



Mémoire de Fin d'Études

Présenté en vue de l'obtention d'un Diplôme de Master 2 Recherche

«Toxicologie Fondamentale Et Appliquée »

THÈME

**Évaluation de l'effet anti-oxydant de quelques espèces
lichéniques**

Soutenu le : 04/07/2021

Présenté Par : Laguel Lilia

Nehalla Amel

Devant le jury composé de :

Dr GASMI Y	MCA	Président	UCBET
Dr ALAYAT A	MCB	Examineur	UCBET
Dr BOUMEDRIS Z	MCA	Promoteur	UCBET
Mr BELABED B	MAA	Co- Promoteur	UCBET

Remerciements

Avant tout, nous remercions « Allah » le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail.

Nous souhaitons vivement remercier et témoigner toute la gratitude à notre encadreur **Dr. BOUMEDRIS Zinedine** pour ses conseils judicieux et pour le temps consacré à l'encadrement et à l'aboutissement de ce travail ainsi qu'à la chance qu'il nous a donnée afin de vivre cette expérience qui était très riche sur le plan scientifique et pour son immense aide et confiance.

Nous exprimons aussi nos profonds remerciements à notre Co-encadreur **Mr. BELABED Bellal** d'avoir Co-encadreur et diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour son disponibilité, ses conseils, sa gentillesse et la confiance qu'il nous a accordé et qui nous a permis de réaliser ce travail.

Nous remercions **Mme GASMI Y** d'avoir accepté de présider le jury
Et **Mme ALAYAT A** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous offrons nos plus sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire où nous avons fait notre travail pratique (laboratoire de chimie).

Nous remercions également tous nos professeurs de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie qui nous ont enseigné tout au long de notre parcours

A tous les étudiants de la promotion Master TFA 2021.

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

Lilia Et Amel

Dédicace

Je dédie ce travail :

*A Dieu le Tout Puissant de m'avoir donné le courage, la santé, et m'a accordé
Son soutien durant les périodes les plus difficiles.*

Je tiens à dédier ce mémoire:

*A ma très chère Mère et à mon cher Père en témoignage et en gratitude de
leur dévouement, de leur soutien permanent durant toutes mes années
d'études, leur sacrifice illimité, leur réconfort moral, eux qui ont consentit
d'effort pour mon éducation, mon instruction et pour me voir atteindre ce but,
pour tout cela et pour ce qui ne peut être dit, mes affections sans limite, merci
pour tout, je vous aime.*

A mes très chers frères *Bassem et Amir*

*Pour l'affection et la joie qu'ils m'apportent, A eu tous, je leurs souhaite un
avenir plein de joie, de bonheur et de succès ;*

A mes sœurs *wided, Chaima, Sendess* et mes chères cousines *Farida et Hasina*

*Que j'aime profondément et à qui je souhaite beaucoup de réussite et tout le
bonheur du monde ;*

Sans oublier mes vrais amis ; *Amel, Wafa, Nabila, Chaima, Djamila, Atika, Karima, Hamida*

*Car j'ai toujours pu compter sur eux, et je les remercie pour leurs présence
dans les évènements importants de ma vie qu'ils soient triste ou joyeux ;*

A toute ma famille

A tous mes amis

Et à tous ceux qui m'ont aidé

Lilia

Dédicace

Tout d'abord, louange à « Allah » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de ce travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Je dédie ce travail Ames très chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mes chers et adorables frère et sœur : Wael et Chaima

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mon cher fiancé TAGUIDA Hamza et tout sa famille

Je vous remercie pour votre soutien, votre amour et vos encouragements. Je vous souhaite tout le bonheur du monde et une vie pleine de santé.

A mes belles amies : Lilia, Wafa, Chaima et Hamida

Merci pour l'amitié sincère que tu me portes depuis plus de 12 ans. A nos souvenirs, nos bonheurs partagés ensemble. Pour m'avoir aidée et supportée dans mes études. Que notre amitié dure toujours.

A tous mes enseignants

*A tous ma famille surtout ma cousine **Yousra** « ma sœur d'une autre mère »*

A tout ce qui m'ont transmis leur savoir et aidé à avancer

Amel

Résumé

Les lichens sont des organismes présents dans le monde entier auxquels sont attribuées à diverses activités biologiques. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits de deux espèces lichéniques *Flavoparmelia caperata* (L.) et *Parmotrema perlatum* transplantés dans une région connue par sa pollution (Sidi-brahim-Annaba).

Les dosages des composés phénoliques totaux (flavonoïdes et tannins) ont été faits après extraction en utilisant quatre solvants de polarités différentes (méthanol, eau distillé, acétone et mélange : eau distillé/méthanol) de même pour l'évaluation des propriétés anti-oxydantes via la technique de piégeage du radical libre DPPH.

Les dosages obtenus pour les flavonoïdes et pour les tannins montrent que la teneur la plus élevée en flavonoïdes est présente dans l'extrait hydro-méthanolique chez *P. perlatum* et l'extrait méthanolique chez *F. caperata*. Alors que la teneur la plus élevée en tanins est présent dans l'extrait acétonique pour *P. perlatum* et dans l'extrait hydro-méthanolique chez *F. caperata*. L'estimation quantitative par la méthode de spectrophotométrie des flavonoïdes et des tannins ont montrés que les extraits sont riches en ces composés avec une différence significative entre les fractions. Les lichens ont démontré une activité anti-oxydante modérée par rapport à l'acide ascorbique. Cette activité était plus importante dans la *F. caperata*.

Mots clés : lichen, *Flavoparmelia caperata* (L.), *Parmotrema perlatum*, flavonoïdes, tannins, activité anti-oxydante, DPPH.

Summary

Lichens are organisms found all over the world which are attributed to various biological activities. This work aims to evaluate the antioxidant activity of extracts of two lichenic species *Flavoparmelia caperata* (L) and *Parmotrema perlatum* transplanted into a polluted area (Sidi-brahim-Annaba).

The dosages of the total phenolic compounds (flavonoids and tannins) were made after the extraction using four solvents with different polarities (methanol, distilled water, acetone and mixture: distilled water/methanol) and the evaluation of the antioxidant properties was made via the technique of trapping of the free radical DPPH.

The dosages obtained for the flavonoids and for the tannins show that the highest content of flavonoids is present in the hydro-methanolic extract in *P. perlatum* and the methanolic extract in *F. caperata* while the highest tannins content is present in the acetone extract of *P. perlatum* and in the hydro-methanolic extract in *F. caperata* . The quantitative estimation through the spectroscopic analyses of the extracts showed that they are rich in these compounds with a significant difference between fractions. The lichens demonstrated a moderate antioxidant activity compared to ascorbic acid. This activity is importantE in *F. caperata*.

Keywords: lichen, *Flavoparmelia caperata* (L), *Parmotrema perlatum*, flavonoids, tannins, anti-oxidant activity, DPPH.

ملخص

الأشنيات هي كائنات حية موجودة في جميع أنحاء العالم تنسب إليها أنشطة بيولوجية مختلفة. هذا العمل هو جزء من تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات نوعين من الأشنة *Flavoparmelia caperata* و *Parmotrema perlatum* المزروعتين في منطقة سيدي ابراهيم (عنابة).

تم إجراء فحوصات المركبات الفينولية الكلية (الفلافونويد والتانين) بعد استخلاصها باستخدام أربعة مذيبات مختلفة القطبية (ماء مقطر، ميثانول، أسيتون وخليط ماء مقطر/ميثانول) وتقييم خصائص مضادات الأكسدة عن طريق تقنية إصطياد الجذر الحر DPPH.

أظهرت التركيزات التي تم الحصول عليها أن أعلى محتوى من الفلافونويد موجود في مستخلص الميثانول المائي لـ *P. perlatum* و المستخلص الميثانولي لنفس الصنف *F. caperata* و كذلك تحتوي على أعلى محتوى من التانين في مستخلص الأسيتون لـ *P. perlatum* و المستخلص المائي-الميثانولي لـ *F. caperata*. أظهر التقييم الكمي بطريقة القياس الطيفي الفلافونويد والتانين أن المستخلصات غنية بهذه المركبات مع وجود فروق كبيرة بينها. أظهرت الأشنيات نشاطاً معتدلاً مضاداً للأكسدة مقارنة بحمض الاسكوربيك. هذا النشاط له أهمية أكبر عند *F. caperata*.

الكلمات المفتاحية: أشنيات، *Parmotrema perlatum*, *Flavoparmelia caperata* (L.)، فلافونويد، تانين، نشاط مضاد للأكسدة، DPPH.

Liste des figures

Figure 1 : Lichens.....	6
Figure 2 : Coupe verticale à travers le corps d'un lichen Coupe verticale à travers le corps d'un lichen)	7
Figure 3 : Répartition des lichens (UCL – Scienceinfuse - Antenne Facultaire pour la Promotion des sciences)	8
Figure 4 : Les différentes morphologies des thalles A) Thalle crustacé (<i>Lecanora rupicola</i>), B) Thalle foliacé (<i>Parmelia sulcata</i>), C) Thalle fruticuleux (<i>Usnea filipendula</i>), D) Thalle Squamuleux (<i>Squamarina cartilaginea</i>), E) Thalle gélatineux (<i>Collema flaccidum</i>), F) Thalle composite (<i>Cladonia cristatella</i>), G) Thalle lépreux (<i>Lepraria incana</i>).....	9
Figure 5 : Images en microscopie électronique à transmission d'une structure homéomère (a) et d'une structure hétéromère (b).....	11
Figure 6 : Représentation des organes de reproduction sexuée chez les lichens. a) Apothécie. b) Périthèce d' <i>Arthopyrenia alba</i>	12
Figure 7 : Schéma représente la reproduction sexuée par les apothécies.....	12
Figure 8 : Schéma représente la reproduction asexuée par les soralies	13
Figure 9 : Schéma représente la reproduction asexuée par les isidies.	13
Figure 10 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens.....	14
Figure 11 : Les voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques.....	17
Figure 12 : Activité biologique des polyphénols	20
Figure 13 : structure de base des flavonoïdes	21
Figure 14 : structure de base des coumarines.....	21
Figure 15 : La balance oxydants/anti-oxydantes en équilibre.....	23
Figure 16 : Source des radicaux libres	26
Figure 17 : <i>Parmelia caperata</i> (L.)	33
Figure 18 : <i>Parmotrema perlatum</i>	33
Figure 19 : localisation géographique de la région d'étude Annaba	35
Figure 20 : récolte des échantillons.....	36
Figure 21 : poudre du lichen dans le mortier	37
Figure 22 : Protocole d'extraction de deux matières végétale	39
Figure 23: protocole des dosages des flavonoïdes	41
Figure 24 : dosage de flavonoïde	41
Figure 25 : protocole des dosages des tannins	42
Figure 26 : dosage des tannins	43
Figure 27: Structure chimique du radical libre DPPH · (2,2 DiPhenyle-1-Picryl Hydrazyle) 44	
Figure 28: Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl).....	44
Figure 29: Protocole du test au DPPH.	45
Figure 30: Le taux d'humidité des deux espèces lichéniques	49
Figure 31: Mesure de l'absorbance en fonction de longueur d'onde dans chaque extrait de <i>F. caperata</i>	50
Figure 32 : Mesure de l'absorbance en fonction de longueur d'onde dans chaque extrait de <i>P. perlatum</i>	53
Figure 33: dosage des flavonoïdes selon les solvants	56

Figure 34: comparaison du dosage des tannins selon les solvants.....	59
Figure 35: Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH en fonction des concentrations	60
Figure 36: Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH en fonction des concentrations.	62
Figure 37: Concentration inhibitrice de 50% du radical DPPH des deux extraits et l'acide ascorbique.....	63

Liste des Tableaux

Tableau 1: Présentation Des Différents Radicaux Libres	25
Tableau 2: la coloration des extraits des deux espèces.	48
Tableau 3 : le taux d'humidité H% des deux espèces lichéniques.....	48
Tableau 4: la teneur des flavonoïdes en mg EQ/g MS chez les deux espèces.....	55
Tableau 5: la teneur des tannins en mg EC/g MS chez les deux espèces.	58
Tableau 6: IC50 des deux extraits et de l'acide ascorbique	62

Liste des abréviations

Abs	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	acide gras polyinsaturés
CAT	Catalase
DO	densité optique
DPPH	2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
EQ	Equivalent de la quercétine
ERN	espèce réactives de l'azote
ERO	espèces réactives de l'oxygène
GSH	glutathion réduit
GSH-PX	glutathion peroxidase
GSSG	Global Stratotype Section and Point
IC50	Concentration inhibitrice à 50%
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
LDL	lipoprotéine de base densité (Low density lipoprotein)
mg EC/g MS	milligramme équivalents de catéchine par gramme de matière sèche
mg EQ/g	milligramme équivalents de quercétine par gramme
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	nuclear factor –kappa B
N-oxyde	Amine oxyde
O₂⁻	Anion superoxyde
OH.	Radical hydroxyle
ONOO-	Peroxynitrite
RCHO	Aldéhydes
RL	radical libre
RNS	Espèces dérivés de l'azote
RO.	Radical alkoxyle
ROO.	Radical peroxyde

ROOH

Hydro-peroxydes

ROOH

Peroxyde organique

ROS

Reactive oxygene species

-SH

système harmonisé

SOD

superoxyde dismutase

Table de matières

Introduction générale.....	6
----------------------------	---

Partie bibliographique

Généralités sur les lichens

I. Généralités sur les lichens.....	6
I.1 Définition.....	6
I.2 Ecologie et répartition des lichens	7
I.3 Morphologie et anatomie des lichens	8
I.3.1 Différentes formes de thalles lichéniques	8
I.3.2 Différentes structures anatomiques des thalles	10
I.4 Reproduction des lichens.....	11
I.4.1 Reproduction Sexuée	11
I.4.2 Reproduction végétative ou asexuée.....	12
I.5 Echanges nutritionnels entre les partenaires.....	13
I.6 Usages des lichens	14

Généralités sur les métabolites lichéniques

II. Généralités sur les métabolites lichéniques	15
II.1 Les métabolites primaires	15
II.2 Les métabolites secondaires	16
II.2.1 Voies de biosynthèse des métabolites secondaires.....	16
II.2.2 Classifications et fonctions des métabolites secondaires	18
II.2.3 Les composés bioactifs phénoliques	20

Activité antioxydante des métabolites secondaires

III. Activité antioxydante des métabolites secondaires	23
III.1 Le stress oxydant	23
III.2 Les radicaux libres.....	24
III.2.1 Formes des radicaux libres	24
III.2.2 Sources des radicaux libres	25
III.3 Les espèces réactives de l'oxygène	26
III.4 Conséquence du stress oxydatif.....	26
III.5 Biomarqueurs du stress oxydant.....	26
III.5.1 Biomarqueurs de l'oxydation des lipides	27

III.5.2	Biomarqueurs de l'oxydation des protéines	27
III.5.3	Biomarqueurs de l'oxydation des acides nucléiques :	27
III.6	Les molécules antioxydantes	28
III.6.1	Les antioxydants endogènes	28
III.6.2	Les antioxydants exogènes	29
III.6.3	Mécanismes d'action des antioxydants	30

Partie expérimentale

Matériel & méthodes

1.	Matériel végétal	33
2.	Classification des espèces	33
2.1.	<i>Flavoparmelia caperata</i>	33
2.2.	<i>Parmotrema perlatum</i>	33
3.	Description des espèces.....	34
3.1.	<i>Flavoparmelia caperata</i>	34
3.2.	<i>Parmotrema perlatum</i>	34
4.	Description de la zone d'étude	34
5.	Récolte et choix des échantillons	35
6.	Identification des espèces	36
7.	Préparation des échantillons	36
8.	Test d'humidité	37
9.	Préparation de l'extrait lichénique	38
9.1.	Choix du solvant et du type d'extraction	38
9.1.1.	Choix du solvant	38
9.1.2.	Type et préparation de l'extraction	38
10.	Paramètres mesurés	39
10.1.	Mesure de l'absorbance [tracer la courbe $DO=f(\lambda)$]	39
10.2.	Dosages des composés phénoliques	40
10.2.1.	Dosage des Flavonoïdes	40
10.2.2.	Dosages des tannins	42
10.3.	Evaluation de l'activité antioxydante	43
10.3.1.	Evaluation de l'effet anti radicalaire contre le radical DPPH	43

10.3.2. Teste de piégeage du radical libre DPPH.....	43
------------------------------------------------------	----

Résultats et discussions

1. Description des extraits	48
2. Test d'humidité.....	48
3. paramètres mesurés	50
3.1. Mesure de l'absorbance [traçage de la courbe $DO=f(\lambda)$]	50
3.2. Dosages des composés phénoliques.....	55
3.2.1. Dosages des flavonoïdes	55
3.2.2. Dosages des tannins.....	58
3.3. Evaluation de l'effet anti radicalaire contre le radical DPPH	60
Conclusion et perspectives	70
Références bibliographiques	73

Introduction

Introduction générale

Les conséquences sanitaires et environnementales de la pollution atmosphérique sont devenues au cours des dernières décennies un des problèmes majeurs de notre société **(Faburé, 2008 in Boudebouda et Hank, 2013)**. L'évaluation et le contrôle de la pollution afin de prendre des décisions au profit de l'environnement est une nécessité pour les états et les organisations internationales. Ceci peut être envisageable via deux méthodes : physico-chimiques reposant sur l'utilisation des capteurs qui donne des valeurs et des concentrations des polluants dans l'air et l'autre méthode est par la bio-indication.

Le manque, et les contraintes financières des capteurs, qui mesurent les concentrations des polluants atmosphériques ont conduit à l'utilisation des techniques alternatives pour l'évaluation de la qualité de l'air, notamment par l'application de la bio-indication végétale **(Samhoune, 2001)**.

La surveillance de la qualité de l'air par bio-indication repose sur l'utilisation d'organismes bio-indicateurs qui permet d'observer et d'analyser leurs réactions de façon plus ou moins chronique à des polluants atmosphériques Parmi ces organismes, les lichens se sont révélés être d'efficaces sentinelles dans la détection de la pollution et dans l'évaluation de la qualité environnementale **(Boudebouda et Hank, 2013)**.

« Lichens...» Souvent confondus avec les mousses, ils présentent une telle diversité de formes et de couleurs. Les lichens sont des organismes singuliers résultant de l'association entre un champignon et un ou plusieurs partenaires photosynthétiques ; cette relation symbiotique leur confère notamment l'incroyable aptitude à coloniser des habitats extrêmes, faisant d'eux de véritables pionniers **(Dieu, 2015)**.

Les civilisations anciennes connaissaient déjà les propriétés remarquables des lichens : les égyptiens les utilisaient par exemple pour préserver l'odeur des épices d'embaumement ou encore pour traiter les maux. Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de substances biologiquement actives **(Dieu, 2015)**, vu leurs propriétés anti-oxydantes, cytotoxiques, antivirales, et antibactériennes **(Kosanic et al., 2011 in Yedri et Hebbache, 2018)**.

Leur grande sensibilité aux changements environnementaux permet leur utilisation comme bio-indicateurs. Ainsi, la bio-indication lichénique est devenue un outil de surveillance de la qualité de l'environnement et en particulier celui de la qualité de l'air.

Introduction générale

En effet, si certains lichens sont sensibles à la pollution, d'autres s'avèrent très résistants à des environnements hostiles. Cette résistance est en grande partie liée aux propriétés biologiques de métabolites secondaires originaux, essentiellement produits par le partenaire fongique **(Dieu, 2015)**.

Les lichens produisent des métabolites secondaires spécifiques avec un large éventail de structure possédant de multiples activités biologiques, compte tenu de la grande diversité de leur écosystème et de leur capacité à s'adapter à des conditions environnementales extrêmes. Cette capacité exceptionnelle de résistance en fait des espèces pionnières **(Aptroot, 2001)**. L'étude de ces métabolites a conduit à la révélation de plusieurs activités : anti-inflammatoire, anti-tumoral, anti-cancérogène, antibactérienne et anti-oxydante **(Friardi, 2012 in Agroum et koucha, 2016)**.

Parmi les 1050 substances lichéniques décrites **(Stocker-Wörgötter, 2008 in Kout et Chihel, 2018)**, seules quelques-unes sont disponibles commercialement, et le potentiel d'une grande partie d'entre elles reste peu voire pas étudié. En effet, la principale difficulté est d'extraire et d'isoler ces composés en quantité suffisante, avec une pureté convenable, pour en préciser les structures et en évaluer l'activité biologique **(Muggia et al., 2009 in Kout et Chihel, 2018)**.

Le pouvoir anti-oxydant d'une molécule englobe différents mode d'action tels que la capacité à réduire les métaux impliqués dans des réactions générant des radicaux, et le potentiel à piéger et neutraliser les radicaux libres pouvant être engagés dans la peroxydation lipidique. **(Lohézie-Ledevéhat et al., 2007 in Yedri et Hebbache, 2018)**.

Malgré leur forte présence en Algérie, les lichens sont souvent mal étudiés et surtout sur le plan systématique et même pour leurs métabolites secondaires et leurs effets thérapeutiques, ce qui nous a encourager à mettre comme but de cette étude la valorisation des espèces lichéniques locales et l'évaluation de leur effet anti-oxydant en liaison avec la pollution atmosphérique.

La problématique de cette étude peut être résumée en deux questions : est-ce que les espèces locales ont des potentialités anti-oxydants et quel est l'effet du stress (la pollution) sur cette production des anti-oxydants ? Afin de répondre à ces questions, on a divisé le travail en deux principaux volets : volet théorique (partie bibliographiques), qui est divisé à son tour en plusieurs chapitres dans lesquels on décrit : généralités sur les lichens (aspects, écologie et

Introduction générale

répartition, morphologie et anatomie, reproduction, échanges nutritionnels entre les partenaires et l'intérêt pratiques des lichens), généralité sur les métabolites des lichens (les métabolites primaires et les métabolites secondaires) et l'activité anti-oxydante des métabolites secondaires (le stress oxydant, les radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène, conséquence du stress oxydatif, bio marqueurs du stress oxydant, les molécules anti-oxydants et mécanismes d'action des anti-oxydants). Un deuxième volet pratique (matériel et méthodes, résultats et discussion), dans lesquels on décrit les méthodologies de dosage et les résultats obtenus ainsi que leur discussion et ceci concernant : les flavonoïdes, les tanins, test de piégeage du radical DPPH).

Il est à noter que la réalisation de ce travail a fait face à plusieurs problèmes surtout pour le volet pratique, où plusieurs obstacles ont été rencontrés citant essentiellement le manque des produits et du matériel nécessaire pour effectuer les différents dosages cités dans ce travail ; ce manque flagrant nous a empêché de réaliser plusieurs autres paramètres qui sont d'une importance considérable.

Ce travail a pour objectif la réalisation d'une étude sur l'activité anti-oxydante en exploitant la composition phytochimique des espèces lichéniques échantillonnées et qui sont deux espèces *Flavoparmelia caperata* (L.) et *Parmotrema peralatum*.

Le présent travail est effectué au niveau des laboratoires de chimie au sein de l'université Chadli Benjdid d'El-Tarf. Le stage s'est déroulé à partir du mois de Avril jusqu'au mois de Juin.

Partie
bibliographique

I. Généralités sur les lichens

I.1 Définition

Les lichens sont des organismes symbiotiques singuliers (**Dieu, 2015**) résultant de la symbiose entre un champignon, le mycobionte et une algue, phytobionte procaryote (cyanobactéries dans 10% des cas) ou eucaryotes (algue verte chlorophyceae) dans 80% des cas et dans 5% des cas les trois partenaires sont associés (symbiose tripartite) (**Amirouche et al., 2008**).

Cette symbiose confère aux lichens une structure et une reproduction spécifiques par rapport à chaque constituant seul. A la différence des plantes supérieures, ils ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille, mais un appareil végétatif rudimentaire qui est le thalle. La découverte de fossiles suggère qu'ils seraient apparus il y a quelques 600 millions d'années (**Yuan et al., 2005 in Dieu, 2015**).



Figure 01 : Lichens (Dieu, 2015).

Le champignon est responsable de la morphologie du lichen, c'est-à-dire son corps qui est appelé thalle. Le thalle est formé par un réseau de filaments nommés hyphes (ils sont comparables au mycélium des champignons). C'est au milieu d'un enchevêtrement de ces filaments que se trouvent les algues (**Bertrand et Bauwens , 2003**).

Au niveau de la partie inférieure du thalle, on observe un entrelacement de filaments servant à fixer le lichen à un support, ce sont les rhizines (figure 02).

Partie bibliographique

Les lichens produisent des métabolites secondaires spécifiques avec un large éventail de structures possédant de multiples activités biologiques, compte tenu de la grande diversité de leur écosystème et de leur capacité à s'adapter aux conditions environnementales extrêmes. Cette capacité exceptionnelle de résistance en fait des espèces pionnières. **(Hans, 2011).**

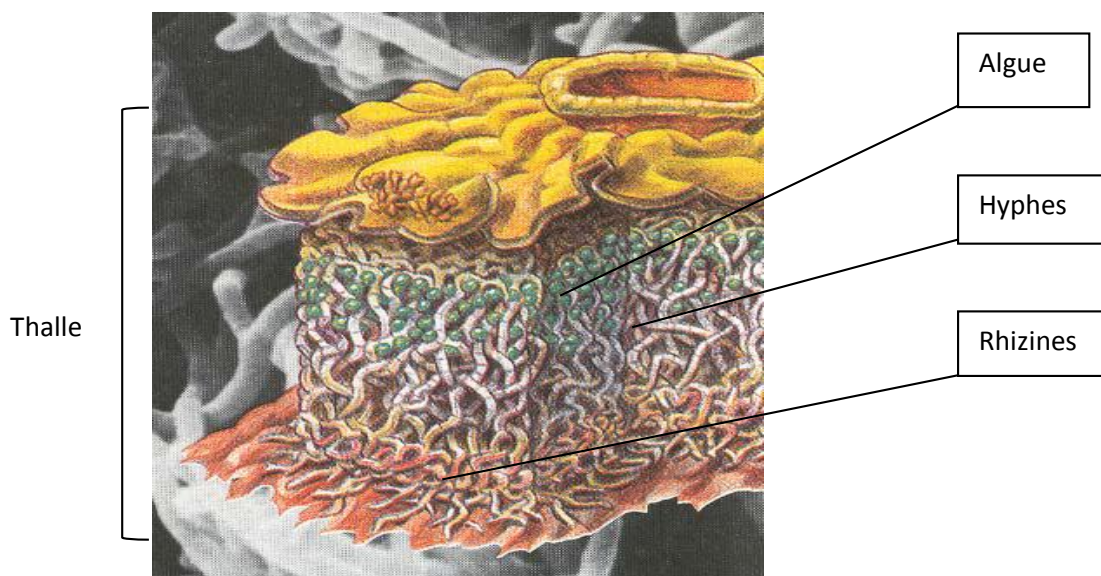


Figure 02 : Coupe verticale à travers le corps d'un lichen **(Bertrand et Bauwens , 2003)**

I.2 Ecologie et répartition des lichens

Les lichens sont répandus à travers presque toutes les régions du monde : des zones les plus extrêmes, vers les pôles, jusqu'aux sommets, dans les déserts rocheux, et représentent environ 8 % de la couverture terrestre.

Les lichens se rencontrent sur divers substrats, la plupart d'entre eux se trouvent sur les écorces (corticoles) ou sur les roches (saxicoles), mais ils se développent aussi sur les bois morts (lignicoles), les sols (terricoles), les mousses, les feuilles persistantes (folicoles). Certains lichens sont spécifiques des roches calcaires (calcicoles) ou des roches siliceuses (calcifuges) **(Belkhir et Slimani, 2016).**



Figure 03 : Répartition des lichens (**Bertrand et Bauwens, 2003**) (UCL – Scienceinfuse - Antenne Facultaire pour la Promotion des sciences)

I.3 Morphologie et anatomie des lichens

I.3.1 Différentes formes de thalles lichéniques

Le thalle lichénique, l'appareil végétatif du lichen, étant dépourvu de racine, de stomate et de cuticule (**Humbert, 2012**). Il est formé par un réseau de filaments nommés hyphes. Le thalle dépend totalement et uniquement de l'atmosphère, de l'eau et du soleil pour sa nutrition. Il porte les éléments nécessaires à la reproduction et est caractérisé par une grande diversité de formes et de couleurs qui définit sept principaux types de lichens (**Roger et al., 2007 ; Jean, 2010**):

- **Les thalles crustacés** : Sous forment des croûtes qui sont si solidement fixées au substrat qu'elles ne peuvent être enlevées sans endommager le lichen ou le substrat. (Figure 4a)
- **Les thalles foliacés** : se présentent sous forme de lames ou de feuilles, plus ou moins lobées ou découpées, se détachant facilement du substrat, Le thalle est fixé au substrat soit par des rhizines soit par des crampons. (figure 4b).
- **Les thalles fruticuleux** : sont les plus tridimensionnels, formant généralement des branches cylindriques qui peuvent pousser vers le haut. (figure 4c).
- **Le thalle squamule** : ont des lobes qui ressemblent à des écailles et qui sont généralement petits et trop grands. (figure 4d)
- **Les thalles gélatineux** : ont une structure unicellulaire de fils fongiques entrelacés avec des algues dispersées entre eux et ont une texture caoutchouteuse semblable à de la gelée. (figure 4e).

Partie bibliographique

- **Les thalles complexes** : ou thalles composites sont formés d'un thalle primaire plus ou moins foliacé et adhérent au substrat, sur lequel se développe un thalle secondaire dressé plus ou moins ramifié ou en forme de trompette (podétion). (figure 4f).
- **Les thalles lépreux** : ressemblent à de la poudre se détachant facilement du substrat. (figure 4g).



Thalle crustacé (a)



Thalle foliacé (b)



Thalle fruticuleux (c)



Thalle Squamuleux (d)



Thalle gélatineux (e)



Thalle composite (f)



Thalle lépreux (g)

Figure 04. Les différentes morphologies des thalles A) Thalle crustacé (*Lecanora rupicola*), B) Thalle foliacé (*Parmelia sulcata*), C) Thalle fruticuleux (*Usnea filipendula*), D) Thalle Squamuleux (*Squamarina cartilaginea*), E) Thalle gélatineux (*Collema flaccidum*), F) Thalle composite (*Cladonia cristatella*), G) Thalle lépreux (*Lepraria incana*) (Masson, 2014)

I.3.2 Différentes structures anatomiques des thalles

Histologiquement, en dépit de ces morphologies remarquablement différentes, les lichens présentent une certaine unité mais deux types de structures doivent être distingués. La distinction est fondée sur la répartition des cellules algales à l'intérieur du thalle (**Collombert, 1989 ; Nash III, 2008**) :

a. Structure homéomère : Les lichens à structure homéomère ont des cellules algales réparties de façon homogène dans les filaments mycéliens. En tout point du thalle, il y a à la fois algue et champignon.

b. Structure hétéromère : La grande majorité des lichens adopte une organisation dite hétéromère qui correspond à une structure stratifiée ou radiée comprenant les tissus suivants, de la surface vers la profondeur du lichen :

1. **Structure stratifiée** composée de différentes couches organisées :

- **Un cortex supérieur** : il est formé de filaments mycéliens soudés, à parois plus ou moins épaissies ;
- **Une couche gonidiale** : elle est formée par des algues entourées de filaments mycéliens ;
- **Une couche d'hyphes** : plus ou moins densément entrecroisées ou parallèles constituant la médulle ;
- **Le cortex inférieur** est souvent fortement pigmenté, se termine par des hyphes s'enfonçant dans le substrat par un cortex inférieur éventuellement muni de rhizines. Sa capacité à absorber l'eau directement est bien documentée.

2. **Structure radiée** : mêmes couches que la structure stratifiée mais disposées de façon concentrique.

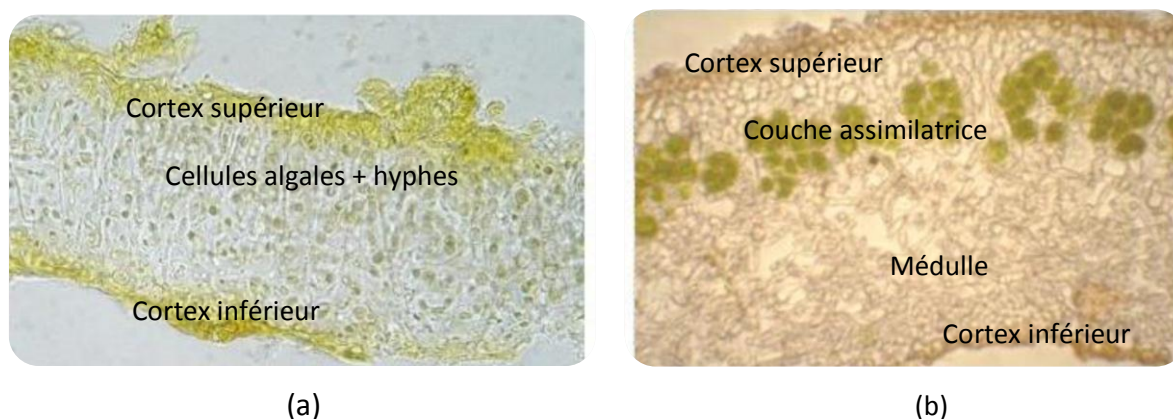


Figure 05 : Images en microscopie électronique à transmission d'une structure homéomère (a) et d'une structure hétéromère (b) (**Aprile et al., 2011**).

I.4 Reproduction des lichens

Les lichens sont capables de se reproduire selon deux modes : soit par reproduction végétative, soit par reproduction sexuée (rencontre des spores fongiques avec un photobionte). Chez la majorité des lichens, la reproduction sexuée est très largement prédominante (**Murtagh et al., 2000**).

4.1. Reproduction Sexuée

Seul le partenaire fongique (champignon seul) se reproduit de façon sexuée par la production de spores. En effet, selon **Serussiaux et al., (2004) in Derdane et Khelifi (2017)**, la spore ne contient que le partenaire fongique et une fois libérée doit obligatoirement trouver son algue ou sa cyanobactérie. A présent, on ne connaît pas de mycobionte se développant sans photobionte. L'inverse n'est pas vrai, toutes les algues et cyanobactéries que l'on rencontre dans les lichens existent à l'état libre. Les spores contenues dans des asques (sac microscopique où se forment les spores) sont produites par les apothécies (figure 6a) ou les périthèces (Figure 6b) qui se distinguent par leur aspect.

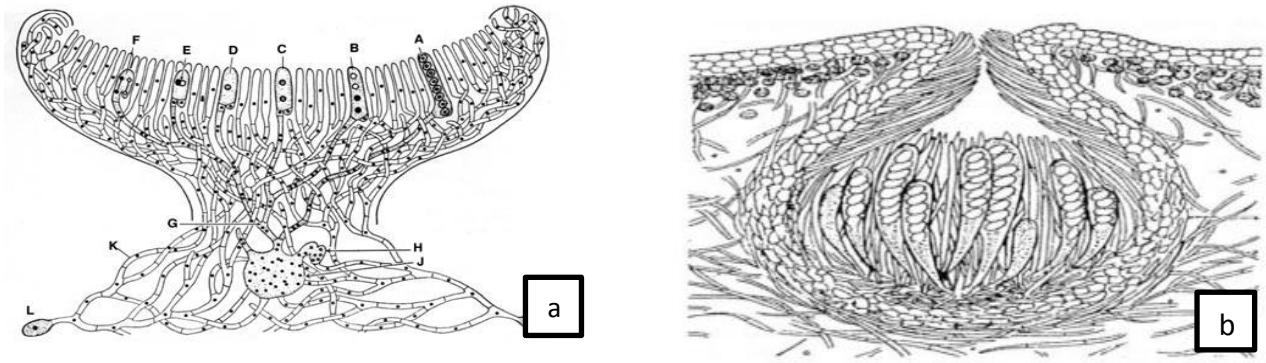


Figure 04 : Représentation des organes de reproduction sexuée chez les lichens. a) Apothécie.
b) Périthèce d'*Arthopyrenia alba* (Poelt, 1969 in **Derdane et Khelifi, 2017**).

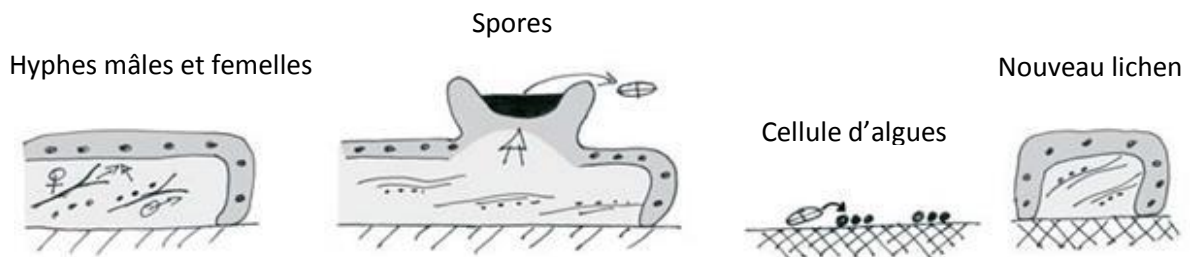


Figure 07 : Schéma représente la reproduction sexuée par les apothécies (**Bellenfant et al., 2010**).

1.4.2. Reproduction végétative ou asexuée

La reproduction asexuée (algue associée au champignon) est assurée par la dissémination du complexe lichénique contenant cellules algales et cellules mycéliennes. Les structures associées à ce mode de reproduction sont les sorédies et les isidies. Cependant, la fragmentation du thalle sec libérant directement des complexes lichéniques dans le milieu est possible sans demander de structure particulière (**Derdane & Khelifi, 2017**).

► **Reproduction asexuée par sorédies :** le thalle se déchire et laisse pousser des sortes de bosses appelées soralies de couleur différente de la surface du thalle. Ces soralies émettent de petits granules légers appelés sorédies qui se séparent facilement du thalle puis sont transportées par le vent ou les animaux. Les sorédies permettent la colonisation de nouveaux lieux parfois très éloignés (Figure 8).

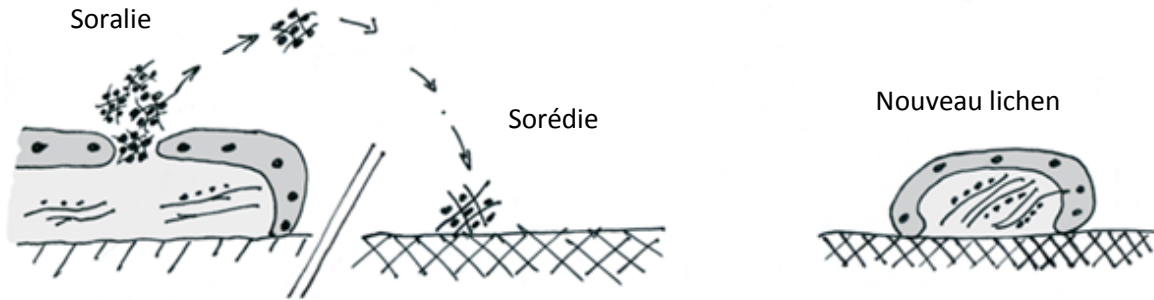


Figure 08. Schéma représente la reproduction asexuée par les soralies (**Bellenfant *et al.*, 2010**).

► **Reproduction asexuée par isidies** : le thalle émet des petits bourgeons de la même couleur que la surface du thalle appelés isidies. Ces isidies se détachent mais, plus lourdes, elles tombent à proximité et permettent la colonisation d'un même endroit (ex : parois rocheuses ou murs) (Figure 9) (**Derdane & Khelifi, 2017**).

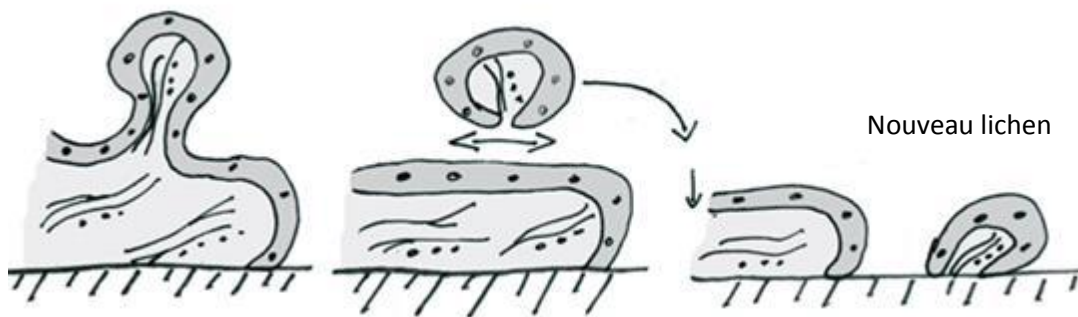


Figure 09 : Schéma représente la reproduction asexuée par les isidies (**Bellenfant *et al.*, 2010**).

I.5 Echanges nutritionnels entre les partenaires

Au sein du lichen, le mycobionte assure la structure et la protection physique de l'ensemble ainsi que la reproduction sexuée, tandis que le photobionte apporte, via la photosynthèse, la matière organique carbonée, ce qui fait du lichen un organisme autotrophe. Le champignon, grâce aux rhizines, a un rôle de fixation sur le substrat. Aussi, il fournit au photobionte l'eau, les sels minéraux et des vitamines telles que la vitamine C. Le mycobionte peut parfois vivre en saprophyte en exploitant les substances organiques du milieu, ou en parasite sur un autre

lichen. Les algues vertes produisent de nombreux composés nécessaires au champignon, en particulier de la vitamine B et des polyols, dérivés des sucres (Dieu, 2015).

Dans le cas des cyanobactéries, le carbone est cédé au champignon plutôt sous forme de glucose. Elles sont aussi capables de fixer l'azote atmosphérique, fourni au champignon sous forme d'ammonium. Les polyols et le glucose sont ensuite transformés par le champignon en polysaccharides (du D-mannitol et du D-arabitol) qui contribueront à la création de métabolites secondaires plus complexes, appelés substances lichéniques (figure 10). L'association symbiotique permet donc la production de composés originaux et spécifiques qui ne pourraient pas être synthétisés par chaque individu seul (Van Haluwyn *et al.*, 2009 in Agroum et Koucha, 2016).

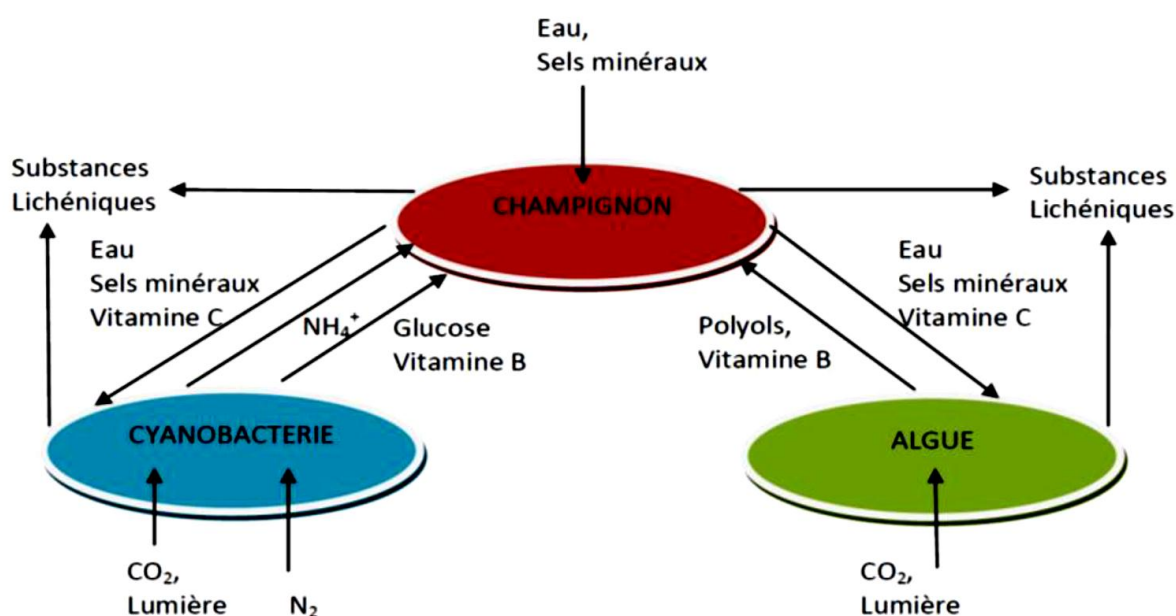


Figure 10 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (Van Haluwyn *et al.*, 2009 in Agroum et Koucha, 2016).

I.6 Usages des lichens

Les lichens sont utilisés pour l'alimentation humaine, nutrition animale, aussi au niveau industrielle pour obtenir des couleurs, fabriquer des parfums et de l'alcool. Les lichens ont également, pour des centaines d'années, été utilisés dans de nombreux pays comme un remède pour les maladies de l'homme. Ils sont surtout très utilisés comme bioindicateur de la pollution (Fortin, 2007 ; Conti & Cecchetti, 2001 in Belkhir et Slimani, 2016).

II. Généralité sur les métabolites lichéniques

Les lichens produisent une grande variété de métabolites primaires et spécialisés (secondaires). Les métabolites primaires (protéines, acides aminés, polyols, polysaccharides et vitamines) sont produits à la fois par le photobionte et le mycobionte ; ils ne sont pas spécifiques des lichens (**Stocker-Wörgötter, 2008**). Les métabolites spécialisés sont produits par le mycobionte et s'accumulent dans le cortex (comme la parétien, l'acide usnique,...) ou dans la couche médullaire (**Molnár et Farkas, 2010**) qui ont un rôle protecteur contre les fortes éclaircissements et contre les herbivores (**Shrestha et Clair, 2013**).

Certains métabolites jouent également un rôle important dans la compétition car ils peuvent avoir une activité allopathique, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'affectés le développement et la croissance des lichens, des champignons, des mousses, des micro-organismes et des plantes voisines. Cette concurrence en termes d'espace, de lumière sur des substrats variés est déterminante pour la structure des communautés lichéniques et pour la distribution des différentes espèces (**Armstrong et Welch, 2007 in Lacheb et Rechoua, 2017**).

II.1 Les métabolites primaires

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule (**Mitrovic et al., 2011**).

Les métabolites primaires regroupent les protéines, les lipides, les polyols, les polysaccharides, les pigments (chlorophylles, xanthophylles, carotènes...) et autres composés organiques intervenant dans le métabolisme et la structure des lichens (**Podterob, 2008 ; Mitrović et al., 2011**) ; ils sont produits par le champignon et le photobionte (algue verte ou cyanobactérie). Ils ne sont pas spécifiques aux lichens et sont également retrouvés chez les champignons, les algues et plantes supérieures. Les polysaccharides, en particulier, ont fait l'objet d'études démontrant leurs activités biologiques, notamment anti-tumorale, immunostimulante et antivirale (**Olafsdottir et Ingólfssdóttir, 2001 ; Omarsdottir et al., 2007**). Ils sont produits en grande quantité dans les lichens et sont principalement des α - ou β -glucanes linéaires ou peu substitués, des galactomannanes, des galactoglucomannanes, et des hétéroglycanes complexes (**Stocker-Wörgötter et al., 2008**).

II.2 Les métabolites secondaires

Pour les plantes, les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexe synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophe (**Abdrrazak et Joël, 2007**). Ils interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (**Judd et al., 2002**). Ces molécules constituent un groupe de produits naturels qui sont explorés pour des propriétés très divers : anti-oxydants, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antifongiques, analgésique, etc.... (**Harborne, 1998 ; bruneton, 2009**).

Chez les lichens, les métabolites secondaires sont principalement responsables de leurs aptitudes à se développer dans des conditions extrêmes. Ils représentent en moyenne 5 à 10 % de la masse sèche du thalle (jusqu'à 20 %) et sont généralement excrétés des cellules fongiques pour former des cristaux à la surface du thalle. Ils peuvent également être accumulés au niveau de la médulle, du cortex supérieur ou d'organes spécialisés tels que les fructifications. Ils sont essentiellement produits par le mycobionte, mais la majeure partie provient exclusivement de l'action synergique des deux partenaires dans le lichen (**Yedri et Hebbache, 2018**).

Les métabolites lichéniques sont généralement insolubles dans l'eau et peut être extrait dans des solvants organiques. Les modèles de distributions des métabolites secondaires sont généralement taxon spécifique, et donc ont été largement utilisés dans la taxonomie et systématique de lichen (par exemple **Hawksworth, 1976**) les substances de lichen sont classées par **Culberson et Elix (1989)** en fonction de leur origine biosynthétique et les caractéristique structurelle chimique. La plupart des métabolites secondaires des lichens sont dérivées de la voie acétates polymalonates, tandis que d'autres proviennent de la voie des mévalonates et les voie d'acide schikimiques (**Culberson et Elix, 1989**).

II.2.1 Voies de biosynthèse des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires lichéniques peuvent être obtenus via trois voies de biogenèse proposées dans la littérature : la majorité de ces composés est dérivée de la voie de l'acétate polymalonate ou polycétidesynthase ; les autres métabolites secondaires sont issus des voies

de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique (Stocker-Wörgötter *et al.*, 2013 in **Derdane et Khelifi, 2017**).

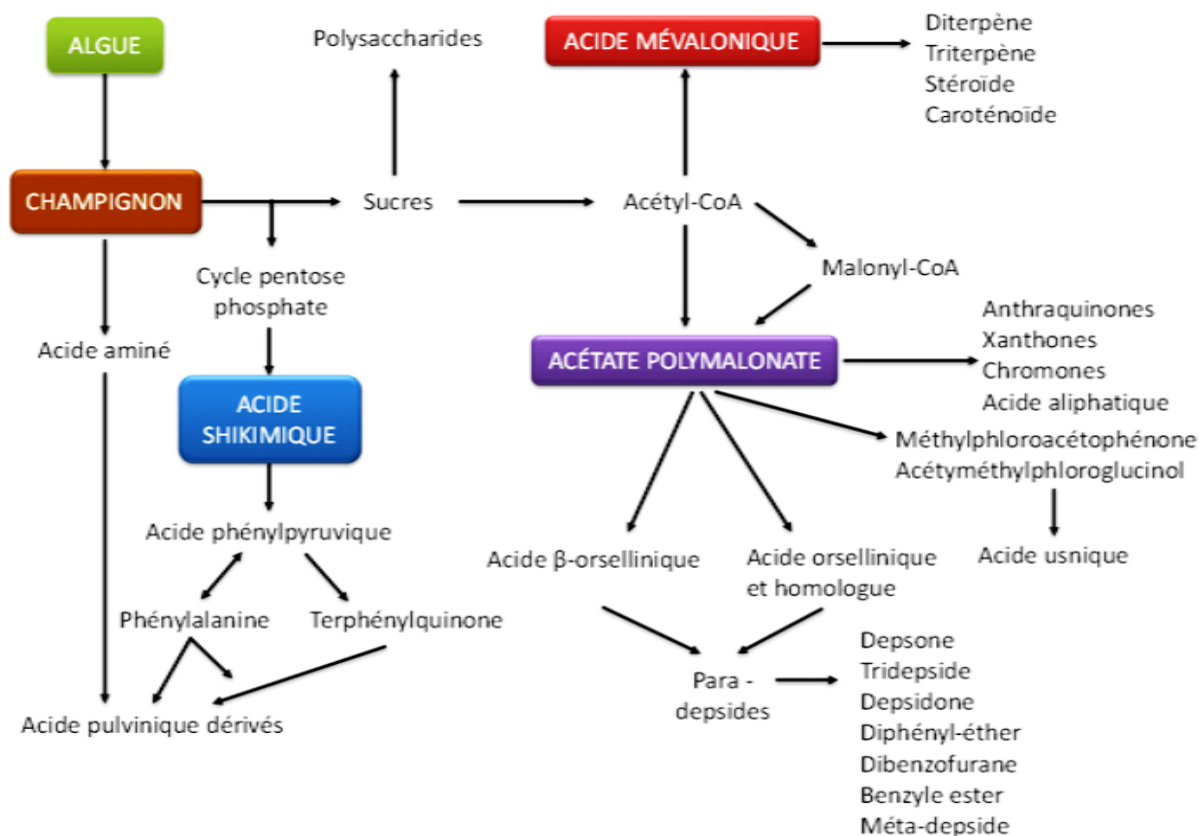


Figure 11 : Les voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques (Elix, 1996 in **Lacheb et Rechoua, 2017**).

II.2.1.1 Voie de l'acide mévalonique

La voie de l'acide mévalonique conduit essentiellement à la synthèse de mono-, di-, tri-, ester et sesquiterpènes, stéroïdes et caroténoïdes (Huneck, 1999 in **Dieu, 2015**). Pour la plupart, ils ne sont pas spécifiques des lichens et sont issus de l'assemblage d'unités isopréniques formées à partir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). L'isopentenylpyrophosphate (unité en C5), obtenu à partir de l'acide mévalonique, conduit soit au géranylgeranylpyrophosphate (unité en C20), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes, soit aux sesterterpènes (unités en C25), soit au squalène (unité en C30), précurseur des stéroïdes et des triterpènes (**Dieu, 2015**).

II.2.1.2 Voie de l'acide shikimique

Cette voie permet la synthèse d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) qui, chez les plantes, sont les précurseurs des flavonoïdes, des coumarines, ou encore des alcaloïdes. En revanche, chez les lichens, des composés atypiques, tels que l'acide vulpinique et la calycine (**Stocker-Wörgötter, 2008**). La phénylalanine serait le précurseur, via la formation d'acide polyporique, de l'acide pulviniquedilactone, lui-même à l'origine de la calycine (**Dieu, 2015**)

II.2.1.3 Voie de l'acétate polymalonate

La voie de l'acétate polymalonate conduit à la synthèse des depsides, depsidones, depsones, dibenzofuranes, anthraquinones, xanthones, chromones, acides aliphatiques et dérivés de l'acide orsellinique (**Eisenreich et al., 2011 in Dieu, 2015**).

II.2.2 Classifications et fonctions des métabolites secondaires

Nous pouvons classer les métabolites secondaires en trois groupes, chacune renferme une très grande diversité biologique (**Bruneton, 2009**) :

- Les composés azotés (les alcaloïdes).
- Les terpènes.
- Les composés phénoliques.

II.2.2.1 Les composés azotés (les alcaloïdes)

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine.

Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées et basiques. Ils sont dérivés des acides aminés tels que la tyrosine, tryptophane et autres. On distingue trois types d'alcaloïdes : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes (**Yedri et Hebbache, 2018**).

II.2.2.2 Les terpénoïdes

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à cinq carbones appelé Hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte (**Sun et al., 2016 in Yedri et Hebbache, 2018**).

Partie bibliographique

Les composés terpénoïdes constituent un groupe de molécules très différentes tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. Avec près de 15000 structures moléculaires connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux. Ce sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbones (**Hopkins, 2003**).

II.2.2.3 Les composés phénoliques

Plus de 8000 composés phénoliques sont identifiés (**Urquiaga et Leighton, 2000**) dont l'élément structural de base est un noyau benzoïque au quel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylque, ester, sucre...). Cette structure varie depuis les molécules simples (acides phénolique simple) jusqu'aux molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Bruneton, 2009**).

Les composés phénoliques jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. Ils peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stressés variés (**Macheix et al., 2005**).

► Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques, ils sont doués d'activité antiallergique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (**Middleton et al., 2000 in Zerargui, 2015**).

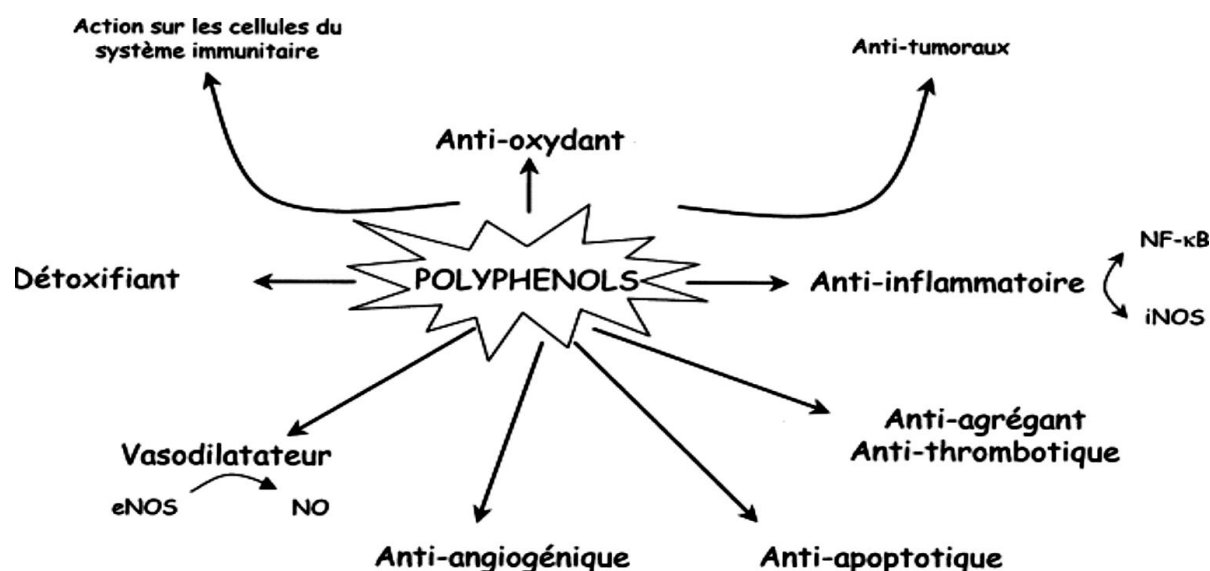


Figure 12 : Activité biologique des polyphénols (Middleton *et al.*, 2000 in Zerargui, 2015).

II.2.3 Les composés bioactifs phénoliques

II.2.3.1 Les flavonoïdes :

Ce sont des substances polyphénoliques de faible poids moléculaire. Ils ont en commun une structure chimique de base en C15 (C6-C3-C6) et possèdent un squelette carboné constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi un hétérocycle (C) (fig. 13) (Cook et Samman, 1996 ; Heim *et al.*, 2002). Les flavonoïdes sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Ghestem *et al.*, 2001 ; Bruneton, 2009).

Ils protègent les plantes contre les radiations UV et sont impliqués dans les processus de la défense de la plante contre animaux herbivores (Gouts amers et astringent), les infections bactériennes et virales. Ils fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Ces molécules agissent sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits (Subramanian *et al.*, 2007).

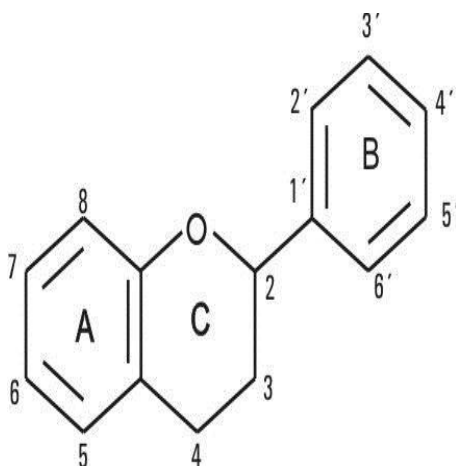


Figure 13 : structure de base de la flavonoïdes (**Gonzalez et al., 1997**).

II.2.3.2 Les tannins

Les tannins sont des substances polyphénoliques de structures variées, de masse moléculaire comprise en 500 et 3000. Ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant (**Lacheb et Rechoua, 2015**).

Très répandu dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes (**Roux et Catier, 2007**).

II.2.3.3 Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C6-C3, appartiennent au groupe des composés connus par des benzopyrone et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Ils se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Ils sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (**Lacheb et Rechoua, 2015**).

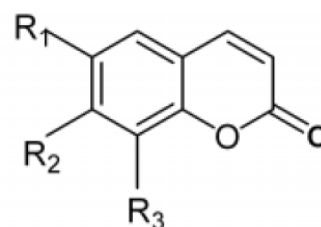


Figure 14 : structure de base des coumarines (**Ford et al., 2001**).

Ce sont des molécules biologiquement actives ayant diverses activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante (au niveau du cœur), anti-tumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale, et analgésique. Pour leur activité antibactérienne, elles sont efficaces contre les bactéries à gram positif (**Khan et al., 2005**).

II.2.3.4 Quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Ils sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Ils sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan, 1999 in Lecheb et Rechoua, 2017**).

II.2.3.5 Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6- C3). Ce sont des composés dont les deux noyaux phénoliques sont reliés par quatre atomes de carbone, au lieu de trois dans les flavonoïdes. Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles (**Lecheb et Rechoua, 2017**).

III. L'activité anti-oxydante des métabolites secondaires

L'évaluation de l'activité biologique a également révélé des propriétés pesticides, phytotoxiques, anti-tumorales, antiprolifératives, antimitotiques, anti-oxydantes et antivirales (**Kout et Chihel, 2018**).

III.1 Le stress oxydant

Dans l'ensemble des tissus sains, la balance anti-oxydantes/pro-oxydants est en équilibre, cet équilibre est important pour l'homéostasie de la cellule.

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses anti-oxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution de défenses anti-oxydante (**Smirnov, 2005**).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en anti-oxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). L'accumulation des espèces oxygénées réactives a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (**Smirnov, 2005**).

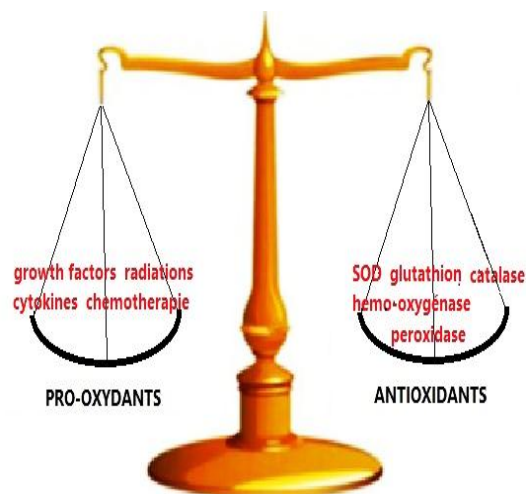


Figure 15 : La balance oxydants/anti-oxydants en équilibre (**Reuter et al., 2010**).

III.2 Les radicaux libres

Les radicaux libres (RL) sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes. Cet état leur confère une instabilité et une grande réactivité. Ils apparaissent soit au cours de la rupture d'une liaison covalente, pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron (**Agroum et Koucha, 2016**). Chez l'homme, les principaux RL sont dérivés de l'oxygène. On parle d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

En raison de l'implication des radicaux libres dans diverses pathologies, les recherches de nouvelles molécules pouvant pallier un déficit du système de protection naturelle antiradicalaire sont largement intensifiées (**Obame Engonga, 2009**).

III.2.1 Formes des radicaux libres

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (Tableau 1), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. D'autre classification basé sur le type de radical en donnant deux groupes principales : des radicaux dérivés de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) ou d'autres atomes comme l'azote (Reactive nitrogen species : RNS) (**Favier, 2003**).

Partie bibliographique

Tableau 1 : présentation des différents radicaux libres (Yedri et Hebbache, 2018).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	O ₂ ·-	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO·	Oxygène singulet	1O ₂
Radical alkoxyde	RO·	Perxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical hydroxyle	OH·	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO·	Peroxynitrite	ONOO-

III.2.2 Sources des radicaux libres

Les cellules sont exposées à des ROS ou RNS de sources endogènes ou exogènes.

III.2.2.1 Sources endogènes

La production des ERO dans les cellules des mammifères est essentiellement d'origine enzymatique et résulte de plusieurs sources : la NADPH oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire sont les principales. D'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires, peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire : xanthine oxydase, les peroxysomes, les lipogénases, la catalases peroxysomale et les ions métalliques, comme le fer et le cuivre (Beaudeau, 2006).

III.2.2.2 Sources exogènes

Les espèces réactives d'oxygène peuvent être produites par des processus exogènes. Les sources environnementales comprennent les rayonnements ionisants, et les polluants comme les produits chimiques qui favorisent la formation des superoxydes tels que les quinones, les nitroaromatiques et les herbicides (par exemple le paraquat).

La fumée de cigarette contient des composés organiques et de nombreux radicaux, comme le superoxyde et l'oxyde nitrique. Les ions de métaux lourds, tels que le fer, le cuivre, le

cadmium, Mercure, peuvent induire la génération de radicaux réactifs et provoquent des lésions cellulaires (Birben *et al.*, 2012).

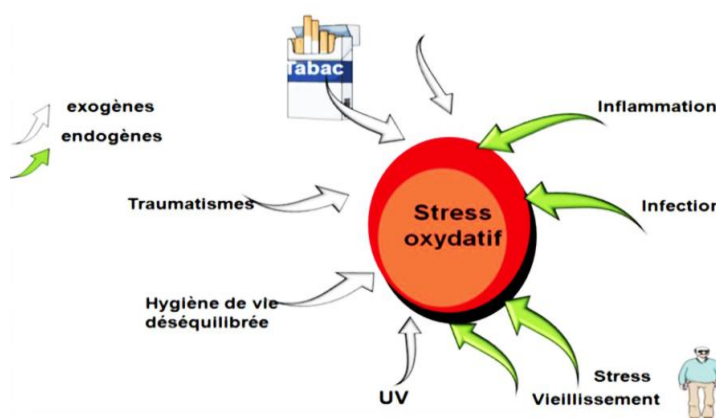


Figure 16 : Source des radicaux libres (Elkolli, 2017).

III.3 Les espèces réactives de l'oxygène

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Gutteridge, 1993 *in* Boudjouref, 2011).

III.4 Conséquence du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéines. Etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement et la dégradation des cellules et des tissus (Lacheb et Rechoua, 2017).

III.5 Biomarqueurs du stress oxydant

L'attaque des cibles cellulaires dans un contexte de stress oxydant peut être schématisée selon les espèces moléculaires concernées, à savoir lipides, protéines, et acides nucléiques (Beaudeau et Durand, 2008).

III.5.1 Biomarqueurs de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides polyinsaturés en présence d'oxygène est connue sous le nom de peroxydation lipidique.

- **Hydroperoxydes (ROOH)** : produits précoces d'oxydation des AGPI
- **Aldéhydes (RCHO)** : produits précoces d'oxydation des AGPI
- **Oxystérols** : produits d'oxydation du cholestérol
- **Isoprostanes** : produits terminaux d'oxydation de l'acide arachidonique
- **LDL oxydées (Beaudeau et Durand, 2008).**

III.5.2 Biomarqueurs de l'oxydation des protéines

Les protéines, de par leur abondance au sein des systèmes biologiques et du fait de leur rôle fonctionnel majeur au sein de la cellule, constituent des cibles majeures des ERO et ERN. Il a ainsi été estimé que les protéines piègent 50 à 75% des espèces radicalaires générées (**Davies et al., 1999**).

- Protéines carbonylées
- Produits de glycation avancée résultant de réactions de glyco-oxydation et leurs précurseurs (**Beaudeau et Durand, 2008**).

III.5.3 Biomarqueurs de l'oxydation des acides nucléiques :

Les attaques oxydatives sur l'ADN sont considérées comme importantes dans les études touchant au vieillissement et au développement de cancer (**Bohr, 2002 in Lacheb et Rachoua, 2017**). Les espèces réactives de l'oxygène, en particulier le radical hydroxyle, peuvent attaquer le squelette désoxyribose-phosphate, en provoquant des liaisons croisées ADN-protéines, et en modifiant les bases puriques et pyrimidiques. La réparation de l'ADN in vivo est effectuée par des glycosylases (pour les bases) et des endonucléases (pour les désoxynucléotides) (**Beaudeau et Durand, 2008 in Lacheb et Rachoua, 2017**).

III.6 Les molécules anti-oxydantes

Les anti-oxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Les anti-oxydants sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (**Behera *et al.*, 2006 in Obame Engonga, 2009**).

Les antioxydants naturels ou synthétiques sont utilisés pour prévenir de nombreuses maladies (cardiovasculaires et neuro-dégénératives, inflammation, diabète...) et le vieillissement, dus à la formation exagérée des radicaux libres. Les antioxydants sont également utilisés dans les aliments pour retarder la détérioration, le rancissement ou la décoloration qui est souvent due à l'oxydation causée par la lumière, la chaleur et certains métaux (**Méda, 2005 in Obame Engonga, 2009**).

III.6.1 Les antioxydants endogènes

La production physiologique des ROS est contrôlée au sein des cellules par les systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques.

III.6.1.1 Antioxydant enzymatiques

▶ La glutathion peroxydase :

La glutathion peroxydase (GSH-PX) est une enzyme rénal et hépatique, constituée de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine (**Delattre *et al.*, 2005 in Agroum et Koucha, 2016**). Le rôle principal de la GSH-PX consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH) (**Schrader et Fahimi, 2006 in Agroum et Koucha, 2016**).



▶ Le superoxyde dismutase :

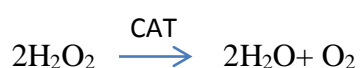
Le superoxyde dismutase (SOD) représente l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Ces métalloprotéines assurent l'élimination de l'anion superoxyde O_2^- par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (**Garre *et al.*, 2007**).

Partie bibliographique



► La catalase :

La catalase (CAT) est une enzyme répartie dans les tissus (**Milane, 2004**). Elle catalyse le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit dans les conditions physiologique et sa décomposition selon la réaction suivante (**Nancy et al., 2006**):



La catalase est surtout active lorsque le niveau du stress oxydant est élevé ou que la quantité le glutathion peroxydase est limité (**Niki et al., 2007 in Agroum et Koucha, 2016**).

III.6.1.2 Antioxydant non enzymatique

L'action protectrice non enzymatique est renforcée par celle de différents composés réducteurs d'origine métabolique. Ces composés anti-oxydant sont produits dans les cellules de l'organisme et parmi lesquels on peut citer la glutathion, qui est l'anti-oxydant le plus important dans le contrôle du statu redox. Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). La plupart des protéines dont l'albumine contiennent des groupements « thiols » qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées. On peut citer, également l'acide urique, la mélatonine, la transferrine... (**Agroum et Koucha, 2016**).

III.6.2 Les antioxydants exogènes

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également d'importantes sources d'antioxydants. L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogènes naturels présents dans son alimentation. Bien que non indispensables à la vie, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant. Les importants parmi eux sont les vitamines C (L'acide ascorbique) ; les vitamines E (tocophérol), et les caroténoïdes agissent en neutralisant l'électron non apparié et les transformant ainsi en molécules stables. D'autres composés tels que les alcaloïdes, les polyphénols, les huiles essentielles, les acides gras (oméga-3 et oméga-6) ainsi que des traces des métaux (sélénium, manganèse et le zinc) et les flavonoïdes apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (**Agroum et Koucha, 2016**).

III.6.3 Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier, 2006**).

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

- **Système de défense primaire** : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- **Système de défense secondaire** : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants « briseurs » de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation (**Buettner, 1993 in Yedri et Hebbache, 2018**).

Partie
Expérimentale

*Matériel
et Méthodes*

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de deux espèces de lichens : *Flavoparmelia caperata* (L) et *Parmotrema perlatum* issue d'un échantillonnage après transplantation.

2. Classification des espèces

2.1. *Flavoparmelia caperata*

Selon **Yedri et Hebbache (2018)**, l'espèce étudiée est classé dans:

- Classe : Ascolichens
- Ordre : Cyclocarpales
- Famille : Parmeliacées
- Genre : *Parmelia*
- Espèce : *Parmelia caperata*



Figure 17: *Parmelia caperata* (L.) (Yedri et Hebbache, 2018)

2.2. *Parmotrema perlatum*

Selon **Kaumar et al. (2015)**, l'espèce étudiée est classé dans:

- Classe : *Magnoliophyta*
- Ordre : *Magnoliopsida*
- Famille : *Solamaceae*
- Genre : *Parmelia*
- espèce : *Parmotrema perlatu*



Figure 18: *Parmotrema perlatum* (Kaumar et al., 2015)

3. Description des espèces

3.1. *Flavoparmelia caperata*

Parmelia caperata (L.) est une espèce de lichen largement distribuée, elle se trouve, sur les écorces plus ou moins acides et assez bien éclairées, principalement sur feuillus, rarement sur résineux. Peut aussi se trouver sur des piquets de clôture, roches siliceuses, tuiles, etc.. Le thalle est de 5-20 cm de diamètre, formant parfois de vastes taches, des lobes de pourtour arrondis, allongé de 5 à 13mm de large, crénelés, la surface supérieure non ciliée de couleur vert jaune à jaune pâle, parfois gris-vert(à l'ombre), lisse mais devenant rugueuse et pliée avec l'âge, les rhizines denses à clairsemées au centre de bord, de zone marron, noir, simple, parfois brun ou blanc basculé. Cette espèce est très répandu, présent en zone tempérée sur tous les continents et dans les montagnes tropicales à l'exception de l'Australie et de l'Antarctique (**Lacheb et Rechoua, 2017**).

3.2. *Parmotrema perlatum*

Parmotrema perlatum est une espèce de lichen appartenant à la famille des *Parmeliaceae*. Le thalle de cet espèce est aplati, adné 3-8cm de large, structure foliée de couleur gris minérale verdâtre (ou blanc jaunâtre sur le dessus et noir sur la face inférieur) ayant des lobes sub-linéaire à irréguliers de 2 à 4 mm de large. La surface supérieur du thalle plan et continue, qui est modérément à densément isidiate, c'est-à-dire ayant des isidies ou des soralies, les deux sont des structure végétative en forme des bourgeons présentes sur la surface supérieur des thalles, simple à ramifié jusqu'à 0.5mm de haute, la surface inférieur des thalles est modérément rhizinisée c'est-à-dire avoir des rhizines. Cette dernière fixe le lichen à son substrat, sont délicates, simple ou en partie peut forcer (**Kaumar et al., 2015**).

4. Description de la zone d'étude

Les deux lichens *F. caperata* (L.) et *Parmotrema perlatum* ont été récoltées au mois d'avril de l'année 2017, le prélèvement a été effectué au niveau de Sidi-Brahim, qui se situe au niveau de la wilaya d'Annaba. Cette dernière est située à l'est de l'Algérie, entre les latitudes (36°30) Nord et les longitudes (07°20) et (08°40) Est. A l'extrême est du pays, ouvert sur le littoral méditerrané sur 80 Km. Elle s'étend sur 1439 km² soit 0.06% du territoire national.

Matériel et méthodes

Elle est bordée au nord par la méditerranée, à l'est par le département d'El-Tarf, au sud par le département de Guelma, et à l'Ouest par le département de Skikda. Elle couvre une superficie de 1411.98 km².

Annaba présente tous les caractéristiques d'un relief en forme de cuvette, d'où un risque élevé d'inversion thermique (effets de brises de terre et de mer soufflant dans des sens contraires). Les polluants émis par les unités industrielles et balayés par la brise de terre se heurtent contre le flanc du mont Edough pour se rabattre sur l'agglomération.



Figure 19 : localisation géographique de la région d'étude Annaba (Maizi *et al.*, 2011).

5. Récolte et choix des échantillons

Deux échantillons (issue de la région de Bougous) ont été transplanté pendant deux mois (Avril et Mai) dans la région de Sidi Brahim –Annaba afin d'être récoltés.

Un seul type de substrats est retenu qui est les troncs d'arbre. Sur chaque substrat les thalles des deux espèces ont été récoltés, soit l'équivalent d'environ 10.75g de matière végétale fraîche de la première espèce (*Parmotrema perlatum*) et 7.47g pour la deuxième espèce (*Flavoparmelia caperata*). Les thalles ont été décollés des troncs d'arbres grâce à un couteau, puis placés dans des sachets en plastique qui servent à la conservation de courte durée pendant le transport au laboratoire pour les identifier et analyser. Le choix de l'espèce se justifie par son abondance dans la station sélectionnée dont on a récolté l'échantillon d'une manière

aléatoire mais représentatif et en quantité suffisante, pour réaliser la présente étude.



Figure 20 : récolte des échantillons (Nehalla et Laguel, 2021)

6. Identification des espèces

L'identification des deux espèces lichéniques est d'abord effectuée par observation des caractéristiques morphologiques générales, telles que la forme, la couleur, le diamètre du thalle ainsi que l'orientation des extrémités et le type de ramification. Ces observations sont comparées avec la description des espèces signalée par la littérature et rapportée à la partie bibliographique (Huneck & Yoshimura, 1996).

7. Préparation des échantillons

7.1. Nettoyage, séchage et broyage

La préparation des échantillons est d'une importance capitale pour toute analyse fiable. Les métabolites secondaires sont des molécules aliphatiques ou aromatiques de faible poids moléculaire présentant souvent un caractère hydrophobe. Lorsqu'ils sont extraits, ils sont donc retrouvés principalement dans les fractions apolaires ou moyennement polaires (Lacheb et Rechoua, 2017).

Après la récolte de l'espèce *Flavoparmelia caperata* et *Parmotrema perlatum* et en amont du processus d'extraction, les thalles sont nettoyés de tous les impuretés (mousses, poussière, débris végétaux...etc.). Puis, ils sont séchés à l'air ambiant pendant environ 72h. À l'aide d'un mortier, les thalles séchés sont broyés entièrement en poudre très fine pour augmenter la surface de contact de la matière végétale avec le solvant, et favoriser ainsi l'extraction des composés.



Figure 21 : poudre du lichen dans le mortier (Nehalla et Laguel, 2021)

8. Test d'humidité

La détermination de l'humidité est réalisée selon la méthode décrite par **Doymaz et al. (2004)**. Une prise d'essai d'échantillon (10.75g de *Parmotrema perlatum* et 7.47g de *Flavoparmelia caperata* est séchée dans une étuve à 120°C jusqu'à un Poids constant. Le taux d'humidité des échantillons est calculé selon la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{P_{\text{avant}} - P_{\text{après}}}{P_{\text{avant}}} \times 100$$

Où:

H (%) : Taux d'humidité en pourcentage.

P_{avant} : Poids de l'échantillon avant séchage.

P_{après} : Poids de l'échantillon après séchage

9. Préparation de l'extrait lichénique

Afin de réaliser l'évaluation des métabolites secondaires des espèces récoltées et surtout l'étude de l'activité anti-oxydante, la méthode envisagée a été de comparer les profils chimiques des extraits produits pour chaque échantillon de lichen. Cependant, les métabolites secondaires peuvent être extraits selon différentes techniques et en utilisant de différents

solvants ; l'extraction de ces métabolites et l'évaluation de leur activités passent par plusieurs étapes.

9.1. Choix du solvant et du type d'extraction

9.1.1. Choix du solvant

Le choix du solvant est orienté par les caractéristiques chimiques spécifiques pour chaque famille de métabolites secondaires (**Khebbaz et Gobbi, 2014**). Selon la littérature et tout dépend des moyens disponibles au niveau du laboratoire, les solvants qui ont été retenus pour notre étude sont-ils le méthanol et l'acétone qui présentent une polarité moyenne, et l'eau dont la polarité est la plus élevée. Des mélanges de solvants sont aussi utilisés, tels les mélanges méthanol/eau, dont la polarité sera qualifiée d'intermédiaire. (**Giusti et Wrolstad, 2001**)

9.1.2. Type et préparation de l'extraction

Pour apprécier le contenu en métabolites secondaires des espèces lichéniques échantillonnées, une extraction par macération a été réalisée dont son principe consiste à faire imprégner une quantité de poudre de lichens de chaque espèces séparément dans un volume du solvant sous agitation mécanique (**Yu et Dahlgren, 2005 in Djennas et Hamioud, 2016**).

On a imprégné 2.5g de poudre de *Parmotrema perlatum* dans chaque volume de 20ml du solvant (eau distillée, méthanol, acétone et mélange eau distillée/méthanol), et 1.5g de poudre de *Flavoparmelia caperata* dans 15ml des mêmes solvants. L'extraction a été effectuée selon le protocole décrits dans la figure 22.

Les extraits obtenus sont ensuite réunis séparément, puis filtrer en utilisant du papier filtre pour éliminer les débris et les matières en suspension

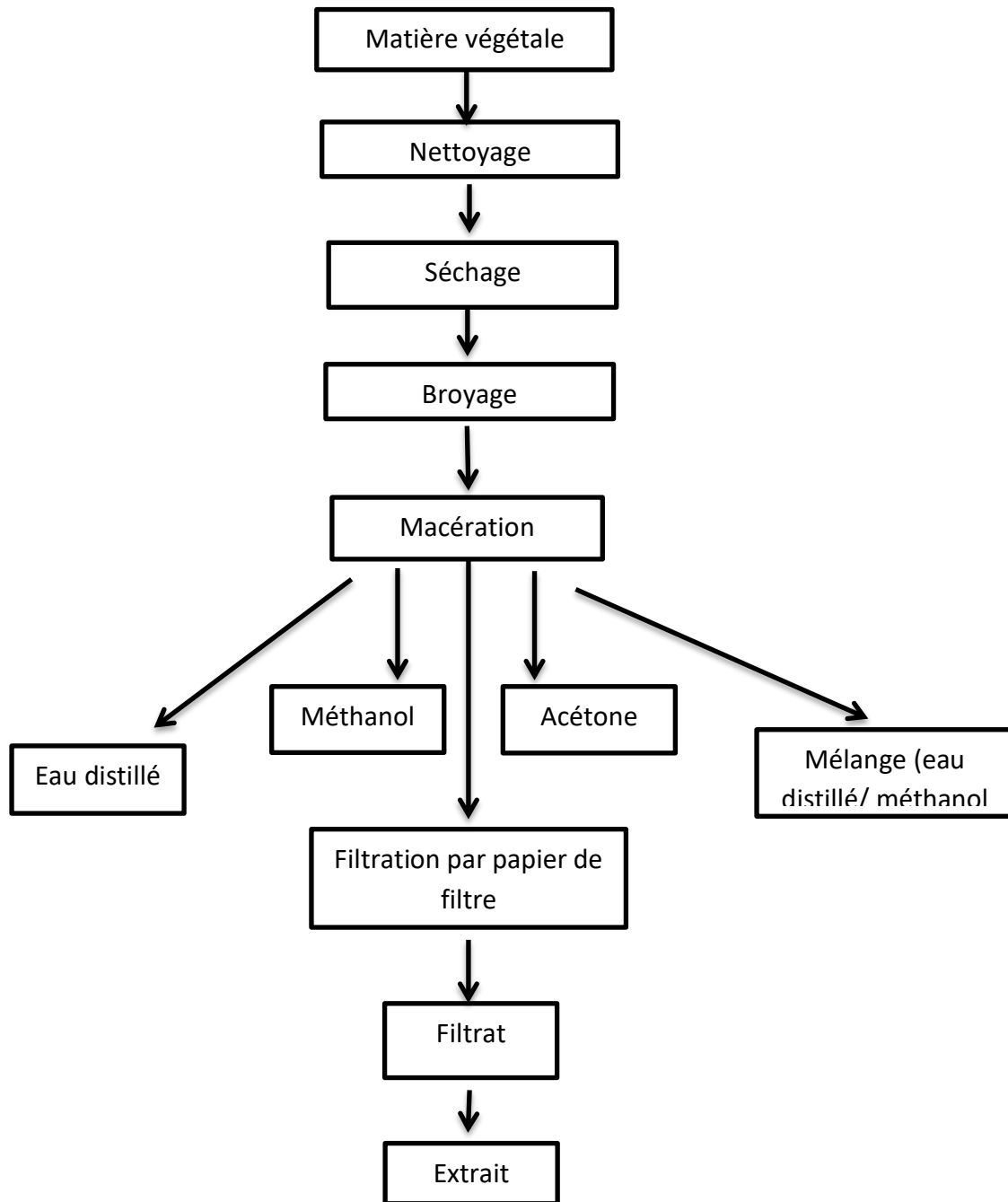


Figure 22: Protocole d'extraction de deux matières végétale (Nehalla et Laguel, 2021)

10. Paramètres mesurés

10.1. Mesure de l'absorbance [tracer la courbe $DO=f(\lambda)$]

Le spectrophotomètre a été calibré avec le blanc (≈ 3 ml du solvant seul), une quantité suffisante de l'extrait a été mise dans la cuve (≈ 3 ml de l'extrait), ensuite, le

spectrophotomètre a été réglé sur le mode λ Spectrum en choisissant la densité optique comme valeur de mesure, afin que le spectrophotomètre nous donne le graphe $DO=f(\lambda)$.

10.2. Dosages des composés phénoliques

10.2.1. Dosage des Flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) décrite par **Oyaizu (1986)**.

Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 430 nm est proportionnelle à la quantité de complexes formés (**Oyaizu, 1986**).

Mode opératoire

Une quantité de 1 ml de chaque extrait doit être ajouté à un volume égal (1 ml) d'une solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol) ; Dans les mêmes conditions un témoin a été préparé qui est la solution ($AlCl_3$ /méthanol). Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante et l'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde d'ordre 415 nm contre le blanc qui a été préparé.

Matériel et méthodes

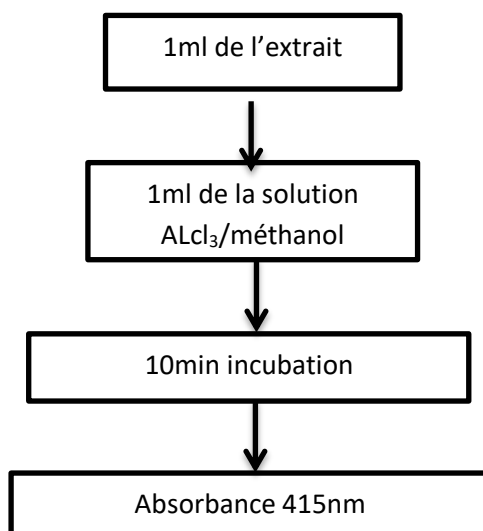


Figure 23 : protocole des dosages des flavonoïdes (Nehalla et Laguel, 2021)

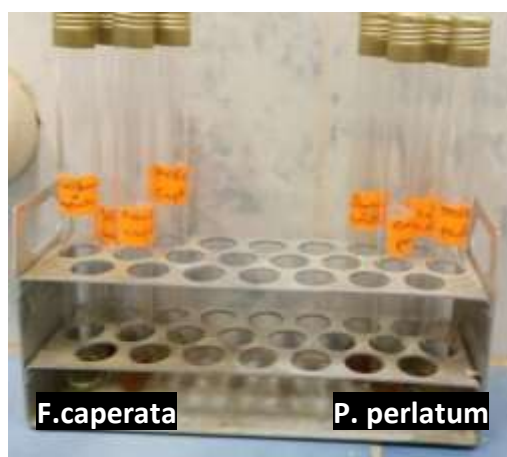


Figure 24: dosage de flavonoïde (Nehalla et Laguel, 2021)

Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait)

10.2.2. Dosages des tannins

La détermination des tannins totaux a été réalisée selon **Rebaya et al., (2015)**.

Principe

La teneur en tannins est déterminée par la méthode de vanilline en milieu acide (**Julkunen-Titto, 1985**). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tannins condensés en présence d'acide pour produire un Complexe coloré mesuré à 500 nm.

Mode opératoire

Un volume de 12,5 μL de l'extrait est ajouté à 750 μL de vanilline/méthanol (4% m/v) et mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 375 μL de l'acide chlorhydrique (HCl) est additionnée dans le mélange. La mixture obtenue est agitée et incubée à température ambiante pour 15 min et mesurée l'absorbance à 500 nm

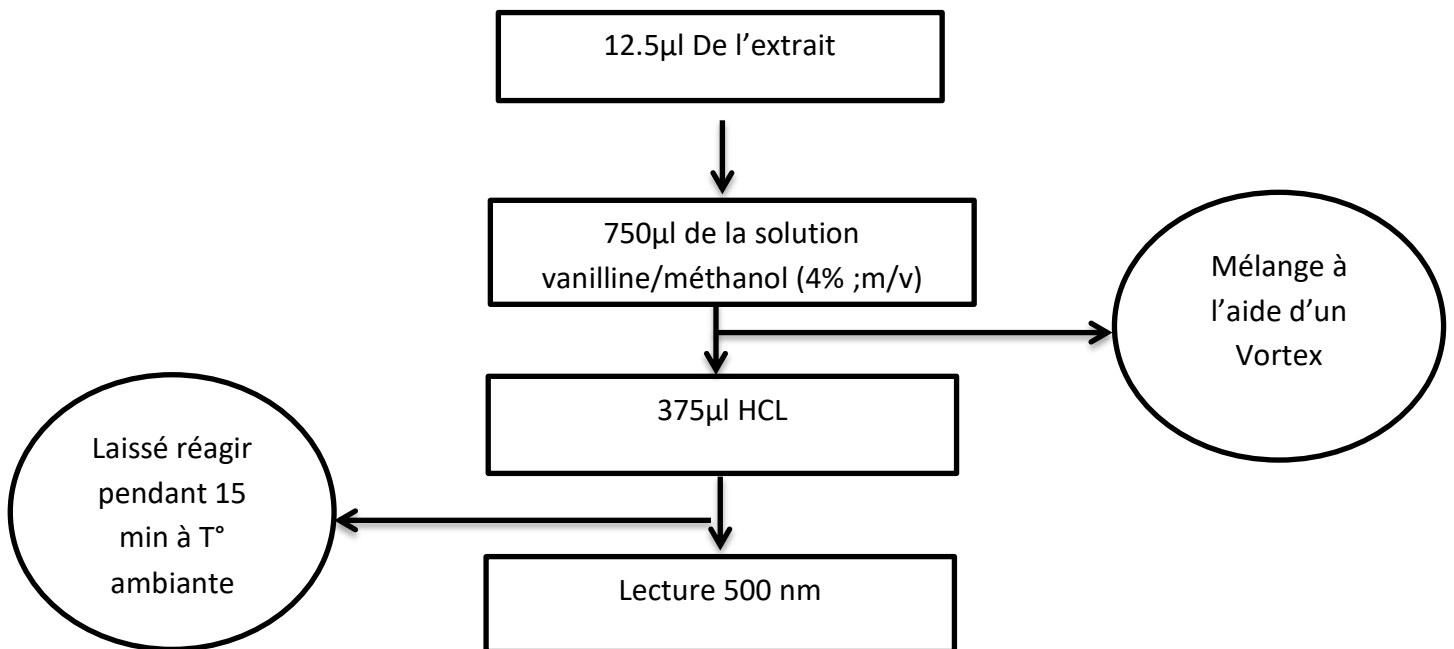


Figure 25: protocole des dosages des tannins (**Nehalla et Laguel, 2021**)

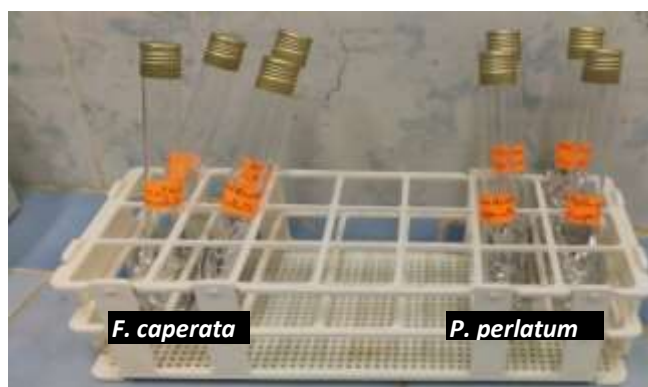


Figure 26: dosage des tannins (Nehalla et Laguel, 2021)

Expression des résultats

La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) de résidu sec (mg Eq EC)/g MS) à partir de la courbe d'étalonnage .

10.3. Evaluation de l'activité anti-oxydante

10.3.1. Evaluation de l'effet anti radicalaire contre le radical DPPH

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans cette étude, on a utilisé test de piégeage du radical libre DPPH.

10.3.2. Teste de piégeage du radical libre DPPH

Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH), décrite par **Dorman et al., (2011)**.

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un composé chimique de formule brute $C_{18}H_{12}N_5O_6$ et de masse molaire 394.32g/mol. Il possède un électron non apparié sur un atome d'azote (Figure 27) (**Popovici et al., 2009**).

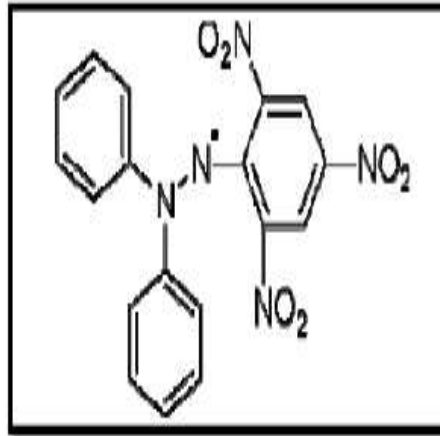


Figure 27: Structure chimique du radical libre DPPH · (2,2 DiPhenyle-1-Picryl Hydrazyle) (Popovici *et al.*, 2009)

Principe

Le test DPPH est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité anti-oxydante. Il se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution. Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de du lichen peut être déterminée (Dorman *et al.*, 2011).

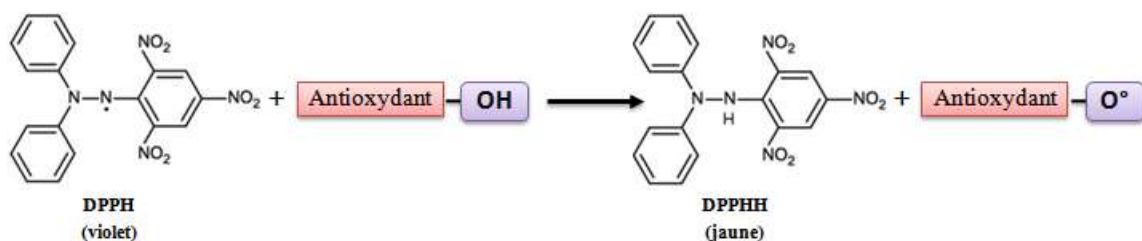


Figure 28 : Réaction du test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Liang et Kitts, 2014).

Matériel et méthodes

Mode opératoire

Ajouter 900µl de la solution méthanolique du DPPH (0.15mg/ml = 1.5mg dans 10ml méthanol) à 300µl de chaque solution des extraits à différentes concentrations (C1, C2, C3 et C4). Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 300µl de méthanol avec 900µl de la solution méthanolique de DPPH. L'ensemble a été agité à l'aide d'un agitateur électrique puis, incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 517nm. Le contrôle positif a été représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test a été répété 3 fois. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Où :

I % : Pourcentage d'inhibition,

Abs Contrôle négatif : Absorbance du DPPH (Solution de DPPH + Méthanol),

Abs Test : Absorbance de l'échantillon ou Standard (Contrôle positif).

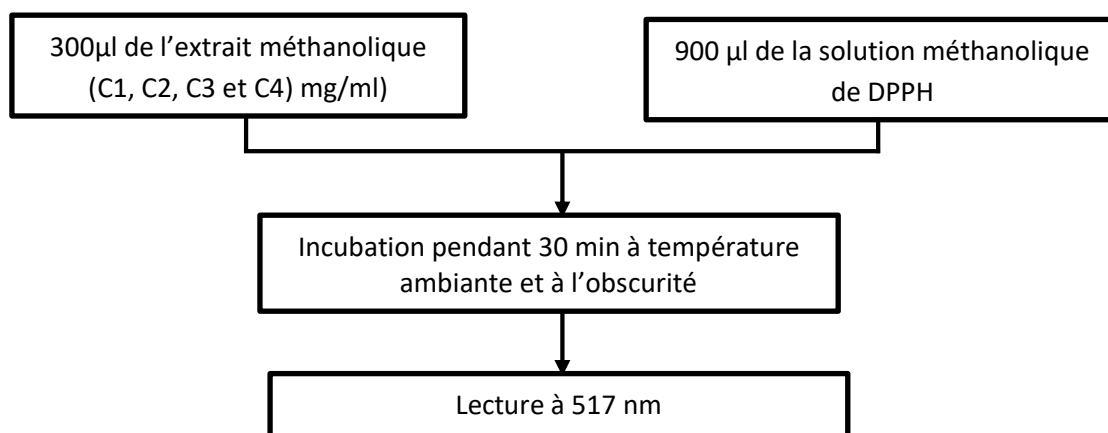


Figure 29 : Protocole du test au DPPH (Nehalla et Laguel, 2021)

Calcul des IC50

IC50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés qui sont présentés par les pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards.

*Résultats et
Discussion*

1. Description des extraits

Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur pour les deux espèces. Ces éléments sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : la coloration des extraits des deux espèces.

Extrait	Coloration
Extrait aqueux	Orangé
Extrait méthanolique	Blanche
Extrait acétonique	Vert
Mélange (eau distillé/méthanol)	Orangé foncé

2. Test d'humidité

Le test d'humidité permet de connaître la teneur en eau de nos échantillons des deux espèces sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : le taux d'humidité H% des deux espèces lichéniques.

Espèces	<i>Matière fraîche</i> (en gramme)	<i>Matière sèche</i> (en gramme)	<i>Taux d'humidité (%)</i>
<i>Parmotrema perlatum</i>	10.75	10.15	6%
<i>Flavoparmelia caperata</i>	7.47	6.80	9%

Résultats et discussion

D'après les données présentées dans le tableau 3, on obtient les résultats illustrés dans la figure 30.

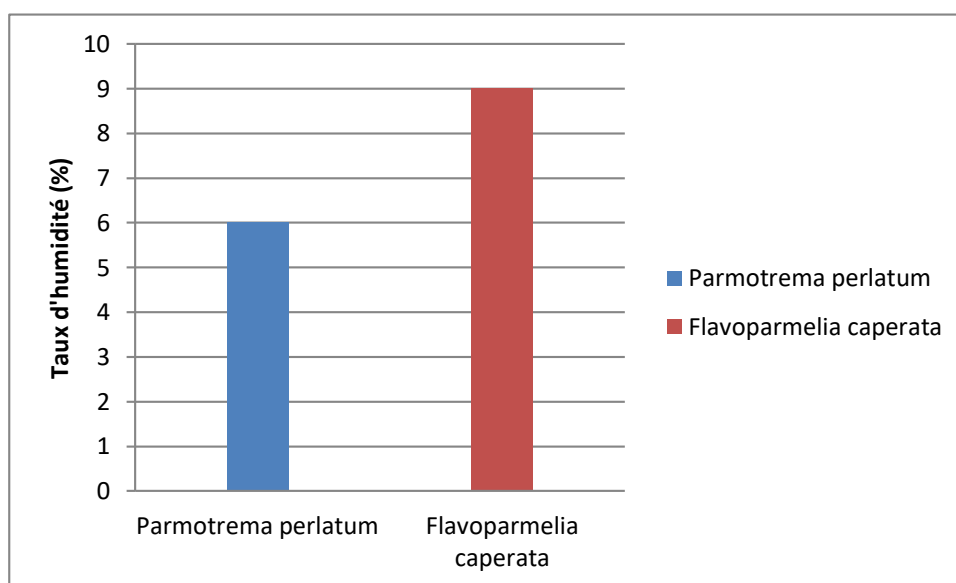


Figure 30 : Le taux d'humidité des deux espèces lichéniques

Les résultats de la figure 30 ont montré que le taux d'humidité pour l'espèce *Parmotrema perlatum* est de 6% par rapport à l'autre espèce *Favoparmelia caperata* est de 9%. La teneur en eau chez les lichens peut fortement varier jusqu'à atteindre un niveau élevé de déshydratation (**Ghanemi et Haggani, 2017**).

Pour éviter la dégradation des différents composants des lichens, on procède à un séchage pour éliminer l'eau, tout en préservant la composition chimique des cellules. Le séchage inhibe aussi les enzymes existantes dans le matériel végétal frais (le polyphénol oxydase) (**Espin et Tomas-Babera, 2001**)

Ce résultat est net à celui de **Pech (2013)** qui déclare que chez les lichens, la teneur en eau est généralement de l'ordre de 65% à 90 %, toutefois, certaines espèces peuvent vivre avec une teneur de 2%. Il est à signaler que le taux de la photosynthèse dépend largement du niveau d'hydratation des lichens.

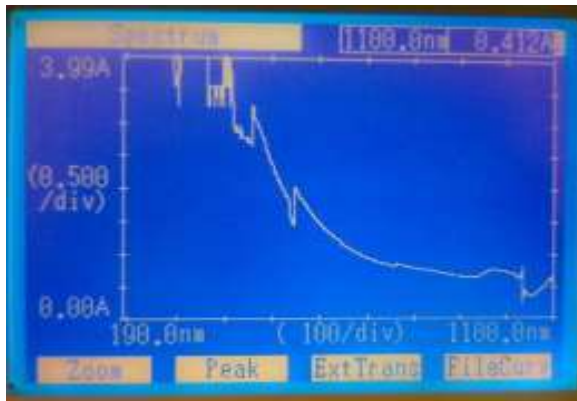
Il est à note que les cellules végétales possèdent de l'eau qui est une source de dégradation de polyphénol par oxydation (**Ghanemi et Haggani 2017**).

3. paramètres mesurés

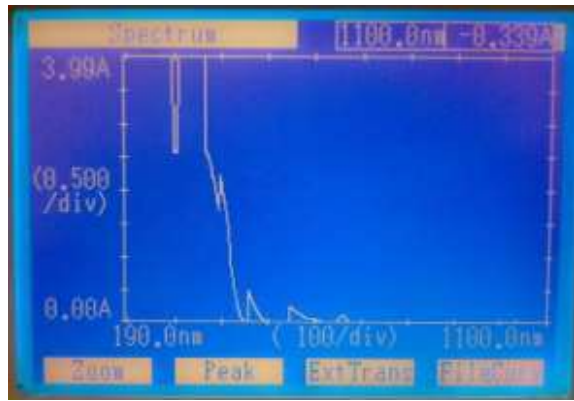
3.1. Mesure de l'absorbance [traçage de la courbe $DO=f(\lambda)$]

Les spectromètres UV/Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance ou de l'absorbance en fonction des longueurs d'ondes repérées en nm (**Bouziane, 2006**).

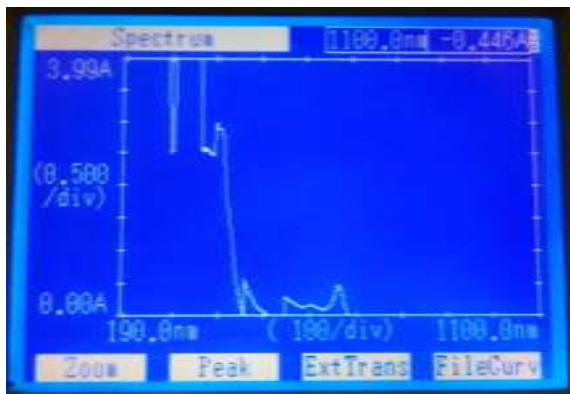
Pour la première espèce : *Flavoparmelia caperata*



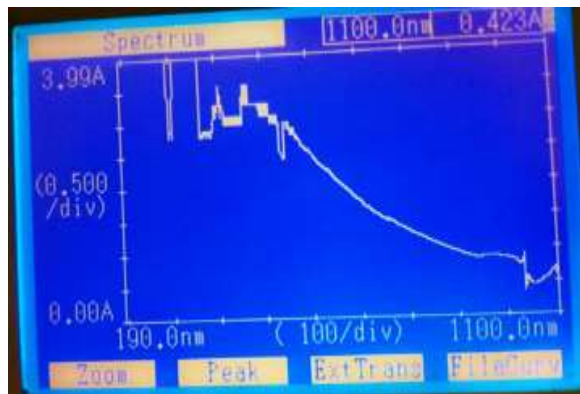
Extrait aqueux



Extrait méthanolique



Extrait acétonique



Extrait hydro-méthanolique

Figure 31 : Mesure de l'absorbance en fonction de longueur d'onde dans chaque extrait de *F. caperata*

L'analyse du spectre dans le domaine UV-visible présenté dans la figure 31 montre bien que les différents extraits dans le domaine visible contiennent des concentrations faibles sinon une absence totale des composés qui absorbent la lumière de 400 à 1100 nm. Ceci peut être

Résultats et discussion

expliqué par le fait que les molécules les plus actives et qui sont souvent des métabolites secondaires extracellulaires sont présentes dans le domaine UV (190-400 nm).

Concernant l'extrait aqueux, Dans l'intervalle [190-460 nm], l'absorbance est très importante, elle est aux alentours de 3,265 et plus. Selon (**Rezaire, 2012**) les flavonoles et flavones sont des composé de forte présence chez les lichens et ils sont capables d'absorber la lumière UV et même la lumière visible dans l'intervalle [280-520 nm]. Les flavonoles et les flavones sont des composés flavonoïdique les plus répondus. Comme tous les flavonoïdes, ils exercent une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydants, vasculo-protectrice, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoire, antiulcéreuse et même antitumorales significatives. Suivi par l'intervalle [460-1100 nm], on remarque peu ou absence totale de l'absorbance, ce qui signifie la faible présence des molécules qui absorbent la lumière dans cet intervalle.

Selon un autre travail qui est celui de **Nedeljko et al. (2011)**, la molécule qui peut être présente chez les lichens et qui absorbe la lumière UV de [210-321 nm] est essentiellement : acide usnique. **Dieu (2015)** rapporte que l'acide usnique est caractérisé par son caractère allergène, mais il participe également à protéger la ressource lichénique, moduler ses propriétés physicochimiques et ainsi améliorer ses activités biologiques.

Pour l'extrait méthanolique, les spectres dans la région entre [200-400 nm] semblent être nettement moins intenses mais avec la présence des composés phénoliques comme : stilbènes décrit par **Nedeljko (2011)**. Selon **El Gharras (2009)**, les stilbènes sont absorbées à 280 nm, ils sont connus par leurs propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques des plantes médicinales. Suivi par une très faible absorbance dans la région de [400-700 nm] ce qui explique la rareté sinon l'absence des molécules absorbant la lumière dans cette région.

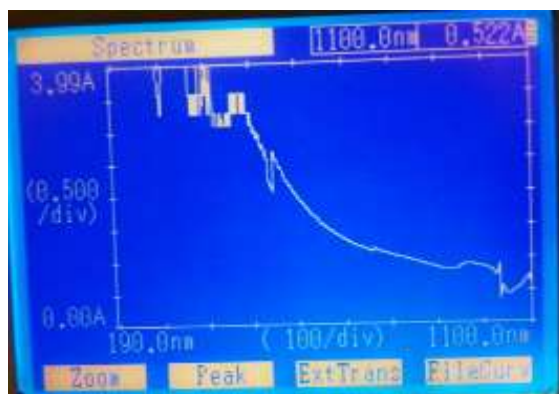
Pour l'extrait acétonique, on enregistre une absorption maximale de la lumière à 399 nm. Selon l'étude de **Rezaire (2012)**, les flavonoles et les flavones sont absorbés dans l'intervalle [280-550 nm] ; bien que ces derniers appartiennent aux flavonoïdes les moins rencontrés dans le monde végétal à l'exception faite pour les composés anthocyaniques dans l'extrait dont ils présentent un maximum d'absorption entre 460 et 560 nm (**Merken et Beecher, 2000 ; Stecher et al., 2001; Robbins, 2003**). Puis on observe une diminution dans l'intervalle [400-664 nm].

Résultats et discussion

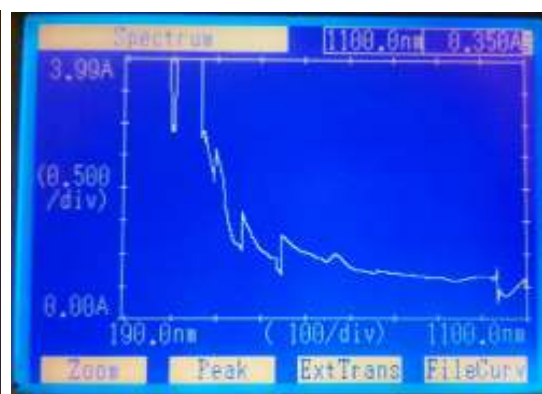
Enfin, dans l'extrait hydro-méthanolique, on enregistre une absence de spectre dans l'intervalle [190-280 nm], ce qui signifie qu'aucun métabolite secondaire n'est présent dans cette région. En revanche, on remarque une absorbance importante de la lumière dans la zone [280- 550 nm]. D'après l'étude de **Nedeljko *et al.* (2011)**, l'acide hydroxy-benzoïque et tannins sont caractérisés généralement par une d'absorption qui se situe dans un intervalle de mesure compris entre 280 à 520 nm.

L'acide hydroxy-benzoïque est caractérisée par son utilisation comme conservateur et comme antiseptique mais son utilisation dans ces domaines a été arrêtée en raison de son caractère toxique en cas de surdosage. Il est maintenant utilisé en dermatologie pour le traitement de l'acné et des verrues. Ainsi que les tannins vont présenter des propriétés biologiques variées. La principale est l'effet astringent, c'est-à-dire la capacité à précipiter les glycoprotéines, plus des propriétés anti-diarrhéiques, veinotoniques, antiseptiques, antioxydants ou encore cicatrisantes. Comme vu précédemment, ils ont le pouvoir de chélater les métaux mais également inhiber des systèmes enzymatiques ; de plus, les catéchols vont avoir une activité cardio-protectrice, anti-inflammatoire mais également anti-thrombotique (**Thomas, 2016**).

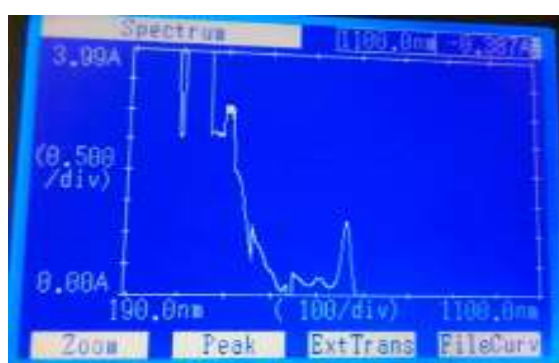
Pour la deuxième espèce : *parmotrema perlatum*



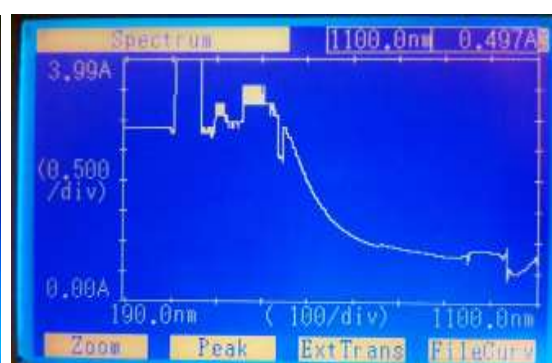
Extrait aqueux



Extrait méthanolique



Extrait acétonique



Extrait hydro-méthanolique

Figure 32: Mesure de l'absorbance en fonction de longueur d'onde dans chaque extrait de *P. perlatum*

Afin de mesurer la teneur en composition phénolique des différents extraits de *P. perlata*, la figure 32 montre l'analyse des spectres UV-Visible des composants responsable d'absorption de la lumière en fonction de la longueur d'onde de 190 nm à 1100 nm ; Comme indiqué dans la figure 33, les composants ont des concentrations faibles sinon une absence totale des composés qui absorbent la lumière de 400 à 1100 nm. Ceci peut être expliqué par le fait que les molécules les plus actives et qui sont souvent des métabolites secondaires extracellulaires sont présente dans le domaine UV (190-400 nm).

On commençant par l'extrait aqueux, dans l'intervalle [190-400 nm], il y a un pic de la DO à 280 nm, les molécules qui peuvent être présentes à cette longueur d'onde sont l'acide hydroxy-cinnamique, dihydrochalcone (Rezaire, 2012). Selon Thomas (2016), l'acide

Résultats et discussion

hydroxy-cinnamique est connue d'avoir des propriétés antioxydant, piègeurs des radicaux libres, inhibition des lipoprotéines LDL, Anti-infectieux, antifongique, antiseptique urinaire et expectorante par contre les dihydrochalcone sont une classe de métabolites secondaires, pour lesquels la demande dans les applications biologiques et pharmacologiques est toujours croissante. Les dihydrochalcones ont démontrés un large éventail d'activités biologiques, notamment anti-oxydantes, anti-inflammatoire, effets anti-microbiens, cytotoxiques et antispasmodiques (**Stompor et al., 2019**). Suivi par l'intervalle [400-1100 nm] qui enregistre une absorption maximale à 488 nm qui est due essentiellement à la présence des flavones et flavonoles (**Rezaire, 2012**).

Pour l'extrait méthanolique, on enregistre des absorbance marquées dans le domaine visible [300-1041 nm] ce qui indique à la présence de molécules bioactives responsables d'absorber la lumière dans cette région, le plus répandus est les flavonoles et les flavones caractérisés par une absorbance limité entre 280 et 520nm et l'acide norstictique (310 nm), Atranorine (321 nm). Selon **Studzinka-Sroka (2017)**, l'atranorine est un métabolite secondaire du lichen et appartient au groupe des depsides. Il y a des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, cytotoxiques, anti-oxydantes, antivirales et immuno-modulatrices. Tandis que l'acide norstictique est un depsidone produit comme un métabolites secondaires dans les lichens (**Hauk M et al., 2010**), il est capable de protéger les lichens en piégeant le espèces réactives de l'oxygène générées par des radiations UV intenses (**Dieu, 2015**).

Concernant l'extrait acétonique, l'absorbance des molécules dans le domaine visible est supérieur égale 3.090 à 413 nm, ce qui explique de l'existence de certaines molécules qui absorbent la lumière visible. Par contre on trouve des absorbances plus importantes dans la région de [413-547 nm], qui est du souvent à la présence des composés phénoliques comme les flavonoles et les flavones.

Enfin, dans l'extrait hydro-méthanolique, on enregistre des absorbances successives de la lumière dans l'intervalle de 450 à 503 nm où nous avons observé l'absorbance la plus élevée avec une valeur de 3.566 en comparaison avec les autres extraits en raison de leur propriété de polarité de solvant d'extraction. Selon **Rezaire (2012)**, les favonoles et les flavones sont responsables d'absorber la lumière dans cette région. Alors que dans la région de [503-1100 nm] on remarque une diminution de l'absorption jusqu'à 0.928 à 1043 nm.

Résultats et discussion

D'après le résultat des figures 31 et 32, on constate que la densité optique la plus élevée a été observé dans l'extrait acétonique chez les deux espèces, ce qui explique la présence de plus de molécules lichéniques capables d'adsorber la lumière que les autres extraits.

3.2. Dosages des composés phénoliques

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives des différents extraits des deux espèces étudiées, des dosages des flavonoïdes, dosages des tannins ont été effectués.

3.2.1. Dosages des flavonoïdes

Lors des dosages des flavonoïdes, après l'addition d' AlCl_3 et après incubation une couleur jaunâtre a été obtenu dans l'intensité est proportionnelle à la concentration des extraits, ce qui confirme la présence des flavonoïdes dans les extraits.

A cause du manque flagrant des produits et surtout le produit quercétine, on a opté pour l'adoption de la courbe d'étalonnage faite par **Ali-Rachedi et al. (2018)**.

Tableau4 : la teneur des flavonoïdes en mg EQ/g MS chez les deux espèces.

Extrait	Quantité des flavonoïdes		Equation de la courbe	R ²
	(en mg EQ/g MS) <i>F. caperata</i>	(en mg EQ/g MS) <i>P. perlatum</i>		
Méthanol	3,456	5,315	Abs = 0,002[Que] +0,139	0,995
Eau distillée	1,176	3,175		
Acétone	1,424	2,185		
Mélange (méthanol-eau distillée)	3,192	6,945		

Résultats et discussion

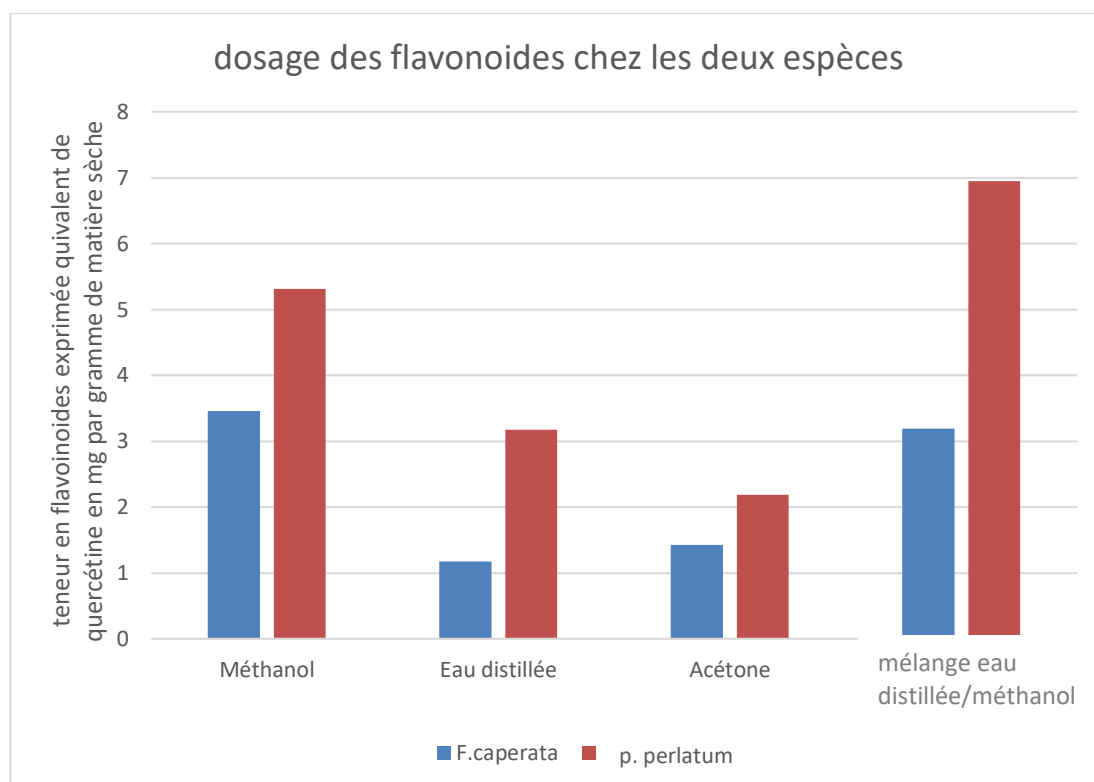


Figure 33 : dosage des flavonoïdes selon les solvants

Les résultats présentés dans le Tableau 4 et la figure 33 montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. Pour la première espèce *P. perlatum* l'extrait hydro-méthanolique enregistre un maximum de flavonoïdes (6.945 mg EQ/g MS), suivi par l'extrait méthanolique (5.315 mg EQ/g MS), puis l'extrait aqueux (3.175 mg EQ/g MS) et enfin l'extrait acétonique qui renferme des teneurs plus faibles (2.185 mg EQ/g MS).

Tandis que la concentration des flavonoïdes pour la deuxième espèce *F. caperata* a été aussi importante dans l'extrait méthanolique (3.456 mg EQ/g MS), suivi par l'extrait hydro-méthanolique (3.192 mg EQ/g MS), ensuit l'extrait acétonique (1.424 mg EQ/g MS) et l'extrait hydrolique qui correspond la concentration la plus basse (1.176 mg EQ/g MS).

D'après les résultats présentés ci-dessus, il est bien évident que le solvant « hydro-méthanolique » est le meilleur extracteur des flavonoïdes chez *P. perlatum*, et contrairement pour *F. caperata* où il était l'extracteur le plus faible alors que le méthanol était le meilleur avec une concentration égale à 3.456 mg EQ/g MS.

Résultats et discussion

Ces résultats des flavonoïdes dans toutes les fractions obtenues et quel que soit le solvant utilisé, sont supérieures à la concentration trouvée par **Mitrovic et al. (2011)**, où l'étude réalisée par macération avec le méthanol a donné une concentration égale à 110,65 µg EQ/ g d'extrait.

Selon l'étude de **Habbech et Yerdi (2018)**, qui rapporte que la valeur la plus faible est notée pour la fraction aqueuse, ce résultat est similaire à celui obtenu avec *F. caperata* et totalement le contraire pour le *P. perlatum* de notre étude.

L'étude de **Kout et Chihel (2018)**, n'est pas en accord avec le présent résultat, elle montre que l'extrait acétonique d'un lichen d'arbre renferme des teneurs de flavonoïdes plus faibles (0,058 mg EQ/g) que celle du lichen de mur (0,061 mg EQ/g). On enregistre aussi dans notre étude que l'extrait acétonique de *Parmotrema perlatum* est supérieure à celle de *F. caperata*, mais ces deux dernières espèces qui ont fait l'objet de cette présente étude, se développent sur les branches d'arbres et la teneur des deux en flavonoïdes est nettement supérieure à celle de l'étude citée.

Selon **Ali-Rachedi et al. (2018)**, l'extrait méthanolique enregistre un maximum de flavonoïdes chez *Scabiosa atropurpurea sub. Maritima* (plante médicinale de la famille des *Dipsacaceae*) avec un taux de 7.374mgEQ/g MS et c'est le cas pour l'extrait méthanolique de *P.caperata* (3.456 mg EQ/g) et même pour l'espèce *P. perlatum*, la teneur de l'extrait méthanolique était importante (5.315 mg EQ/g MS), mais après l'extrait hydro-méthanolique où la teneur était maximale (6.945 mg EQ/g MS).

Selon **Belkhir et Slimani (2016)**, Cette variabilité de teneurs en composés phénoliques notamment les flavonoïdes entre les différents extraits est dus à la différence de polarité des solvants utilisés et aussi au degré de polarité des composés phénoliques contenus dans nos échantillons de lichens.

D'après l'étude statistique, ce sont les extraits de l'espèce *Parmotrema perlatum* qui avaient des teneurs élevées en flavonoïdes totaux en comparaison à ceux de l'espèce *Flavoparmelia Caperata*.

Résultats et discussion

3.2.2. Dosages des tannins

L'étude montre que les teneurs en tannins des extraits présentent des différences significatives selon le solvant utilisé et entre les deux espèces utilisées dans cette étude.

À cause du manque flagrant des produits et surtout le produit catéchine, on a opté pour l'adoption de la courbe d'étalonnage faite par **Ali-Rachedi et al. (2018)**

Tableau5 : la teneur des tannins en mg EC/g MS chez les deux espèces.

Extrait	Quantité des tannins		Equation de la courbe	R ²
	(en mg EC/g MS) <i>F.caperata</i>	(en mg EC/g MS) <i>P. perlatum</i>		
Méthanol	6,920	11,350	Abs = 0,0002[Cat] +0.019	0,997
Eau distillée	5,520	12,350		
Acétone	9,480	13,150		
Mélange (méthanol-eau distillée)	9,800	9,550		

Résultats et discussion

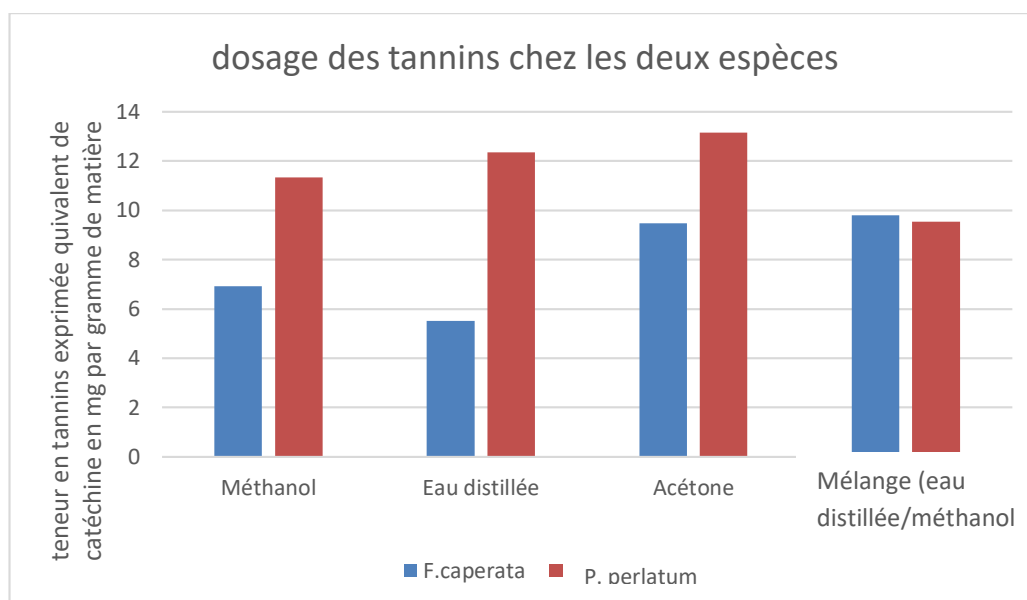


Figure 34 : comparaison du dosage des tannins selon les solvants.

Les résultats représentés dans l'histogramme (figure 34) et dans le tableau 5, révèlent que la concentration des tannins de la *P. perlatum* est très importante dans l'extrait acétonique qui est de 13.15 mg EC/g MS, suivi de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique avec des taux égaux à 12.350mg EC/g MS ; 11.350mg EC/g MS respectivement. Tandis que, la teneur la plus faible a été obtenue avec l'extrait hydro-méthanolique de valeur 9.550 mg EC/g MS d'extrait.

Concernant le *F. caperata*, la fraction hydro-méthanolique enregistre des teneurs plus élevées avec une valeur de 9.800mg EC/g MS suivie de la fraction acétonique et méthanolique à 9.480 mg EC/g MS et 6.920mg EC/g MS d'extrait, enfin de la fraction aqueuse a donné la concentration la plus faible à 5.520 mg EC/g MS.

Cette variation peut s'expliquer par le fait que l'extraction des tannins, dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (**Chavan et al., 2001**). D'après la figure 35, il est remarquable que la fraction acétonique se classait première dans sa capacité à extraire les tannins pour le *P. perlatum*. Mais pour le *F. caperata* la fraction hydro-méthanolique qui était meilleure que l'acétone.

Selon **Bruneton (2008)**, l'extraction des tannins condensés est, en règle générale, réalisée par un mélange d'eau et l'acétone ce qui explique les résultats obtenus pour l'espèce *P. perlatum*. Mais en voyant le travail d'**Ali-Rachedi et al. (2018)**, l'extrait méthanolique enregistre un maximum des tannins chez *Scabiosa atropurpurea* sub. *Maritima* (plante

Résultats et discussion

médicinale de la famille des *Dipsacaceae*) avec un taux de 6.736 mg EC/g MS ; ces résultats sont très similaires aux résultats de cette étude pour *P. caperata* où le meilleur extracteur des tannins est le mélange hydro-méthanolique.

La teneur importante en tannins condensés observée dans l'extrait acétonique chez les deux espèces pourra être expliquée par le fait que le solvant acétone a permis d'extraire des tannins de poids moléculaires élevé, et qui sont très solubles dans les solvants apolaires (tel que l'acétone) qui sont des solvants recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire, tels que les pro-anthocyanidines (Collin & crouzet, 2011).

3.3. Evaluation de l'effet anti radicalaire contre le radical DPPH

La figure ci-dessous représente les variations des pourcentages d'inhibitions obtenus en fonction des différentes concentrations de chaque extrait.

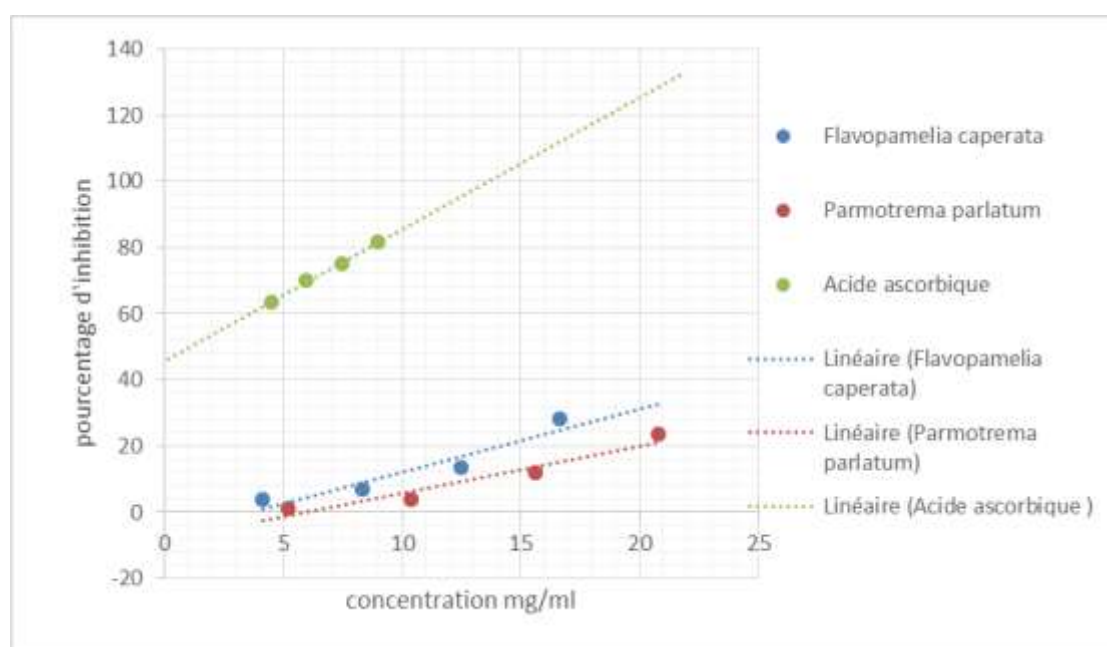


Figure 35: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations.

Dans la figure 35 On remarque que le pourcentage d'inhibition est proportionnel à l'augmentation de la concentration de l'extrait des deux espèces étudiées (l'augmentation du pourcentage d'inhibition est un indicateur d'une bonne activité anti radicalaire donc une relation dose-dépendante).

Résultats et discussion

Les pourcentages d'inhibition des extraits varient entre 63.33% (4.5 mg/ml) et 81.62% (9mg/ml) pour l'acide ascorbique, entre 3.69% (4.166 mg/ml) et 27.99% (16.66 mg/ml) et pour *Flavoparmelia caperata*, et entre 1.1% (5.208 mg/ml) et 23.33% (20.83 mg/ml) pour *Parmotrema perlatum* selon les concentrations utilisées dans cette expérience. On constate donc que le pourcentage d'inhibition de *Flavoparmelia caperata* est plus important que celui de *Parmotrema perlatum*, ce qui signifie que les différentes concentrations des extraits ont un effet moins important sur l'activité anti-radicalaire contre le DPPH par rapport à l'acide ascorbique qui était très effectif.

Lorsqu'on choisit la même concentration 9mg/ml pour tous les échantillons étudiées, on obtient que le pourcentage d'inhibition égale à 80% pour l'acide ascorbique et 8% pour le *F. caperata* et 6% pour le *P. perlatum*.

Le radical DPPH est l'un des substrats le plus utilise généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant en raison de son solubilité et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**).

Comparativement à l'étude de **Kosanić & al. (2011)** qui concerne l'activité scavenger du radical DPPH des extraits méthanoliques de cinq espèces de lichens, parmi elles *Lasallia pustulata* qui a révélé un pourcentage de (69.87%) contrairement à notre espèces qui présentent une activité antioxydant plus faible de 3.69% à 27.99% pour *F. caperata*, et de 1.1% à 23.33% pour *P. perlatum*.

Calcul des IC 50

L'IC50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH, qui est déterminé graphiquement par la régression linéaire établie entre les pourcentages d'inhibition et les différentes concentrations.

L'IC50 est exprimée en mg/ml, cependant une faible valeur d'IC50 correspond à une activité anti-oxydante élevée.

Résultats et discussion

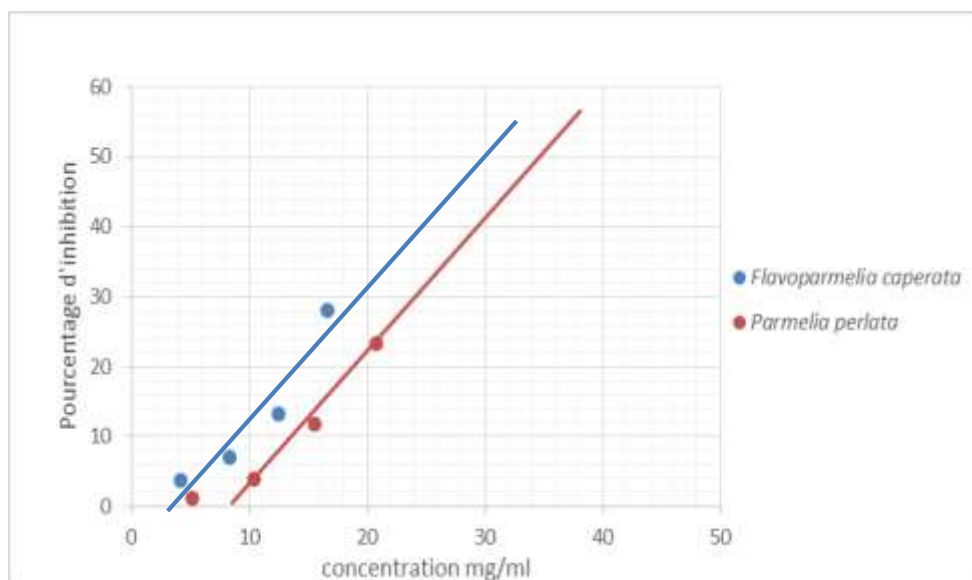


Figure 36: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations.

Afin de savoir les pourcentages d'inhibition 50%, on a fait une extrapolation sur les graphes. Pour l'acide ascorbique (via la figure 35) et des échantillons étudiés (via la figure 36) et ils sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6: IC50 des deux extraits et de l'acide ascorbique.

Echantillons	IC50
Acide ascorbique	2 mg/ml
<i>Flavoparmelia caperata</i>	30 mg/ml
<i>Parmotrema perlatum</i>	34.5 mg/ml

Résultats et discussion

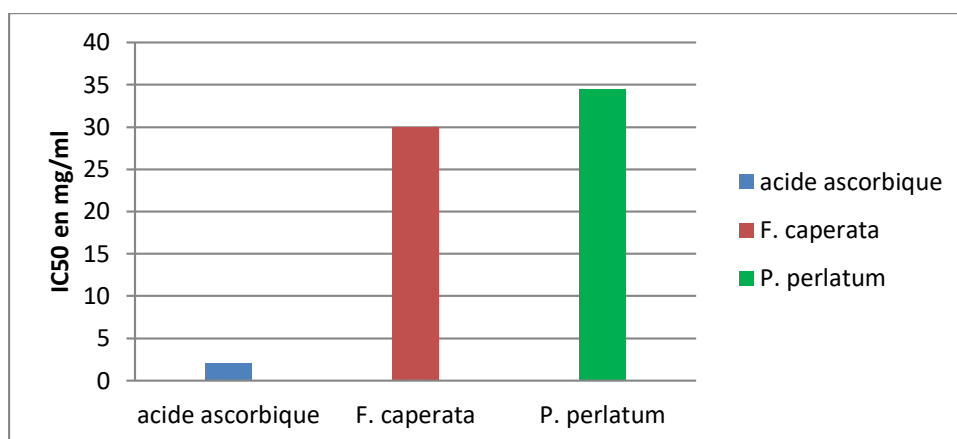


Figure 37: Concentration inhibitrice de 50% du radical DPPH des deux extraits et l'acide ascorbique.

En comparant les IC₅₀ des deux extraits par rapport à ceux de l'acide ascorbique, on remarque dans la figure 37 une activité anti-oxydante élevée pour l'acide ascorbique suivi par *Flavoparmelia caperata*, et finalement *parmotrema perlatum* avec les valeurs 2 mg/ml, 30 mg/ml et 34.5 mg/ml respectivement.

On peut dire donc que la capacité à réduire le radical DPPH est variable d'un extrait à l'autre.

Comparativement aux études de **Maisuthisakul et al. (2008)** et celle de **Bartak et al., 2004 in Lacheb et Rechoua (2017)** qui montrent que les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important indiquent que la différence de la concentration d'antioxydant fluctue avec les conditions de l'environnement extrêmes (haute température, haute lumière, pollution de l'air) car ces conditions réduisent la synthèse d'antioxydant dans les lichens et par conséquent diminuent son activité anti-oxydante. D'autre part, elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu (**Ouibrahim, 2015**).

Notre résultat est similaire à celle de **Friardi (2012)** qui indiquent que les résultats indiquent que l'acide ascorbique est la substance la plus active à piéger les radicaux libres DPPH par rapport aux deux extraits avec une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 2mg/ml.

Discussion générale

Les lichens produisent une variété de métabolites secondaires de défense en réponse à un stimulus externe (intensité lumineuse, prédation, pathogène, conditions climatiques, etc.) afin d'assurer la protection pour les partenaires symbiotiques. Ces métabolites peuvent être extraites en utilisant plusieurs solvant organiques, l'acétone, (**Asplund et Gausla, 2008**), le méthanol (**Rankovic et al., 2009**), l'eau distillée ainsi que la mélange hydro-méthanolique qui sont souvent employés. Plusieurs activités biologiques sont associées à ces métabolites de défense : anti-tumorale, antipyrétique, anti-inflammatoire, anti-oxydante, antimycobactérienne, antimicrobienne et analgésique. Les décoctions des lichens étaient d'ailleurs utilisées en médecine traditionnelle pour diverses raisons comme le traitement des maladies respiratoires (irritation de la gorge, toux, asthme et tuberculose), le diabète et les infections intestinales (**Claudia, 2016**).

Les extraits naturels des lichens contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées de diverses activités biologiques (**Esteban, 2002**). Parmi lesquelles les activités anti-oxydantes qui ont fait l'objet de cette présente étude afin de valoriser de plus les espèces locales et essayer de démontrer la grandeur de leur activité antioxydant.

Le résultat de l'estimation du taux d'humidité des échantillons des deux espèces lichéniques après séchage a pu révéler un pourcentage de 9% pour la *Flavoparmelia caperata* et 6% pour la *Parmotrema perlatum*. Il est à noter que ce pourcentage dépend essentiellement des conditions dans lesquelles se trouvent les lichens et selon **Pech (2013)**, ces derniers ont la capacité de résister aux changements environnementaux et peuvent vivre avec une teneur de l'ordre de 2% ! Les lichens comme les cellules végétales, possèdent de l'eau qui est une source de dégradation de polyphénol par oxydation (**Ribereau-gayon, 1968**).

Tomas-Babera et Espin (2001) a rapporté que pour éviter la dégradation, on procède à un séchage pour éliminer l'eau, tout en préservant la composition chimique des cellules. Le séchage inhibe aussi les enzymes existantes (le polyphénol oxydase).

D'après la mesure de l'absorption spectrophotométrique des différents extraits des deux espèces lichéniques *Flavoparmelia caperata* et *parmotrema perlatum* dans un intervalle de longueur d'onde de 190 à 1100 nm, il est bien clair qu'il y'en a plus de molécules qui absorbent la lumière UV [190-400 nm], que des molécules qui absorbent la lumière visible [400-1100 nm]. En se référant à la littérature, parmi les molécules présentes dans le domaine

Discussion générale

UV, on trouve : l'acide hydroxy-benzoïque, l'acide hydroxy-cinnamique, les flavanoles, le dihydrochalcone, les flavonones, les tannins, l'isoflavone (**Claudia, 2016**).

Selon **Yamamoto et al. (2015)** ; les acides lichéniques sont l'une des plus grande classe de biomolécules secondaires, qui peuvent être collaborés dans divers activités notamment les activités antioxydants, car ils peuvent participer comme donneurs d'électrons dans le milieu réactionnel.

De nombreuses études ont établi des relations entre la structure chimique des acides lichéniques qui sont majoritairement de nature aromatiques dont les atomes forment des structures cycliques et leur capacité anti-oxydante (**Dieu, 2015**).

Les polyphénols sont des composés que l'on trouve souvent dans tous les plantes et referment plus de 8000 composés naturels (flavonoïdes, tanins, coumarines...) (**Djeridane et al., 2006**). Il est connu que la plupart des effets biologiques à l'origine des flavonoïdes et des tannins tels que l'activité antidiabétique et anti-inflammatoire, maladies génératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaire (**Rock, 2003 ; Boizot et charpentier, 2006**), sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (**Niki, 2010**).

Pour les flavonoïdes comme l'un des groupes les plus diverses et le plus répandu des composés naturels chez les végétaux et les lichens, se sont probablement les composés phénoliques naturels les plus importants. Ces composés possèdent un large spectre d'activités chimiques et biologiques, y compris les propriétés anti-radicalaires (**Djeridane et al, 2010**).

Dans cette étude on a utilisé la méthode $AlCl_3$, qui est simple, peu coûteuse et offre une bonne sensibilité. Cette méthode permet de déterminer la teneur en flavonoïdes totale, qui forment un complexe avec $AlCl_3$ même en présence d'autres composés polyphénoliques, qui ne peuvent pas former un complexe avec $AlCl_3$ (**Trabsa, 2015**). La teneur en flavonoïdes a été estimée en utilisant cette méthode décrite par **Oyaizu (1986)** et en exprimant les résultats en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait). Dans notre travail, la teneur la plus élevée en flavonoïdes à états observé chez la *Parmotrema perlatum* en comparant avec la *Flavoparmelia caperata*. Selon le travail d'**Aous et Boufenchouche (2016)**, ces teneurs sont beaucoup plus faibles surtout pour l'espèce F.

Discussion générale

caperata et selon le même travail, cette dernière contient plus de flavonoïdes que l'espèce *Cetrelia olivetorum*.

Les concentrations des flavonoïdes dans toutes les fractions obtenues sont supérieures à celles trouvées par (Mitrovic *et al.*, 2011 in Dieu, 2015) (une étude qui a été réalisée sur le lichen *Flavoparmelia caperata* par macération avec le méthanol).

D'une part, les résultats montrent et confirment la variabilité du contenu phénolique des lichens étudiés ; dont la majorité des composés se trouve dans les fractions moyennement polaires, mais aussi une quantité est récupérée dans la fraction la plus polaire (aqueuse) (Yedra et Habbeche, 2018).

D'autres part, le solvant « acétone » ayant un caractère apolaire permet d'extraire les flavonoides apolaire de type aglycone, tandis que l'eau qui est polaire, et les solvants méthanol/eau permettent d'extraire uniquement les flavonoides polaires (flavonoides glycosylés). On déduit d'après ces observations que les échantillons sont riches en flavonoïdes glycosylés (hétérosides) et pauvre en flavonoïdes aglycones en se basant sur les conclusions tirées de l'étude de Belkhir et Slimani (2016).

Concernant la teneur en tanins, elle est déterminée par la méthode de Julkunen- Titto, (1985) ; cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500nm.

On constate qu'il y a une différence de concentration en tannins entre les deux espèces, dont la valeur la plus élevée a été signalé chez la *Parmotrema perlatum* pour l'extrait acétonique en raison de sa polarité moyenne et sa capacité élevée à favoriser une plus grande libération de composés bioactifs. Lorsque ces mêmes extraits sont comparés à l'aide d'autres méthodes de mesure de la capacité anti-oxydante, qu'elles soient chimiques et/ou biologiques, l'extrait acétonique a démontré le pouvoir antioxydant le plus élevé dû, très certainement, à la capacité de ce solvant à extraire plus de molécules présentant un caractère antioxydant (Rezaire, 2012). Alors que chez le *F. caperata*, la valeur la plus élevée est trouvée dans l'extrait hydro-méthanolique.

Les différences existantes entre les extraits peuvent être liées à la nature du solvant ainsi qu'à la méthode d'extraction utilisée, puisque la solubilité des composés phénoliques contenus

Discussion générale

dans les fractions obtenues est affectée par la polarité des solvants utilisés (**Garcia- Salas et al., 2010**).

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses, et sont peu solubles dans les solvants organiques apolaires (**Bruneton, 1993**).

Mais l'inconvénient est que l'eau et l'acétone extraient des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors du dosage des tanins (**Belkhir et Slimani, 2016**).

Donc, la variabilité des teneurs en polyphénols chez ces deux espèces est dû probablement à la richesse en composés phénoliques des extraits, aux facteurs génotypiques, aux conditions biotiques (espèce et l'état physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques), au type du microclimat (**Belyagoubi, 2011**), l'année et la saison de la récolte, (**Amieur et Chabounia, 2014**) et aussi au standard utilisé pour l'expression des résultats.

Le radical DPPH est l'un des substrats le plus utilisé généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa solubilité et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**). Il se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution. Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait du lichen peut être déterminée (**Dorman et al., 2011**).

Dans ce travail on a mesuré la capacité des extraits de *F.caperata* et *Parmotrema perlatum* à réduire le radical DPPH en comparant leur activité avec une molécule qui est connue pour son pouvoir antioxydant et qui est l'acide ascorbique. Les pourcentages du DPPH résiduels en fonction des concentrations des échantillons nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du DPPH initiale à 50%. Cette valeur est appelée IC50 (**Belyagoubi, 2011**).

Discussion générale

Les résultats obtenus sont similaires à ceux de **Yedra et Habbeche (2018)** qui montrent une augmentation du pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des concentrations soit pour le standard (l'acide ascorbique) ou pour les différents extraits.

Nous indiquons aussi que l'IC50 de tous les échantillons est inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important comme il est décrit par (**Aous et Boufenchouche, 2016**).

Nous trouvons que l'IC50 de l'acide ascorbique est de l'ordre de 2mg/ml, *F. caperata* 30mg/ml et *Parmotrema perlatum* 34.5mg/ml ce qui signifie que les différentes concentrations des extraits ont un effet moins important sur l'activité anti-radicalaire contre le DPPH par rapport à l'acide ascorbique et que *F. caperata* a une activité anti-oxydante plus élevée que *Parmotrema perlatum*, sachant que l'extrait méthanolique contient la plus grande quantité de composés phénoliques s'est avéré être le piègeur de radicaux le plus actif (**Arabshahi et Urooj, 2006**).

Cette différence de l'activité anti-radicalaire (DPPH) peut être expliquée par la différence des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes qui ont un pouvoir d'agir comme des agents réducteurs en donnant plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (**Pietta, 2000**).

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la littérature car le contenu phénolique d'un extrait lichénique n'est que relatif et semble être lié à la nature de l'espèce, aux conditions dans lesquelles l'extraction est faite, au solvant utilisé, mais aussi aux méthodes d'extraction appliquées (**Behera et al., 2005**).

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la valorisation des produits naturels d'origine végétal et l'évaluation de l'effet de la pollution atmosphérique sur les organismes vivants, on a essayé dans cette étude d'évaluer l'activité anti-oxydante chez deux espèces lichéniques locales *Flavoparmelia caperata* et *Parmotrema perlatum* et ceci à travers le dosage des marqueurs biochimiques incluant les flavonoïdes et les tannins ainsi que via la mesure de l'activité anti-oxydante par l'utilisation du DPPH.

L'étude a démontré que les lichens utilisées (*Flavoparmelia caperata* et *Parmotrema perlatum*) ont la capacité de produire des anti-oxydants très divers et qui ont des activités anti-oxydantes très encourageantes pour continuer l'étude et aller profondément dans l'identification des molécules et les évaluations les plus précises des différents effets incluant l'effet anti-oxydant essentiellement en les mettant en relation avec le stress oxydatif.

Les deux espèces lichéniques possèdent plusieurs propriétés biologiques et ont de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie et cosmétologie. La richesse de nos extraits en composés phénoliques et plus essentiellement en flavonoïdes et en tannins et leurs capacités anti-oxydantes qui semblent très importantes méritent d'être étudié et surtout valoriser à l'échelle industrielle.

Les métabolites secondaires lichéniques jouent un rôle très important dans la protection contre le stress et plus précisément la pollution atmosphérique et ceci ne peut être envisageable qu'à travers les molécules qui ont un effet antioxydant, et ces mêmes molécules peuvent être des bio-marqueurs capables de révéler le degré de pollution de l'environnement.

En perspectives, ces résultats restent partiels, donc il serait intéressant de caractériser et d'identifier les anti-oxydantes à savoir : les composés phénolique contenus dans les extraits et également d'étudier les possibles activités biologiques des extraits des deux espèces *Flavoparmelia caperata* et *Parmotrema perlatum* afin de :

- Mettre en évidence d'éventuelles activités: anti-tumorale, anticancéreuse, anti-inflammatoire, antimicrobienne et cytotoxique des métabolites secondaires synthétisés par les lichens.
- Caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés.
- De plus, il est souhaitable de réaliser des études in vivo et complémentaires afin de comprendre le mécanisme moléculaire et cellulaire de l'activité anti-oxydante

Conclusion et perspectives

- La recherche de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être une alternatif des médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments anti-radicalaires à base de lichens, doués d'une activité anti-oxydante importante.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

Abderrazak M, Joel R. (2007), La botanique de A à Z. Ed. Dunod, Paris, p. 177.

Agroum S. Koucha S. (2016), Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo* et hypoglycémante des composés phénoliques d'extraits du lichen *xanthoria parietina* de la région de Boumerdès. Mémoire de master, université M'Hamed Bougara Boumerdès, 112p.

Ali-Rachedi F. Meraghni S., Touaibia N. & Sabrina M. (2018), Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea sub. Maritima L.* *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 87, articles, p. 13 -21.

Amieur R. et Chabounia A. (2014), étude quantitative des composés phénoliques de deux plantes et évaluation *in vitro* de leur activité biologique, mémoire de master, spécialité: toxicologie de l'environnement, Université Med-Seddik ben Yahia. Jijel, 83p.

Amirouche N., Bouguedoura N. et Hadj arab H. (2008), Botanique : algues champignons lichens, Ed Houma, Alger, 99p.

Aous S et Boufenchouche L. (2016), Etude de la toxicité d'un mélange de pesticides chez la souris et exploration de l'effet protecteur de l'extrait brut de *Flavoparmelia caperata*, mémoire de master, Option : Toxicologie de l'environnement, Université Med-Seddik benyahia. Jijel. 67P.

Aprile G.G., Catalano i., Migliozz A et Mingo A. (2011), Monitoring epiphytic lichen biodiversity to detect environment quality and air pollution: the case study of Reccamonfina Park (Campania Region-Italy), in air pollution –new developments, Anca Maria Moldoveanu, 22-244.

Aptroot A. (2001), Lichenized and saprobic fungal biodiversity of a single *Elaeocarpus* tree in Papua New Guinea, with the report of 200 species of *ascomycetes* associated with one tree. *Fungal Divers.* 6, 1–11

Arabshahi S. et Urooj A. (2006), Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves: *Food Chemistry* 102 (2007) 1233–1240.

Asplund J. et Gauslaa Y. (2008), Mollusc grazing limits growth and early development of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in broadleaved deciduous forests. *Oecologia* 155:93–99.

Références bibliographiques

- Beaudeau J.L. et Durand G. (2008)**, Biochimie médicale marqueurs actuels et perspectives. 2ème Ed Lavoisier. Paris p113. ISBN : 978-2-257-20472-1.
- Beaudeau, J.L., Peynet, J., Bonnefon, R.D., Therond, P., et Delattre, A.L. 2006.** Stress oxydant, Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote : implication dans la transcription et la régulation des gènes.
- Behera B. C., Verma, N., Sonone A., et Makhija U. (2005)**, Antioxydant and antibacterial activities of lichen *usnea ghattensis in vivo*, *Biotech. Lett*, 27: 991-995.
- Belkhir S. et Slimani K. (2016)**, Dosage des polyphénols et étude de leurs activités antioxydantes des extraits du lichen *Collema cristatum* récolté dans le parc national de Gouraya (Bejaia), mémoire de master, université Abderrahmane MIRA de Bejaia, 52p.
- Bellenfant S., Vallade J., Beguinot J., Sirugue D et Lemmel G. (2010)**, - les lichens : une symbiose exemplaire. *Rev. sci. Bourgogne-Nature*. 12 : 30-45.
- Belyagoubi N, (2011)**, Activité anti-oxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat en biologie, spécialité : Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèse. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 131p.8
- Bertrand P. et Bauwens A. (2003)**, Les lichens et la qualité de l'air, mémoire de master, université catholique de Louvain, UCL – *Scienceinfuse* - Antenne Facultaire pour la Promotion des Sciences, 41p.
- Birben E., Sahiner U. M., Sackese C. Erzurum S., et Kalayci O. (2012)**, Oxidative Stress et Antioxydant Defense/*WAO Journal* 5(1) :9-19.
- Boizot N. et Charpentier J. (2006)**, Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des oranges d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairaux et aquatiques, *INRA*, 79-82.
- Boudebouda K. et Hank N. (2013)**, Contribution à la détermination des biomarqueurs de stress oxydant chez les lichens, mémoire de master, université de Jijel, 60p

Références bibliographiques

Boudjouref M. (2011), Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.* mémoire de master En Biochimie appliquée, Université Ferhat Abbes Sétif, 99p.

Bouziane M. (2006), Etude physico-chimique de l'accumulation de métaux lourds par les lichens : Impacts sur les voies de biosynthèse et interprétation du mécanisme de tolérance chez *Diploschistes muscorum*. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, 185p.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic L.J., Simin N., Samojlik I. et Couladis M. (2008), Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Bekker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* scheele essential oils. *Molecules*. 13(9):2058–2068.

Bruneton J. (2008), Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Edition Tec. p.199-339.

Bruneton J. (1993), pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, 2^{ème} édition, Lavoisier TEC et DOC, Paris, p 268-277.

Bruneton J. (2009), Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} Edition, lavoisier. Paris.

Caniglia G., Tassoni T. et Carboni C. (1998), Thallus variations of *Parmelia caperata* exposed in suburbs and industrial area (Venice, north-east Italy). *Diapartimento Di Biologica via Trieste* 75:95-102.

Chavan U.D., Shahidi F. et Nacz M. (2001), Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathrus maritimus L.*) as affected by different solvents, *Food Chem* 75: 509- 512.

Claudia C. (2016), Investigations phytochimiques de lichens soumis au stress de la nordicité. Mémoire de master, université LAVAL, Québec, Canada, 193p.

Collin S., et Crouzet J. (2011), Polyphénols et procédés. Edition Lavoisier TEC & DOC, Paris, 235 p.

Collombet C. (1989), Lichen d'Islande et lichen pulmonaire, Sciences pharmaceutiques. dumas-00809411, University Joseph Fourier Grenoble Pharmacie, 115p.

Références bibliographiques

Cook N.C. et Samman S. (1996), flavonoids, Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The journal of Nutritional Biochemistry* 7(2):66-76.

Culberson C.F et Elix J.A. (1989), Lichen substances. In Harborne J.B., *Methods in plant biochemistry. Plant phenolics. Academic press* (1): 509-535pp.

Derdane D. et Khelifi S. (2017), Evaluation biologique et phytochimique des métabolites naturels de quelques espèces lichéniques du parc national du Djurdjura. Mémoire de master, Université Akli Mohand Oulhadj. Bouira, 88p.

Dieu A. (2015), Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichéniques : Etude phytochimique de trois lichens et approche synthétique de deux composés actifs. Thèse de doctorat, Université de Limoges, France, 299 p.

Djennas M. et Hamioud L. (2016), Contribution à l'étude des métabolites secondaires et évaluation de l'activité antibactérienne et anti oxydante des extraits de deux lichens du genre *Laubaria* : *L. pulmonaria* (L.) Hoffem et *L. virens* (with.) Laundon, Mémoire de master, Option phytopharmacie et gestion des agrosystèmes. Université Med-Seddik benyahia. Jijel. p22.

Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M. et Stocker P. (2010), Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48 : 2599-2606.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006), Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J. Food Chem.* 97: 654–660.

Dorman H.J., Bachmayer O., Kosar M., et Hiltunen, R. (2011), Anti-oxydante properties of aqueous extract from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. *J. Agr. Food Chem.* 52:762-770.

Doymaz I., Gorel O. et Akgun N.A. (2004), Drying characteristics of the solid by product of olive oil extraction. *Biosystems Engineering* 88: 213-219.

Références bibliographiques

- El Gharras H. (2009)**, "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* 44 (12): 2512-2518.
- Elkolli M. (2017)**, Structure et activité des substances naturelles : principes et applications. Master académique en écologie microbienne, *université Ferhat Abbas*, Sétif, p 44.
- Esteban I. (2002)**, Lichenes usados en medicina tradicional. *Bol Soc Micol Madrid*. 36 :163-174.
- Favier A. (2003)**, Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 108-115.
- Favier, A. (2006)**, Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* p 64: 390-396.
- Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C. (2001)**, The *in vitro* dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*. 39: 153 -162.
- Friardi I. (2012)**, Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon* : étude particulière de *S. Halei Lamb* et *S. montagneanum Lamb*, deux lichens récoltés en Indonésie. Thèse de doctorat en sciences, spécialité : chimie. Université de Rennes, 284p.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A., et Fernández-Gutiérrez, A. (2010)**, Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* 15, 8813-8826.
- Garre I.C., Ceballos- Picot I., Germain G et Al-Gubory K.H, (2007)**, Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death *in vivo*, *Free Radical Research*. 41: 251-259.
- Ghanemi F. et Haggani L. (2017)**, Effet de séchage à la micro-onde et à l'étuve sur la composition phénolique et l'activité antioxydante de *Pistacia lentiscus L.* mémoire de master, Université A. Mira – Bejaia, 42p.
- Ghestem A, Seguin E, Paris M, Orecchioni AM. (2001)**, Le préparateur en pharmacie dossier 2^{ème} Ed, Techniques et documentation. Paris, 275p.

Références bibliographiques

- Giusti M.M. et Wrolstad R. E. (2001)**, "Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy", *Current protocols in food analytical chemistry*: John Wiley & Sons, New York: Unit. F1.2.1-13.
- Gonzalez A.G. et Estevez-Brauna A. (1997)**, Coumarins, *Natural Product Research* 14: 465-475.
- Hans M J. (2011)**, Guide des fougères, mousses et lichens d'Europe : plus de 650 espèces photographiées. Ed. *Delachaux et Niestlé SA*, Paris. 257p.
- Harborne J.B. (1998)**, phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition, 278p.
- Hauk M ., Jugens S-R., Leuschner C. (2010)**, acide norstictique: corrélation entre ses caractéristiques physico-chimiques et les préférences écologiques des lichens produisant cette depsidone. *Botanique environnementale et expérimentale* 68(3) :309-313
- Hawksworth D.L., (1976)**, lichen chemotaxonomy. In: BROWN D.H; HAWKSWORTH D.L., BAILEY R.H. Ed. Lichenology: progress and problems. The systematics association special volume, n°8, *academic press*, London and New York. Pp 139-184
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002)**, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(10): 572-584.
- Hopkins W.G. (2003)**, Physiologie végétale. *De Boeck supérieur*, Belgique, 532 p.
- Humbert, R. (2012)**, Les lichens : Un autre monde. *Isatis* N° 12, 182, 183, 184.
- Huneck S, Yoshimura I. (1996)**, Identification of Lichen Substances. Heidelberg: Springer Verlag, Berlin 493 p.
- Jean C.L. (2010)**, Biologie végétale. 3^{ème} Ed, *Dunod*, Paris, 316 p.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. et Stevens P. (2002)**, Botanique Systématique : une perspective phylogénétique, 1^{ère} édition, Ed Deboeck, p. 84-336.

Références bibliographiques

Julkunen-Titto R. (1985), “Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics”. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 33: 213-217.

Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin M.S. et Sun C.M. (2005), Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 15 : 3584-3587.

Khebbaz W. et Gobbi R. (2014), Traçabilité de l'identification des métabolites, édition Masson, Paris, 808 p.

Kosanic M., Branislav R. et Vukojevic J (2011), Antioxidant properties of some lichen species, *J Food Sci Technol* 48(5):584–590.

Kout M. et Chihel A. (2018), Activité antibactérienne et caractéristiques Phytochimiques des lichens issus de l'est algérien, mémoire de master, université des Frères Mentouri. Canstantine, p35.

Kumar G.P., Kumar V.S. et Kumar S.A. (2015), Pharmacological and phytochemical aspects of lichen *Parmelia perlata*, hindu college of pharmacy, sonapat (Haryana), India.

Lacheb C. et Rechoua A. (2017), Etude de la variation de l'activité biologique de quelques espèces bio-indicatrices (Lichens). Mémoire de master, Université de Med-Seddik Benyahia Jijel, 62p.

Liang N. et Kitts D.D. (2014), Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molécules*, 19(11) :19180-19208.

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

Maisuthisakul P., Pasuk et Ritthiruandj P. (2008), Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some the plants *Journal of Food Composition and analysis* 21, pp: 229-240.

Références bibliographiques

Maizi N., Alioua A. et Tahar A. (2011), Jumelage des bio-indicateurs et d'un réseau de surveillance de la qualité de l'air pour la détection de la pollution par le SO₂ dans la région d'Annaba (Algérie). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 16(2), 149-158.

Masson J-C. (2014), Les lichens, bioindicateurs de la qualité de l'air- IFE - avril 2014.

Merken H. M., et Beecher G. R. (2000), "Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3): 577-599.

Milane H., (2004), - la quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'Université de Limoges. Paris : p : 155.

Mitrović T., Stamenković S., Vetković V., Tosić S., Stanković M., Radjojević I., Stefanović O., Čomoć L., Đačić D., Curčić M. et Marković S., (2011), Antioxydant, antimicrobienne et antiproliférative activités de cinq espèces de lichens. *International journal of molecular sciences* 12:5428-5448.

Mulnar K. et Farkas E. (2010), Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z. Naturforschung C J. Biosci.* 65, 157–173.

Murtagh G.J., Dyer P.S. et Grittenden P.D. (2000), - Sex and the single lichen Nature. School of Biological Sciences, University of Nottingham, University Park, UK. 404(6778):564

Nancy J., Linford S.I., Chriner E. et Rabinovitch I. (2006), - Oxidative damage and aging: spotlight on mitochondria. *Cancer research.* 66: 2497-2499.

Nash III T.H. (2008), Lichen Biology, 2^{ème} édition Ed. Cambridge University Press, 498 p.

Nedeljko T. Manojlovic, Perica J. Vasiljevic, Pavle Z. et Maskovic. (2011), Chemical composition and antioxidant activity of lichen *Toninia candida*, *Rev. bras. farmacogn.* 22 (2) : 291-298.

Niki E. (2010), Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 49(4):503-15.

Références bibliographiques

Obame Engonga L. C. (2009), Etude Phytochimique, Activités Antimicrobiennes et Antioxydantes de Quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines. Mémoire de master, Université de Ouagadougou, p252

Olafsdottir E.S. et Ingólfssdóttir K. (2001), polysaccharides from lichen: structural characteristics and biological activity, *Planta Medica* 67:199-208.

Omrarsdottir S., freysdottir J. et olfsdottir E.S. (2007), Immunomodulating polysaccharides from the lichen *Thamnolia vermicularis var. subuliformis*. *Phytomedicine*. 14: 179-184.

Ouibrahim A. (2015), Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis L.*, *Ocimum basilicum L.* et *Rosmarinus officinalis L.*) de l'Est Algérien. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 95p.

Oyaizu M. (1986), Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44 : 307-315.

Pech P. (2013), Les milieux rupicoles: Les enjeux de la conservation des sols rocheux. Versailles. Editions Quae. 159p.

Pietta P.G. (2000), Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. Jul;63(7):1035-42.

Podterob A.P. (2008), Chemical composition of lichens and their medical applications, *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 42(10): 582-588.

Porpovic C.I., Saykova B. et Tylkowski. (2009), Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 4 : 25–39.

Rankovic B., Mišić M. et Sukdolak S. (2009), Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biologia* 64/1: 53—58.

Rebaya A., Belghith S.I., Baghdikian B., Leddet V.M., Mabrouki F., Olivier E., Cherifi J.K. et Ayadi Malika Trabelsi (2015), Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *J Appl Pharm Sci* 2015; 5: 52-7.

Références bibliographiques

Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M. et Aggarwal B.B. (2010), Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?/ *Free Rad Biol Med* 49: 1603-1616.

Rezaire A. (2012), Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat, Université des Antilles et de la Guyane.

Ribereau-Gayon. (1968), Incidences oenologiques de la pourriture du raisin1. *EPPO Bulletin* 12(2) : PP:201-214.

Robbins R. J. (2003), "Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(10): 2866-2887.

Rock E. (2003), Stress oxydant, micronutriments et santé, Unité des maladies métaboliques et micronutriments. Inra – CRNH, Université d'été de nutrition- Clermont- Fenand, 37-42.

Roger, R, Matthew, B, & Jaayne, B. (2007), A Field Guide to Biological Soil Crusts of Western U.S. Drylands : Common Lichens and Bryophytes, 104 p.

Roux D. et Catier O. (2007), Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. Wolters Kluwer France Edition, p 74 In : Boubekri Cherifa., (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par techniques électrochimiques. Thèse de doctorat, Université Mohamed khider de biskra. P39.

Samhoune F., (2001), Détection de la pollution plombique d'origine automobile à de transplantation lichénique dans l'agglomération de Tizi-ouzou. Mémoire de magister. Université de Tizi-ouzou. 83p.

Schrestha G., et Clair L.L.S. (2013), Lichens: a promissing source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochem Rev* 12: 229-244.

Smirnoff N. (2005), Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. Copyright by Blackwell Publishing Ltd.

Stecher G., Huck C. W., Popp M. et Bonn G. K. (2001), "Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 371(1): 73-80.

Références bibliographiques

- Stocker-Wörgötter E. (2008)**, Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes, *Nat Prod Rep* 25, 188–200.
- Stompor M., Brodo D. et Bajak-Bil A. (2019)**, dihydrochalcones: Modes d'accumulations et propriétés pharmacologiques-une première revue systématique. 24(24), 4468.
- Studzinska-Sroka Elzbieta, Galanty Agnieszka et Bylka Wieslawa (2017)**, Atranorin – An Interesting Lichen Secondary Metabolite, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 17(17):1633 - 1645
- Subramanian S., Stacey G. et Yu O. (2007)**, Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends plant science*. 12: 282-285.
- Thomas D. (2016)**, Les Antioxydants De Nos Jours : Definition Et Applications. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, 84p
- Tomas-Babera F.A. et Espin J.C. (2001)**, Phenolic compounds and related enzyme as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the science of food and agriculture* 81: 853-876.
- Trabsa H. (2015)**, Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum*. Thèse Doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 99p
- Urquiaga I. et Leighton F. (2000)**, Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biology Research* 33 :55-64.
- Yamamoto Y., Hara K., KwKmi H., Komine M., Upreti D.K.,Paradeep K., Shukla D.V., et Rajpai R. (2015)**, Lichen substances and their biological activities in : Recent advances in lichenology modern methods and approaches in lichen systematic and culture techniques, vol 2^{ème} edition. Springer. India. 232 p.
- Yedri A. et Hebbache A. (2018)**, Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits du lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach. Mémoire de master, Université Med –Seddik Benyahia-Jijel, 57p.

Références bibliographiques

Zerargui F. (2015), Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis L.* et caractérisation des substances bioactives. Thèse de doctorat, université Ferhat Abbas Sétif, 169 p.