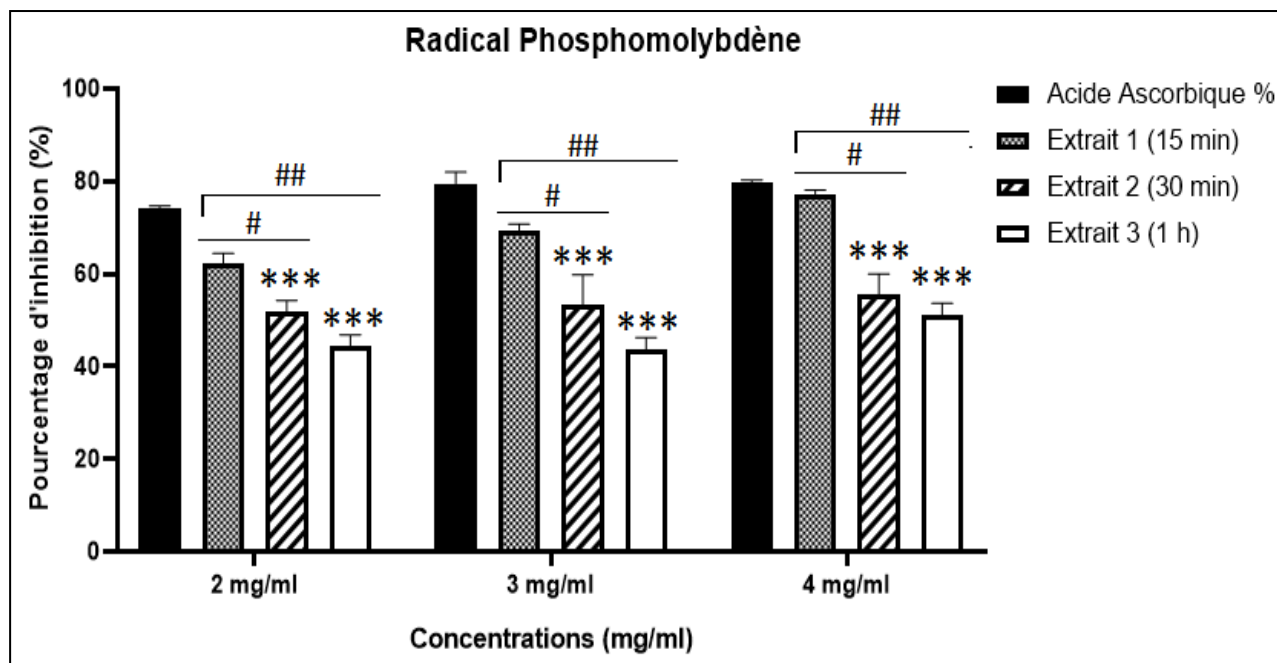


Figure 20: Réduction de Phosphomolybdène par les extraits de *Pseudevernia furfuracea* et l'acide ascorbique.

Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1 Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Dunnett. Les résultats ont été considérés comme : statistiquement significatifs à $^{\#}P < 0,05$, hautement significatif à $^{\#\#}P < 0,01$, et très hautement significatif à $^{\#\#\#}P < 0,001$ pour le témoin négative, statistiquement significatifs à $^*P < 0,05$, hautement significatif à $^{**}P < 0,01$, et très hautement significatif à $^{***}P < 0,001$ pour le témoin positive.

Les résultats indiquent que les extraits exercent un pouvoir antioxydant dose-dépendant, avec une activité plus significative pour l'extrait à 15min, d'autre part, aucune différence significative n'a été retrouvée entre l'acide ascorbique et l'extrait à 15min. En revanche, une différence très hautement significative a été retrouvée entre l'acide ascorbique et les extraits à 30min et celui d'une heure. Le taux d'inhibition le plus élevé (77.08%) a été exhibé par l'extrait de 15 min à la concentration de 4 mg/ml. Les histogrammes obtenus montrent que l'absorbance des extraits augmente avec l'élévation de la concentration, cela s'explique par la présence probable de composés antioxydants. De plus, les résultats montrent que l'activité exercée par l'extrait de 15min pourrait être attribuée à sa richesse en polyphénols.

Sarikurkcu et ses collaborateurs, (2016) indique une forte corrélation entre le pouvoir antioxydant et la teneur en polyphénols. Les activités antioxydantes des extraits méthanoliques et aqueux de *P. furfuracea* ont été évaluées par le test de phosphomolybdène. L'extrait méthanolique présente l'activité la plus élevée (1,16 mmol d'ET/g) par rapport à l'extrait aqueux (**Sarikurkcu et al., 2016**). Il a été rapporté que les extraits obtenus par des solvants très polaires exercent un effet scavenger plus important que ceux extraits par des solvants peu polaires (**Gacioui et al., 2014**).

II.4. Activité anti-hémolytique

Afin d'évaluer la toxicité *in vitro* de nos extraits un test hémolytique a été réalisé et les résultats sont montrés dans la figure ci-présente (Figure 21) :

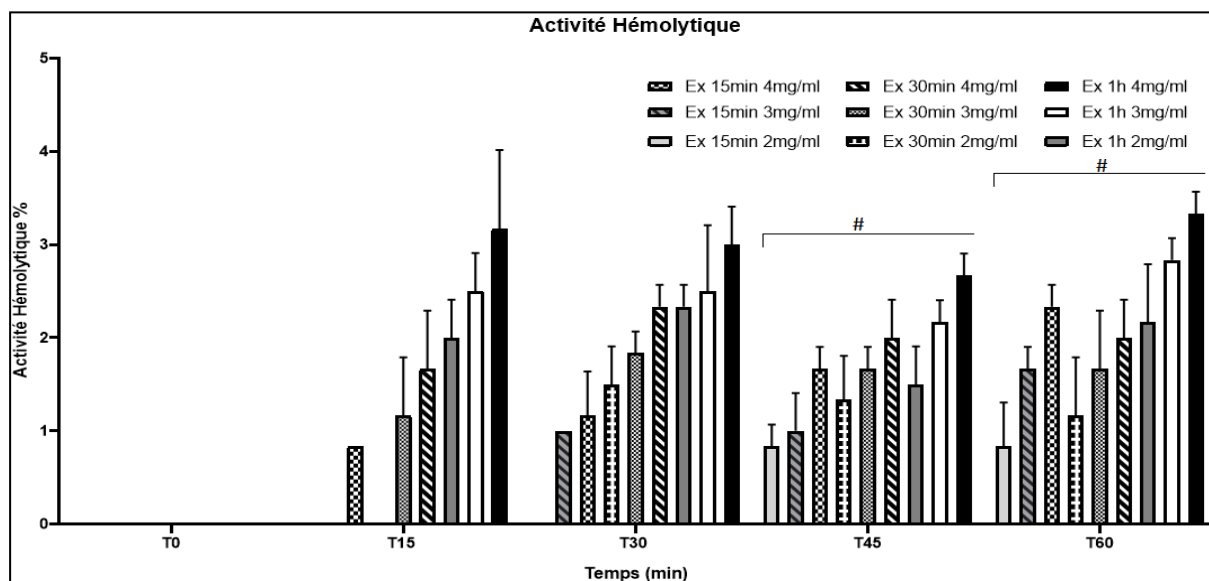


Figure 21 : Activité Hémolytique des extraits du *Pseudevernia furfuracea*.

Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 8.0.1. L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée, suivie du test de Tukey's. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à $^{\#} P < 0,05$, hautement significatif à $^{\#\#} P < 0,01$, et très hautement significatif à $^{\#\#\#} P < 0,001$.

L'innocuité de l'extrait vis-à-vis de la cellule érythrocytaire a été évaluée par le pourcentage de l'activité Hémolytique. Une différence significative à $^{\#}P < 0,05$ a été retrouvée entre l'extrait 15min 2mg/ml et l'extrait de 1h.

Un taux modéré a été exhibé par les extraits, dont le pourcentage le plus élevé (3.3 %) a été enregistré par l'extrait de 1h à la concentration de 4mg/ml, La lyse des érythrocytes est proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'extrait. Dans les travaux de **Gangwar et ses collaborateurs, (2014)**, une hémolyse de 14% à la concentration de 100 μ g /ml a été enregistrée, ce taux est considéré comme non hémolytique et cet effet protecteur pourrait être attribué aux composés phénoliques, cependant le mécanisme reste non élucidé.

S'ajoute que les composés phénoliques s'incorporent dans la couche hydrophile externe et n'ont aucun effet sur la fluidité de la partie hydrophobe. Ainsi l'action protectrice de ces composés en ce qui concerne les membranes biologiques dépend du taux d'incorporation dans la partie hydrophile de cette dernière. L'incorporation des composés phénoliques de l'extrait dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier protecteur de la cellule vis-à-vis des substances agressives exogènes, tels que les radicaux libres (**Louered et al., 2016**).

Dans une étude portant sur l'innocuité de deux plantes de la famille des Rhamnacees, les extraits ne présentent aucun pourcentage d'hémolyse au temps 0, après 15 minutes et 30 minutes de contact avec les érythrocytes, par contre une légère augmentation des pourcentages dans les deux extraits à une concentration de 50 mg/ml a été remarquée après une heure de contact (3,26 %). De ce fait, tous les extraits étudiés représentent un effet hémolytique inférieur à 3,5 % après 1 heure de contact avec des érythrocytes humains et les extraits sont considérés comme non toxiques, ce qui pourrait être expliqué par une faible teneur en saponines dans les extraits (**Chaouche et al., 2020**).

II.5. Caractérisation des extraits par CG-MS

L'analyse chimique des extraits de *P. furfuracea* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, plusieurs composés ont été identifiés par comparaison des pics de base à la bibliothèque de données et les résultats sont montrés sur le tableau ci-dessous.

Tableau II : Composés identifiés dans l'extrait de *Pseudevernia furfuracea*.

Pic	Temps de ret (min)	Nom
1	26.338	acide hexadecanoïque, ester demethyl
2	29.317	acide 8,11-Octadecadienoïque, ester de methyl
3	29.523	Acide 9-Octadecenoïque (Z)-, ester de methyl
4	30.085	Acide Octadecadienoïque, ester de methyl
5	36.510	Acide 1,2-Benzenedicarboxylique , ester de diioctyl

Il a été observé que toutes les molécules identifiées sont des dérivés d'ester méthylique, ces composés plus précisément l'acide hexadécanoïque, ester de méthyle et l'acide 8,11-Octadecadienoïque, ester de méthyle, sont connus avoir une action sur la diminution de la tension artérielle, et la réduction de risque de caillots sanguins ainsi qu'une activité antibactérienne (Shaaban et al., 2021 ; Samiee et al., 2022). D'autre part aucune étude ne montre la présence de ses molécules au sein de notre lichen.

CONCLUSION

Le stress oxydatif est un processus qui aboutit à la production d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant l'oxydation de différentes molécules, ce qui finit par une altération parfois irréversible des organes.

A la fin de cette étude, on peut conclure que *P. furfuracea* est une plante médicinale, très riche en métabolites secondaires. Parmi eux, les composés phénoliques tels que , les polyphénols et les flavonoïdes, qui possèdent un pouvoir antioxydants déterminés par plusieurs tests dont l'activité « scavenging » du radical DPPH et du radical ABTS^{•+}, le pouvoir réducteur (FRAP), Radical Hydroxyle (OH), Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), β-carotène ainsi que du phosphomolybdate d'ammonium (PPM). D'autre part, un test de l'activité hémolytique pour évaluer la cytotoxicité de la plante.

Le rendement d'extraction le plus élevé a été enregistré par l'extrait de 15min (9,7 %). Le même extrait révèle les teneurs les plus élevés en Polyphénols, Flavonoïdes (23,84mg EAG/g d'extrait), ainsi que les meilleurs pourcentages d'inhibition de radicale DPPH (28.5 %), et ABTS (82.9 %), Radicale Hydroxyle (OH) (23.1 %), quant au Pouvoir réducteur de fer (FRAP) (17,99 mg EAA/g d'extrait), de Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (87.6%), le test de blanchiment de β-carotène (76.13%) et le test de phosphomolybdate d'ammonium (PPM) (77.08%) l'extrait de *P. furfuracea* de 15 min montre une autre fois les valeurs les plus élevées. De plus, les trois extraits de *Pseudevernia furfuracea* n'ont présenté aucune toxicité suite à la faible activité hémolytique présenté dont le pourcentage le plus élevé a été présenté par l'extrait 1h (3.3%) a une concentration de 4mg/ml.

En fin cinq composés ont été identifiés dont acide hexadecanoïque, ester de methyl, acide 8,11-Octadecadiénoïque, ester de methyl, Acide 9-Octadécénoïque (Z)-, ester de methyl, Acide Octadecadiénoïque, ester de methyl, et Acide 1,2-Benzénedicarboxylique, ester de diioctyl. Ces molécules sont connues avoir des effets thérapeutique tel que : la diminution de la tension artérielle, l'effet antimicrobien, des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, effets sur la prolifération cellulaires...etc.

A l'essor de cette étude, il serait souhaitable de confirmer les résultats obtenus par d'autres par des analyses plus approfondies et des test in vivo afin de valider ces résultats, comme il serait intéressant de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres antioxydant et pro-oxydant comme l'activité enzymatique de GSH, et les dégâts d'un stress oxydant comme la peroxydation lipidique en mesurant le taux de MDA afin de produire un compliment alimentaire a base *Pseudevernia furfuracea* ainsi que la réalisation d'une étude clinique dans le but de favoriser et d'inciter à l'utilisation des plantes médicinales.

Références
Bibliographiques

A

- **Ahmad, B., Khan, M. R., Shah, N. A., & Khan, R. A. (2013).** In vitro antioxidant potential of *dicliptera roxburghiana*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 140.
- **Alarcon, E., Campos, A., Edwards, A., Lissi, E., & Lopezalarcon, C. (2008).** Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts : A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chemistry*, 107(3), 1114 1119.
- **Aoussar, N., Achmit, M., Es-sadeqy, Y., Vasiljević, P., Rhallabi, N., Ait Mhand, R., Zerouali, K., Manojlović, N., & Mellouki, F. (2021).** Phytochemical constituents, antioxidant and antistaphylococcal activities of *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. And *Ramalina farinacea* (L.) Ach. From Morocco. *Archives of Microbiology*, 203(6), 2887 2894.
- **Aoussar, N., Laasri, F. E., Bourhia, M., Manoljovic, N., Mhand, R. A., Rhallabi, N., Ullah, R., Shahat, A. A., Noman, O. M., Nasr, F. A., Almarfadi, O. M., El Mzibri, M., Vasiljević, P., Benbacer, L., & Mellouki, F. (2020).** Phytochemical Analysis, Cytotoxic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Lichens. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1 11.
- **Aoussar, N., Manzali, R., Nattah, I., Rhallabi, N., Vasiljevic, P., Bouksaim, M., Douira, A., Manojlović, N., & Mellouki, F. (2017).** Chemical composition and antioxidant activity of two lichens species (*Pseudevernia furfuracea* L and *Evernia prunastri* L) collected from Morocco. 10.
- **Aoussar, N., Rhallabi, N., Ait Mhand, R., Manzali, R., Bouksaim, M., Douira, A., & Mellouki, F. (2020).** Seasonal variation of antioxidant activity and phenolic content of *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(1), 1 6.
- **Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014).** Lipid Peroxidation : Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1 31.

B

- **Bitá, A. M., Bibalou, C. N., Moutoula Boula, F. E., Okeli, P. O., & Attibayeba. (2022).** Evaluation of the Drying Quality of Two Types of Edible Mushrooms (*Termitomyces* And *Pleurotus*.) and Their Impact on the Antioxidant Content. *Open Journal of Applied Sciences*, 12(02), 256 265.

C

- **Carcy, R., Cougnon, M., Poet, M., Durandy, M., Sicard, A., Counillon, L., Blondeau, N., Hauet, T., Tauc, M., & Pisani, D. F. (2021).** Targeting oxidative stress, a crucial challenge in renal transplantation outcome. *Free Radical Biology and Medicine*, 169, 258-270.
- **Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Boudjemai, O., & Ghellai, I. (2020).** Antioxidant and hemolytic activity of *Ziziphus jujuba* Mill and *Rhamnus alaternus* L (Rhamnaceae) extracts from Algeria. : Activité antioxydante et hémolytique des extraits de *Ziziphus jujuba* Mill et *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae) d'Algérie. *Bulletin de La Société Royale Des Sciences de Liège*, 1-14.
- **Chatgililoglu, C., Ferreri, C., Krokidis, M. G., Masi, A., & Terzidis, M. A. (2021).** On the relevance of hydroxyl radical to purine DNA damage. *Free Radical Research*, 55(4), 384-404.
- **Chowaniec, K., & Rola, K. (2022).** Evaluation of the importance of ionic and osmotic components of salt stress on the photosynthetic efficiency of epiphytic lichens. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(1), 107-121.
- **Coskun, O. (2016).** *Separation Techniques : CHROMATOGRAPHY. Northern Clinics of Istanbul.*

D

- **Dary, C., Baghdikian, B., Kim, S., Mabrouki, F., Hul, S., Jabbour, F., Ollivier, E., & Bun, S.-S. (2017).** Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive alkaloids from *Stephania cambodica* using response surface methodology. *Comptes Rendus Chimie*, 20(11-12), 996-1005.
 - **Davies, M. J., & Hawkins, C. L. (2020).** The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule
 - **Dong, J.-W., Cai, L., Xing, Y., Yu, J., & Ding, Z.-T. (2015).** Re-evaluation of ABTS•+ Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products. *Natural Product Communications*, 10(12), 1934578X1501001.
- Modification, Chronic Inflammation, and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(13), 957-981.

E

- **El-Haci, I. A.; Atik-Bekkara, F.; Didi, A.; Gherib, M.; Didi, M. A. (2012).** Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*, 10(5), 280–285.
- **Emsen, B., Sadi, G., Bostanci, A., & Aslan, A. (2021).** In vitro evaluation of cytotoxic, oxidative, genotoxic, and apoptotic activities of physodic acid from *Pseudevernia furfuracea* in HepG2 and THLE2 cells. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 155(6), 1111-1120.
- **Emsen, B., Togar, B., Turkez, H., & Aslan, A. (2018).** Effects of two lichen acids isolated from *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf in cultured human lymphocytes. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 73(7-8), 303-312.

F

- **Fitzgerald, M., Heinrich, M., & Booker, A. (2020).** Medicinal Plant Analysis : A Historical and Regional Discussion of Emergent Complex Techniques. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1480.
- **Frochot, M. C., Bonneau, M. S., Ogilby, M. P., Courtade, M. E., Douay, M. M., de Conférences, M., & de Lorraine, U. (2019).** Thèse préparée et soutenue publiquement par Hélène Moulet le 5 février 2019 pour obtenir le grade de Docteur en Physique Spécialité : Milieux dilués et optique. 208.

G

- **Gacioui F., Hadj Amar Z., Oussaid S. (2013).** Extraction, optimisation et pouvoir antioxydant des polyphénols des feuilles d'oléastre. *Phytothérapie*. 2(1).30-36.
- **Gangwar, M., Gautam, M. K., Sharma, A. K., Tripathi, Y. B., Goel, R. K., & Nath, G. (2014).** Antioxidant Capacity and Radical Scavenging Effect of Polyphenol Rich *Mallotus philippensis* Fruit Extract on Human Erythrocytes : An In Vitro Study. *The Scientific World Journal*, 13.
- **Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017).** Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419-425.
- **Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselfela, H., Oued, S Mokhtar, S. M. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.

- **Guo, Y., Pizzol, R., Gabbanini, S., Baschieri, A., Amorati, R., & Valgimigli, L. (2021).** Absolute Antioxidant Activity of Five Phenol-Rich Essential Oils. *Molecules*, 26(17), 5237.
- **Güvenç, A., Küpeli Akkol, E., Süntar, İ., Keleş, H., Yıldız, S., & Çalış, İ. (2012).** Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(3), 726 734.

H

- **Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2019).** Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19683 19708.
- **Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020).** Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 38(2), 167 197.
- **Hirano, S., Ichikawa, Y., Sato, B., Takefuji, Y., & Satoh, F. (2022).** Molecular Hydrogen as a Medical Gas for the Treatment of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Possible Efficacy Based on a Literature Review. *Frontiers in Neurology*, 13, 841310.
- **Hirschenson, J., Melgar-Bermudez, E., & Mailloux, R. J. (2022).** The Uncoupling Proteins: A Systematic Review on the Mechanism Used in the Prevention of Oxidative Stress. *Antioxidants*, 11(2), 322.
- **Hossain, M. A., AL-Raqmi, K. A. S., AL-Mijizy, Z. H., Weli, A. M., & Al-Riyami, Q. (2013).** Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9), 705 710.

I

- **Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018).** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287 293.

J

- **J. Mason, T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2011).** The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237 247.

- **Jauniaux, E., & Burton, G. J. (2016).** Le rôle du stress oxydant dans les pathologies placentaires de la grossesse. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 45(8), 775-785.

K

- **Kadia, R., Bhavsar, S., Sapra, P., Pandya, H., Mankad, A., & Modi, N. (2022).** Phytochemical Investigation and Antioxidant Activity of Ethnomedicinal Plants from Ratanmahal and Udalmahuda Forest, Dahod. 14(1), 8.
- **Kalra, R., Conlan, X. A., Areche, C., Dilawari, R., & Goel, M. (2021).** Metabolite Profiling of the Indian Food Spice Lichen, *Pseudevernia furfuracea* Combined With Optimised Extraction Methodology to Obtain Bioactive Phenolic Compounds. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 629695.
- **Kamal, F. Z., Stanciu, G. D., Lefter, R., Cotea, V. V., Niculaua, M., Ababei, D. C., Ciobica, A., & Ech-Chahad, A. (2022).** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Ammi visnaga L. Essential Oil. *Antioxidants*, 11(2), 347
- **Kaushal, G. P., Chandrashekar, K., & Juncos, L. A. (2019).** Molecular Interactions Between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3791.
- **Kello, M., Kuruc, T., Petrova, K., Goga, M., Michalova, Z., Coma, M., Rucova, D., & Mojzis, J. (2021).** Pro-Apoptotic Potential of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf Extract and Isolated Physodic Acid in Acute Lymphoblastic Leukemia Model In Vitro. *Pharmaceutics*, 13(12), 2173.
- **Khiya, Z., Oualcadi, Y., Gamar, A., Amalich, S., Berrekhis, F., Zair, T., & EL Hilali, F. (2019).** In vitro Evaluation of Antioxidant Activity of the Methanol and Ethanol Extracts of *Pistacia atlantica* Desf from Morocco. *Phytothérapie*, 17(6), 321-333.
- **Kosani, M., & Manojlovi, N. (2014).** BIOLOGICAL ACTIVITIES AND CHEMICAL COMPOSITION OF LICHENS FROM SERBIA. *EXCLI Journal*, 13.

L

- **Lee, T.-H., & Kang, T.-H. (2019).** DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6092.
- **Leyane, T. S., Jere, S. W., & Houreld, N. N. (2022).** Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies : Molecular Mechanisms Involved in Counteracting

Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7273. .

- **Louerred Y., Haddi R., et Harche. M. K. (2016).** Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale *Haloxylon scoparium* POMEL. *Journal of Bioresources Valorization*, 1(1), 28p.

M

- **Maksimović, Z., Malenčić, Đ., & Kovačević, N. (2005).** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96(8), 873–877.
- **Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Radulovic, N., Mladenovic, M., Stankovic, M., Topuzovic, M., Radojevic, I., Stefanovic, O., Vasic, S., & Comic, L. (2014).** *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI journal*, 13, 938–953.

N

- **Naczk, M., & Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 95–111.
- **Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019).** Medicinal prospects of antioxidants : A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687–704.

P

- **Petrova, K., Kello, M., Kuruc, T., Backorova, M., Petrovova, E., Vilkova, M., Goga, M., Rucova, D., Backor, M., & Mojzsis, J. (2021).** Potential Effect of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf Extract and Metabolite Physodic Acid on Tumour Microenvironment Modulation in MCF-10A Cells. *Biomolecules*, 11(3), 420.
- **Petrzik, K., Koloniuk, I., Sehadová, H., & Sarkisova, T. (2019).** Chrysovirus Inhabited Symbiotic Fungi of Lichens. *Viruses*, 11(12), 1120. Phinney, N. H., Ellis, C. J., & Asplund, J. (2022). Trait-based response of lichens to large-scale patterns of climate and forest availability in Norway. *Journal of Biogeography*, 49, 286–298.
- **Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017).** Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 592–607.

R

- **Rochette, L., Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J.-C., Lorgis, L., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013).** Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases : Possible therapeutic targets? *Pharmacology & Therapeutics*, 140(3), 239-257.

S

- **ŞahiN, N., Emsen, B., Aslan, A., & Sadi, G. (2021).** Antioxidant potential of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf and its secondary metabolites on hepatocellular carcinoma cells : Regulation of antioxidant enzymes. *Anatolian Journal of Botany*.
- **Samiee, K., Rustaiyan, A., & Nurtaaj, Z. (2015).** Omega-3 fatty acids composition and lipid content from liver and muscle tissues of *Katsuwonus pelamis* in the Chabahar Port in the south west of Iran. *International Journal of Agricultural Sciences*, 5(1), v+390-392.
- **Sarikurkcü, C., Kocak, M. S., Calapoglu, M., Ocal, C., & Tepe, B. (2016).** Biological and phytochemical evaluation : *Pseudevernia furfuracea* as an alternative multifunctional agent. *Journal of Functional Foods*, 24, 11-17.
- **Šeklić, D. S., Obradović, A. D., Stanković, M. S., Živanović, M. N., Mitrović, T. L., Stamenković, S. M., & Marković, S. D. (2018).** Proapoptotic and Antimigratory Effects of *Pseudevernia furfuracea* and *Platismatia glauca* on Colon Cancer Cell Lines. *Food technology and biotechnology*, 56(3), 421-430
- **Shaaban, M. T., Ghaly, M. F., & Fahmi, S. M. (2021).** Antibacterial activities of hexadecanoic acid methyl ester and green-synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 61(6), 557-568.
- **Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., Beyrouthy, M. E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., Sharifi-Rad, J. (2020).** Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants : Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 694.
- **Sies, H. (2020).** Oxidative Stress : Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852.
- **Sies, H., & Jones, D. P. (2020).** Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363-383.
- **Singh, G., Armaleo, D., Dal Grande, F., & Schmitt, I. (2021).** Depside and Depsidone Synthesis in Lichenized Fungi Comes into Focus through a Genome-Wide Comparison of the Olivetoric Acid and Physodic Acid Chemotypes of *Pseudevernia furfuracea*. *Biomolecules*, 11(10), 1445.

- **Sjöberg, B. (2013).** Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène : L'importance de l'environnement protéique. 167.
- **Song, Z.-G., Yuan, Q., Lv, P., & Chen, K. (2021).** Research Progress of Small Molecule Fluorescent Probes for Detecting Hypochlorite. *Sensors*, 21(19), 6326.
- **Stadtman, E. R. (2006).** Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40(12), 1250-1258.

T

- **Taylor, E., Kim, Y., Zhang, K., Chau, L., Nguyen, C., Rayalam, S., & Wang, X. (2022).** *Antiaging Mechanism of Natural Compounds : Effects on Autophagy and Oxidative Stress*. 24.
- **Topal, M., Arslan Topal, E. I., Öbek, E., & Aslan, A. (2021).** Potential human health risks of toxic/harmful elements by consumption of *Pseudevernia furfuracea*. *International Journal of Environmental Health Research*, 1-8.
- **Tristán, A. I., Abreu, A. C., Aguilera-Sáez, L. M., Peña, A., Conesa-Bueno, A., & Fernández, I. (2022).** Evaluation of ORAC, IR and NMR metabolomics for predicting ripening stage and variety in melon (*Cucumis melo* L.). *Food Chemistry*, 372, 131263.

W

- **Wang, W., & Kang, P. M. (2020).** Oxidative Stress and Antioxidant Treatments in Cardiovascular Diseases. 25.
- **Wang, W., Xu, J., Fang, H., Li, Z., & Li, M. (2020).** Advances and challenges in medicinal plant breeding. *Plant Science*, 298, 110573.
- **Winterbourn, C. C. (2020).** Biological chemistry of superoxide radicals. *ChemTexts*, 6(1), 7.

Y

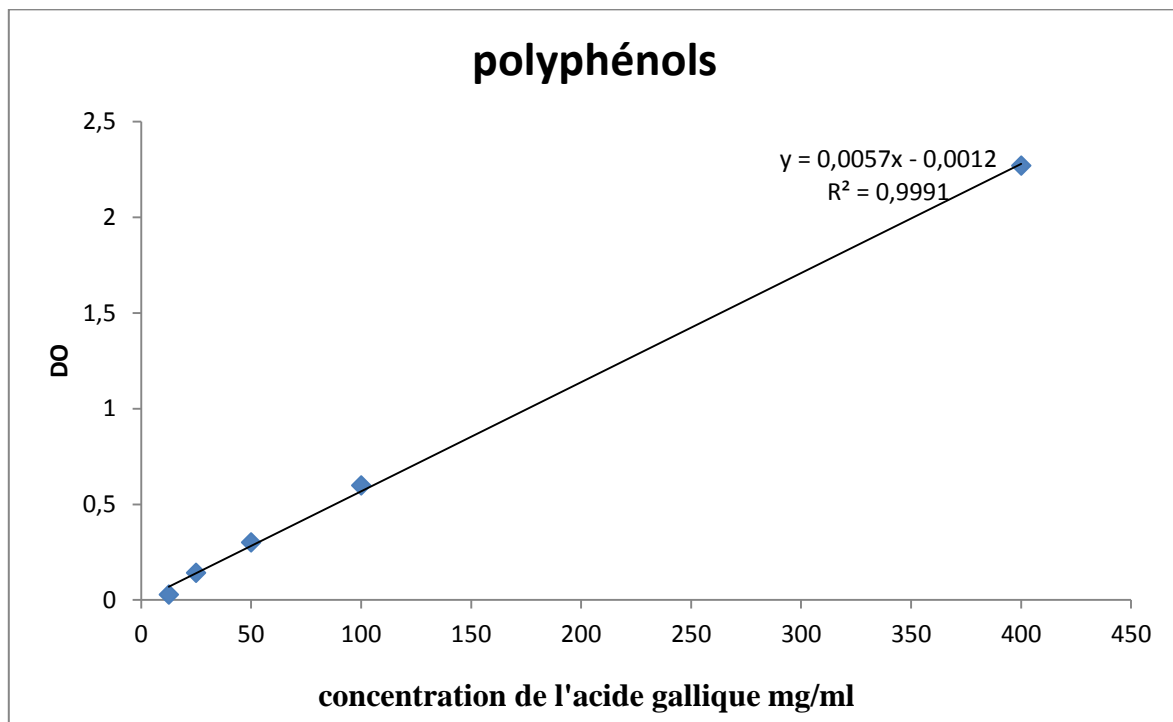
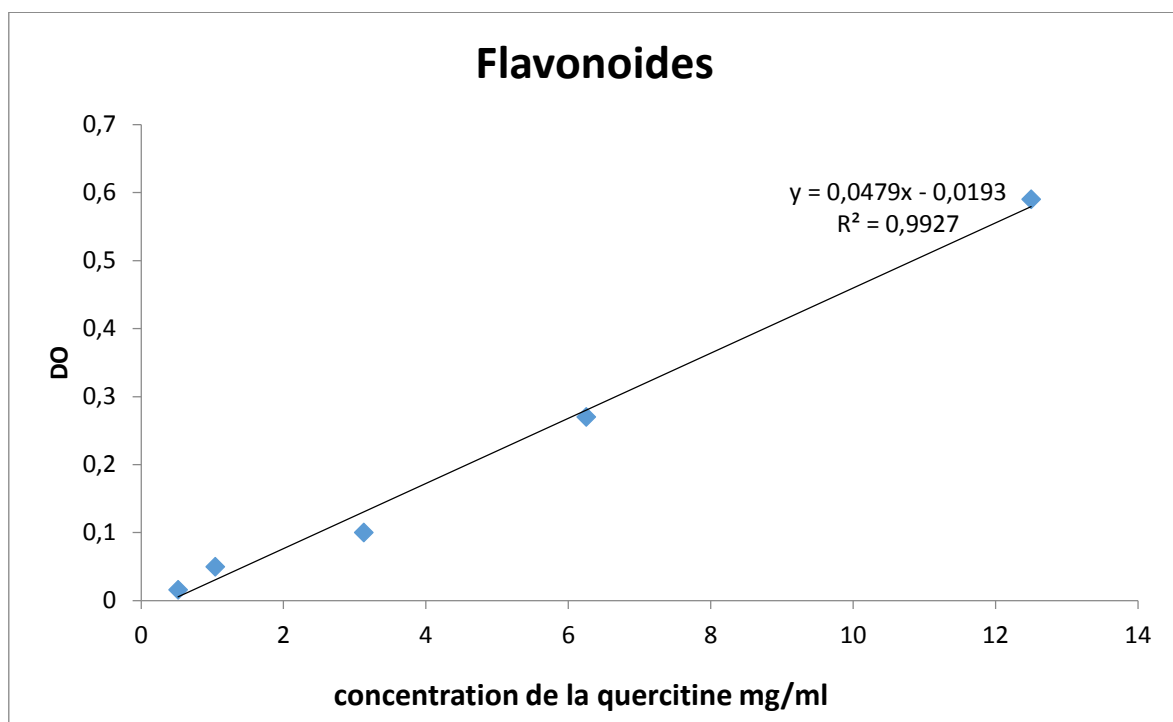
- **Yavuz, M. (2018).** A comparative study of epiphytic lichens mentioned by ibn sina and ibn al-baytar. 24.
- **Yeboah, S. O., Nasare, L. I., & Abunyewa, A. A. (2022).** Effect of landuse on floristic composition and diversity of medicinal plants in the Guinea Savanna zone of Ghana. *Heliyon*, 8 (8), e10203

- **Yeo, J., & Shahidi, F. (2019).** Revisiting DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay as a useful tool in antioxidant evaluation : A new IC100 concept to address its limitations. *Journal of Food Bioactives*, 7.
- **Yu, B., Ichinose, F., Bloch, D. B., & Zapol, W. M. (2019).** Inhaled nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 176(2), 246 255.

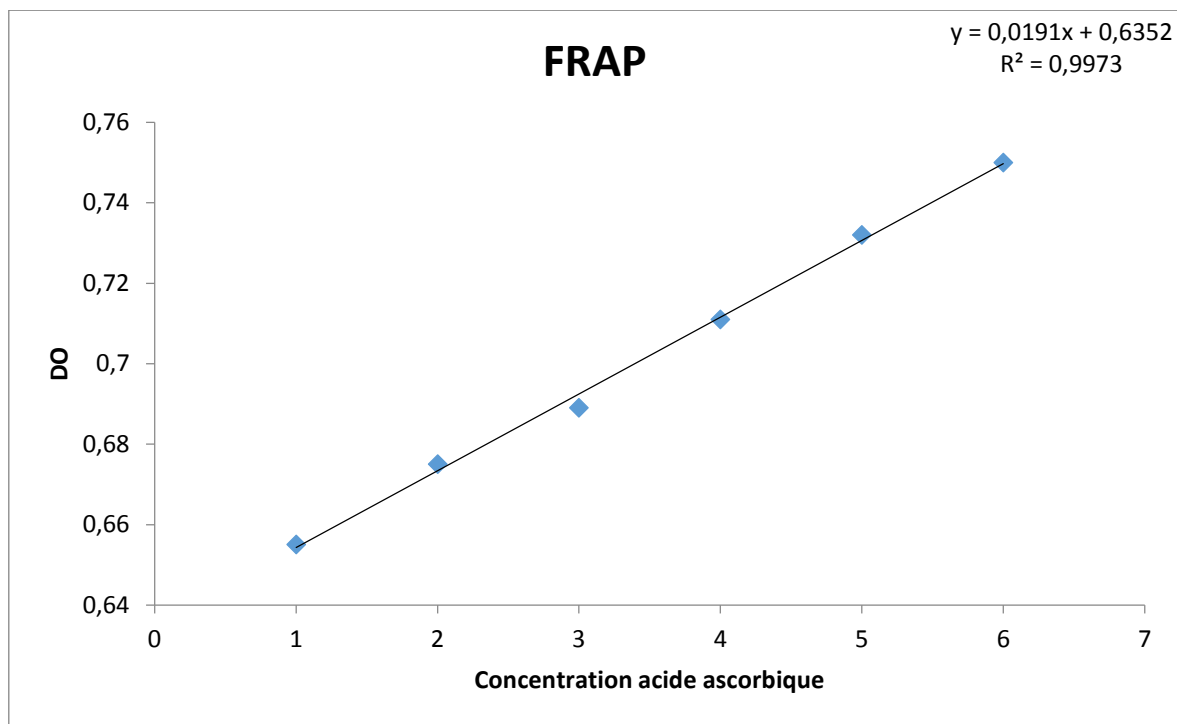
Z

- **Zhong, X.-K., Jin, X., Lai, F.-Y., Lin, Q.-S., & Jiang, J.-G. (2010).** Chemical analysis and antioxidant activities in vitro of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus indica* Mill. Cultivated in China. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 722 727.
- **Żukowski, P., Maciejczyk, M., & Waszkiel, D. (2018).** Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 92, 8 17.

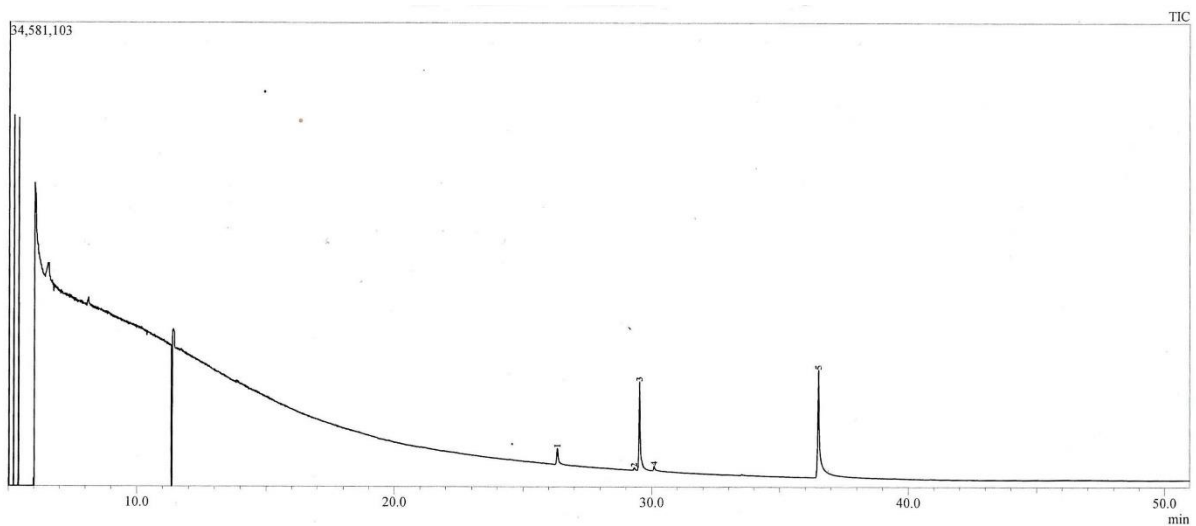
Annexes

Annexe I : Courbe d'étalonnage pour dosage des polyphénols totaux**Annexe II : Courbe d'étalonnage pour dosage des Flavonoïdes**

Annexe III : courbe d'étalonnage pour le test FRAP



Annexe IV : courbe de CG-MS



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	26.338	4978673	7.58	Hexadecanoic acid, methyl ester	74.05
2	29.317	648500	0.99	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	81.10
3	29.523	23601215	35.92	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	55.05
4	30.085	926701	1.41	Octadecanoic acid, methyl ester	74.05
5	36.510	35555505	54.11	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	149.05
		65710594			



Résumé :

Pseudevernia furfuracea est une espèce de lichens de la famille des *Parmeliaceae*, a de nombreuses utilisations, y compris commerciales et médicinales. Notre travail basé sur l'étude de l'activité antioxydante. L'extraction aux ultrasons par l'acide acétique 9% a été réalisée et 3 extraits ont été obtenus. Les extraits ont été soumis à un screening phytochimique, qui montre que la teneur en flavonoïdes et en polyphénols totaux la plus élevée ont été exhibée par l'extrait de 15min. L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par sept tests ; DPPH, OH, H₂O₂, β-carotène, FRAP dont l'extrait de 15min exhibe les valeurs les plus élevées (28.5% - 23.21% - 87.6% - 76.13% -17,99 mg EAA/g respectivement) quant au test de scavenging du radicale ABTS, le pourcentage le plus élevé a été obtenue à 82.9%. Enfin, pour le test de PPM, le pourcentage le plus élevé est de 77.08% a été enregistré pour l'extrait de 1 h a une concentration de 2mg/ml. Concernant le pouvoir hémolytique, aucune toxicité n'a été enregistrée. Une caractérisation par chromatographie phase gazeuse nous a permis de révéler la présence de 5 composés majoritaires dont Acide hexadecanoïque, ester de methyl, acide 8,11-Octadecadiénoïque, ester de methyl, Acide 9-Octadecénoïque (Z)-, ester de methyl, Acide Octadecadiénoïque, ester de methyl, et Acide 1,2-Benzenedicarboxylique , ester de diioctyl.

Mot clés : *Pseudevernia furfuracea*, lichen, DPPH, FRAP, ABTS, Activité antioxydante, GC-MS

Abstract :

Pseudevernia furfuracea is a species of lichen in the family of *Parmeliaceae*, has many uses, including commercial and medicinal. Our work based on the study of antioxidant activity. Ultrasonic extraction with 9% acetic acid was performed and 3 extracts were obtained. The extracts were subjected to a phytochemical screening, which shows that the highest flavonoid content as well as total polyphenols were observed by the 15min extract. The evaluation of antioxidant activity was carried out by seven tests; DPPH, OH, H₂O₂, β-carotene, FRAP of which the 15min extract exhibited the highest values (28.5% - 23.21% - 87.6% - 76.13% -17.99 mg AAE/g respectively) as for the ABTS radical scavenging test, the highest percentage was obtained at 82.9%. Finally, for the PPM test, the highest percentage is 77.08% was recorded by the 1 h extract at a concentration of 2mg/ml. Concerning the hemolytic power, no toxicity was recorded. A characterization by gas chromatography allowed us to reveal the presence of 5 major compounds including Hexadecanoic acid, methyl ester, 8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester, 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester, Octadecadienoic acid, methyl ester, and 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diioctyl ester

Key words: *Pseudevernia furfuracea*, lichen, DPPH, FRAP, ABTS, Antioxydant activity, GC-MS

المخلص :

بسودوفارنيا فورفوراسيا (*Pseudevernia furfuracea*) هو نوع من الأشنة في عائلة بارمالياسي (*Parmeliaceae*) ، له العديد من الاستخدامات، منها التجارية و الطبية. يعتمد عملنا على دراسة نشاط مضادات الأكسدة. تم إجراء الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية مع حمض أسيتيك 9 (acétique)% وتم الحصول على 3 خلاصات. تم إخضاع المستخلصات لفحص كيميائي نباتي، و الذي أظهر أن أعلى محتوى من الفلافونويد (flavonoïdes) بالإضافة إلى البوليفينول (polyphenols) الكلي لوحظ في المستخلص (15 دقيقة). تم إجراء تقييم النشاط المضاد للأكسدة من خلال سبعة اختبارات: DPPH, OH, H₂O₂, β-carotène, FRAP. حيث أظهر مستخلص 15 دقيقة أعلى القيم ، (28.5% - 23.21% - 87.6% - 76.13% -17.99 mg EAA/g على التوالي). بالنسبة لاختبار الكسح الجذري (ABTS) سجلت أعلى نسبة 82.9%. اما بالنسبة لاختبار (PPM) فأعلى نسبة مسجلة هي 77.08 بواسطة مستخلص (1 ساعة) بتركيز 2 مغ/ل. فيما يتعلق بالقوة الانحلالية، لم يتم تسجيل أي سمية. سمح لنا التوصيف بالكروماتوغرافيا الغازية بالكشف عن وجود 5 مركبات رئيسية بما في ذلك حمض هيكساديكانويك (hexadecanoïque)، إستر الميثيل (ester de methyl)، حمض 8، 11-اوكتاديكادينيوك إستر الميثيل. حمض 9-اوكتاديكانويك (ز)-، إستر الميثيل. حمض 1، 2-بانزنديكاربيوكسيليك، إستر ثنائي اکتيل (ester de diioctyl).

الكلمات المفتاحية : بسودوفارنيا فورفوراسيا ، *Pseudevernia furfuracea* ، الأشنة ، Antioxydant activity, GC-MS ABTS, FRAP, DPPH.