

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل
Université Med –Seddik Benyahia-Jijel

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département des Sciences de l'Environnement
et des Sciences Agronomiques



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم علوم المحيط والعلوم الفلاحية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique**

Filière : Sciences Biologiques

Option : Toxicologie Fondamentale et Appliquée

Thème

Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des
extraits du lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach

Présenté par :

- YEDRI Amina
- HEBBACHE Amel

Jury de soutenance :

Président : M^{me} LEMZERI H.
Examinatrice : M^{me} BOULASSEL A.
Encadreur : M^{elle} SALEM S.

Session : juin 2018

Numéro d'ordre (réservé à la bibliothèque).....

Laboratoire : Ecotoxicologie

Je dédie ce travail

A Ceux qui sont les plus chères au monde. A mes parents sans lesquels je ne serai pas arrivée jusque là,

Les mots me manquent pour vous qualifier, tout ce que j'aurais à dire ne saurait, exprimer à fond tout le sacrifice et l'endurance que vous avez dû subir pour me élever.

Vous êtes l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est en partie le fruit de vous soutien et sacrifices.

A mes chers frères, pour leurs conseils et leurs encouragements, et qui n'ont jamais cessé de croire de mes capacités.

A le bonheur de ma vie, ma très chère amie et mon binôme Amina, pour son amitié, sa gentillesse, et qui ma apporté son appui durant toutes notre années d'étude. Sans elle ce mémoire n'aurait jamais un le jour. Que notre amitié dure toujours.

Et Puisse Dieu, le tout puissant, vous préservez, vous accordez santé, longue vie et bonheur.

Amel

Je dédie ce travail

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères et sœurs

Housseem, Bessem, Feriel, Hadjer, Zineb, Fatima et Kanza

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

A Amel

Merci pour l'amitié sincère que tu me portes depuis 5 ans. A nos souvenirs, nos bonheurs partagés ensemble. Pour m'avoir aidée et supportée dans mes études. Que notre amitié dure toujours.

A tous merci.

Amina

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 adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur M^{elle} SALEM Samira qui nous a dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous sommes très heureuses de pouvoir compter : Madame / Boulassel. A, en tant qu'examinatrice, et Madame / Lemzeri. H, en tant que présidente, parmi les membres de jury et nous leur sommes très reconnaissant d'avoir accepté de rapporter ce travail.

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

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des Sciences de la nature et de la vie pendant les cinq années de notre parcours.

Merci

Amel & Amina

Sommaire

Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des abréviations.....	vi
Introduction.....	1

Chapitre I : Etude de la végétation lichénique

I.1. Généralité.....	3
I.2. Définition.....	3
I.2.1. Les partenaires de la symbiose lichénique.....	3
I.3. Morphologies et anatomie des lichens.....	4
I.3.1. Différents types de thalles lichéniques.....	4
I.3.2. Différents types de structures anatomiques des thalles.....	5
I.4. Reproduction des lichens.....	7
1.4.1. Multiplication végétative.....	7
1.4.2. Reproduction sexuée.....	8
I.5. Nutrition des lichens.....	9
I.6. Ecologie et répartition des lichens.....	10
I.7. Rôle et usages des lichens.....	11

Chapitre II : Métabolites lichéniques

II.1. Métabolites lichéniques.....	13
II.1.1 Les métabolites primaires.....	13
II.1.2. Les métabolites secondaires.....	13
II.1.3. Les principales catégories des métabolites secondaires.....	14
II.1.3.1. Les polyphénols.....	14

II.1.3.2. Les alcaloïdes.....	16
II.1.3.3. Les terpénoïdes.....	16
II.1.4. Biosynthèse des composés phénoliques.....	16
II.1.5. Activité biologiques des lichens.....	17
II.2. Activités antioxydantes des métabolites secondaires lichéniques.....	18
II.2.1. Stress oxydant.....	18
II.2.2. Radicaux libres.....	19
II.2.2.1. Formes des radicaux libres.....	19
II.2.2.2. Sources des radicaux libres.....	20
II.3. Les antioxydants.....	21
II.3.1. Antioxydants enzymatiques.....	21
II.3.2. Antioxydants non enzymatiques.....	21
II.4. Mécanismes d'actions des antioxydants.....	23

Chapitre III : Matériel et méthodes

III.1. Matériel végétal.....	24
III.2. Position systématique du lichen <i>Parmelia caperata</i>	25
III.3. Description de l'espèce.....	25
III.4. Préparation du matériel végétal.....	25
III.4.1. Nettoyage, séchage et broyage.....	25
III.4.2. Préparation des extraits lichéniques.....	26
III.5. Détermination du rendement d'extraction.....	26
III.6. Etude phytochimique.....	27
III.6.1. Détermination de la teneur des phénols totaux.....	27
III.6.2. Détermination de la teneur des flavonoïdes.....	28
III.7. Evaluation de l'activité antioxydante.....	29
III.7.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	29
III.7.2. Pouvoir réducteur (test de la réduction du fer (FRAP)).....	30

III.7.3. Capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate » ou « CAT ».....	31
III.8. Analyse statistique.....	32

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Rendement d'extraction.....	33
IV.2. Etude phytochimique.....	34
IV.2.1. Détermination de la teneur des phénols totaux.....	34
IV.2.2. Détermination de la teneur des flavonoïdes.....	35
IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	37
IV.3.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	37
IV.3.2. Pouvoir réducteur.....	40
IV.3.3 Capacité antioxydante totale (CAT).....	42
IV.3.4. Corrélacion entre le contenu phénolique total et les capacités antioxydantes.....	43
Conclusion	45
Références bibliographiques	47

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1 : Représentation des différents types de thalles lichéniques.....	5
Tableau 2 : Classe des métabolites secondaire lichéniques.....	17
Tableau 3 : Différents types des espèces réactives.....	19
Tableau 4 : Rendements d'extractions des fractions obtenus.....	33

Liste des figures

Figure 1 : Principales structures histologiques rencontrées chez les lichens.....	7
Figure 2 : Cycle théorique de reproduction des lichens : phase végétative et sexuée.....	9
Figure 3 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens.....	10
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.....	15
Figure 5 : Source des radicaux libres.....	20
Figure 6 : Acide ascorbique.....	22
Figure 7 : Structure des tocophérols.....	22
Figure 8 : Site de récolte.....	24
Figure 9 : Teneur en phénols totaux	34
Figure 10 : Teneur en flavonoïdes	36
Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH' en fonction des concentrations.....	37
Figure 12 : Valeurs d'IC50 des extraits testés et du dtandard (acide ascorbique).....	38
Figure 13 : Pouvoir réducteur des fractions étudiées.....	40
Figure 14 : Valeur des Cr 0.5	41
Figure 15 : Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des extraits testés et l'antioxydant de référence.....	43

Liste des abréviations :

% : Pourcentage

°C : Degré celsius

µg : Microgramme

µl : Microlitre

¹O₂ : Oxygène singulet

Abs : Absorbance

Ac : Acide

AcOET : Acétate d'éthyle

ADN : Acide désoxyribonucléique

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

CAT : Capacité antioxydante totale

CO₂ : Dioxyde de carbone

DPPH : 2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent d'acide gallique

EB : Extrait brut

EQ : Equivalent de la quercetine

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

FeCl₃ : Chlorure de Fer

FRAP : Ferric ion Reducing Antioxidant Power

g : gramme

GPX : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

h : heure

H₂O : Eau

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique
H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique
HOCl : Acide hypochlorique
IC₅₀ : Concentration inhibitrice
K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium
Liq : liquide
mg : milligramme
ml : millilitre
mM : millimolaire
M : Molaire
N₂ : Diazote
Na₂PO₄ : Phosphate de sodium
Na₂CO₃ : Carbonate de sodium
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NH₄⁺ : Ion ammonium
nm : nanomètre
NO : Monoxyde d'azote
NS : N'est pas significative
O₂[•] : Anion superoxyde
OH[•] : Radical hydroxyle
ONOO⁻ : Peroxynitrite
PH : Potentiel hydrogène
RL : Radical libre
RNS : Espèces dérivés de l'azote
RO[•] : Radical alkoxyde
ROO[•] : Radical peroxyde
ROOH : Peroxyde organique
ROS : Espèces dérivés de l'oxygène
SOD : Superoxyde dismutase

TCA : Acide trichloroacétique

UV : Ultraviolet

Introduction

Les lichens ne constituent pas un embranchement naturel de végétaux, mais sont des organismes primitifs résultant de la symbiose entre un partenaire fongique hétérotrophe et un organisme photosynthétique, soit une algue verte ou une cyanobactérie (Boullard, 1997).

Cette relation unique confère aux lichens une incroyable résistance vis-à-vis des conditions environnementales et explique leur présence dans tous les milieux et toutes les régions de la terre, et conduit également à la synthèse de métabolites secondaires spécifiques et nombreux (Pierre et Chin, 2016).

Les lichens produisent de nombreux métabolites secondaires caractéristiques qui sont uniques dans la nature appelés aussi « acides lichéniques », la plupart de ces substances sont de nature phénolique tels que les antraquinones, les depsides, les depsidones, et l'acide usnique, et qui présentent parfois jusqu'à 40% aux moins du poids sec du lichen (Diniz *et al.*, 2003).

Plus de 1050 substances lichéniques ont été décrites, le potentiel d'une grande partie d'entre elles reste peu, voire pas étudié, dont la principale difficulté est l'isolement et la purification de ces composés en quantité suffisante, avec pureté convenable, pour en préciser les structures et en évaluer leur effet biologique (Stocker, 2008).

Bien que moins utilisés que les autres plantes en médecine traditionnelle ils sont devenus actuellement des sources potentielles de molécules biologiquement actives vu leurs propriétés antioxydantes, cytotoxiques, antivirales, et antibactériennes (Kosanovic *et al.*, 2011 ; Rancovic *et al.*, 2011 ; Verma *et al.*, 2012).

De nombreuses espèces font actuellement l'objet d'études phytochimiques approfondies afin de mettre à jour et d'identifier des composés nouveaux présentant des propriétés biologiques dont l'activité antioxydante constitue actuellement un axe de recherche grandissant (Yamamoto *et al.*, 2015).

De nombreux travaux sont orientés vers la recherche d'antioxydants naturels, au sein du lichen, les métabolites secondaires dont les depsides, les depsidones et même l'acide usnique jouent un rôle important contre le stress oxydatif (Lohézic-Ledevéhat *et al.*, 2007). Ces substances peuvent être employées en tant que conservateurs ou photoprotecteurs dans les cosmétiques (Thadhani *et al.*, 2011).

Le pouvoir antioxydant d'une molécule englobe différents modes 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.

Dans ce contexte notre étude a consisté à valoriser un lichen foliacé de la région de Jijel *Parmelia caperata*, ce travail a été mené selon les objectifs suivants :

- Effectuer une séparation préliminaire sur un extrait brut du lichen *Parmelia caperata* en utilisant des solvants à polarité croissante
- Analyse quantitative du contenu phénolique des fractions obtenues.
- Evaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus via trois tests : test DPPH, test FRAP (pouvoir réducteur) et en fin la capacité antioxydante totale « CAT ».

I.1. Généralité

Les lichens sont des organismes appartenant au groupe des cryptogames au même titre que les champignons, les mousses et les fougères. Une polémique sur leur apparition est née de la découverte de fossiles datant de 600 millions d'années, identifiés au départ comme étant des méduses ou des vers, mais qui pourraient se révéler être des lichens (Boustie et Grube, 2005).

Les lichens font partie des premiers colonisateurs, à cette époque les terres étaient vierges de toute végétation, à part peut-être quelques algues. Les conditions climatiques très difficiles, une température de 30°C en moyenne mais surtout aucune protection contre les rayons solaires, la couche d'ozone n'existait pas encore, encourageant l'association d'une algue et d'un champignon ; ainsi sont nés les lichens (Humbert, 2012).

I.2. Définition

Les lichens sont des associations symbiotiques entre un partenaire fongique, le mycobionte et un ou plusieurs partenaires photosynthétiques, le photobionte, qui peut être une algue verte ou une cyanobactérie. Le champignon représente environ 90 % de la biomasse lichénique, et environ 10 % des lichens contiennent des cyanobactéries, tandis que, l'algue représente seulement 2% de la masse sèche du lichen. Cette relation symbiotique confère aux lichens une structure et une reproduction spécifiques par rapport à chaque constituant seul (Coste, 2008).

I.2.1. Les partenaires de la symbiose lichénique

- **Le mycosymbiote : le champignon**

Le champignon est un organisme thallophyte, Eucaryote, dépourvu de chlorophylle, dépourvu de vaisseaux conducteurs et se reproduisant à l'aide de spores, ce mycosymbiote protège les cellules algales contre la dessiccation et l'excès de lumière. Les hyphes en relation directe avec l'atmosphère et le substrat captent l'eau et les sels minéraux. Le champignon des lichens est en général un ascomycète, rarement un basidiomycète exceptionnellement un autre champignon (Collombert, 1989).

- **Le phycosymbiote : l'algue**

L'algue est un organisme eucaryote se présentant sous forme de petites cellules sphériques isolées ou en colonies. Elle est pourvue de chloroplastes contenant la chlorophylle pouvant utiliser l'énergie solaire pour élaborer certains de constituants organiques à partir de CO₂ atmosphérique, de l'eau et des sels minéraux fournis par le champignon. L'association modifiant profondément la structure algale (Coste, 2011).

I.3. Morphologies et anatomie des lichens

I.3.1. Différents types 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 (Tableau 1) (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.
- **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.
- **Les thalles fruticuleux** : sont les plus tridimensionnels, formant généralement des branches cylindriques qui peuvent pousser vers le haut.
- **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).
- **Les thalles squamuleux** : ont des lobes qui ressemblent à des écailles et qui sont généralement petits et trop grands.

- **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.
- **Les thalles lépreux** : ressemblent à de la poudre se détachant facilement du substrat.

Tableau 1 : Représentation des différents types de thalles lichéniques (Roger *et al.*, 2007 ; Jean, 2010) :

Thalles gélatineux	Thalles foliacés		Thalles fruticuleux
 <p><i>Collema undulatum</i> Laurer et Flot.</p>	<p>Fixation par rhizines</p>  <p><i>Xanthoria elegans</i> (Link) Th. Fr</p>	<p>Fixation par crampons</p>  <p><i>Umbilicaria cylindrica</i> (L.) Del.</p>	 <p><i>Ramalina cupidata</i> (Ach.) Nyl.</p>
Thalles crustacés	Thalles squamuleux	Thalles lépreux	Thalles composites
 <p><i>Pertusaria albescens</i> (Huds.)Choisy &Werner</p>	 <p><i>Normandina pulchella</i> (Borrer) Nyl.</p>	 <p><i>Leprania neglecta</i> (Nyl.) Lettau</p>	 <p><i>Cladonia floekeana</i> (F.) Florke</p>

I.3.2. Différents types de 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 (Figure1).

La distinction est fondée sur la répartition des cellules algales à l'intérieur du thalle (Collombert, 1989., Nash III, 2008) :

- **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 ya à la fois algues et champignon.
- **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 :
 - un cortex supérieur formé de filaments mycéliens soudés, à parois plus ou moins épaissies ;
 - une couche gonidiale 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.

Certains lichens hétéromère présentent une symétrie centrale. De telles structures, qualifiées de radiées, possèdent la même trame histologique mais ne contiennent pas de cortex inférieur.

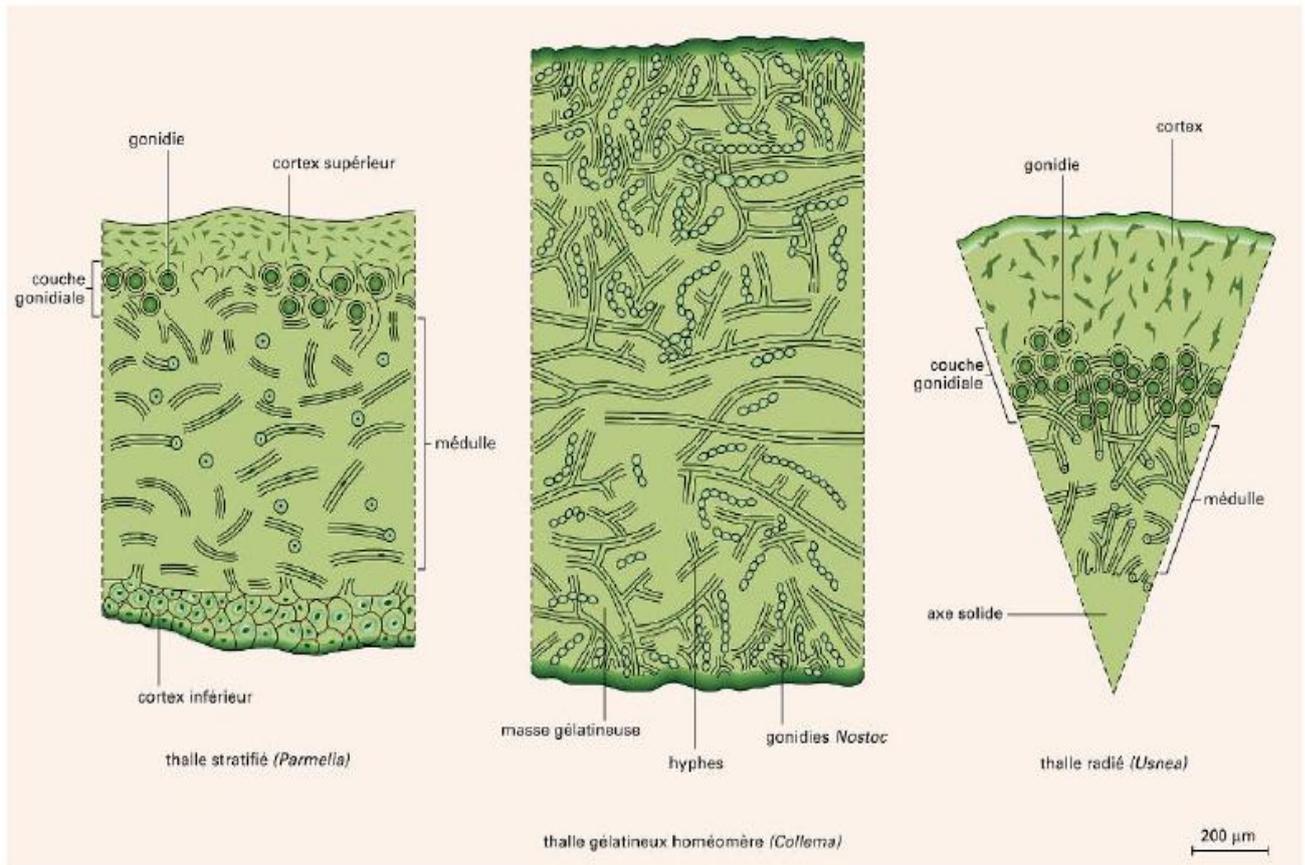


Figure 1 : principales structures histologiques rencontrées chez les lichens. De gauche à droite : thalle hétéromère, thalle homéomère et thalle radié (Alluard, 2016).

I.4. Reproduction des lichens

Les lichens se reproduisent habituellement de deux manières bien déterminées: soit par la multiplication végétative (asexuée), soit par la reproduction sexuée.

I.4.1. Multiplication végétative

Ce mode de reproduction ne se fait pas par dissémination de spores, mais du complexe lichénique entier dans lequel se retrouvent à la fois le photosymbiote et le mycosymbiote (Jean, C.L, 2010). Les lichens sont capables de subsister longtemps à l'état sec, ils deviennent alors cassants et les fragments dispersés par le vent ou les animaux engendreront de nouveaux individus. Des structures plus organisées peuvent également se former mais contenant toujours le mycosymbiote et le photosymbiote (Asta, 1975).

- Les **soralies** sont des déchirures de la surface supérieure du thalle d'où vont sortir des sorédies, amas poussiéreux formés d'un enchevêtrement d'hyphes et d'algues. Ce sont des éléments légers, facilement transportés par le vent, la pluie, les insectes et ils permettent une dissémination de l'espèce.
- Les **isidies** se trouvent en surface du thalle qui émet ces petits bourgeons (sphériques, cylindriques, ramifiés...) contenant les algues et les hyphes. Recouvertes par le cortex (couche supérieure du thalle), elles sont en général de la même couleur que le thalle. Ces isidies, plus lourdes que les sorédies, ne peuvent être transportées aussi loin, elles assurent plutôt une colonisation du substrat.

I.4.2. Reproduction sexuée

Etant donné que l'algue se divise uniquement par mitoses, le champignon est le seul à assurer la reproduction sexuée, et forme donc l'organe reproducteur, l'ascome chez les Ascomycètes et le basidiome chez les Basidiomycètes (Büdel & Scheidegger, 1996).

- Les basidiomes sont de petits champignons à lames, semblables à ceux qui ne sont pas lichénisés.
- Les ascomes se présentent sous forme d'apothécies, structure en forme de bouton trouvée à la surface du thalle, ou de périthèces en forme de poires plus ou moins enfoncées dans le thalle.

Ces organes vont libérer des spores qui après germination émettent des hyphes. Les hyphes vont capturer des gonidies et constituer un nouveau lichen (Coste, 2008).

De manière générale chez les lichens, la reproduction sexuée est nettement prédominante par rapport à la reproduction végétative (Murtagh *et al.*, 2000).

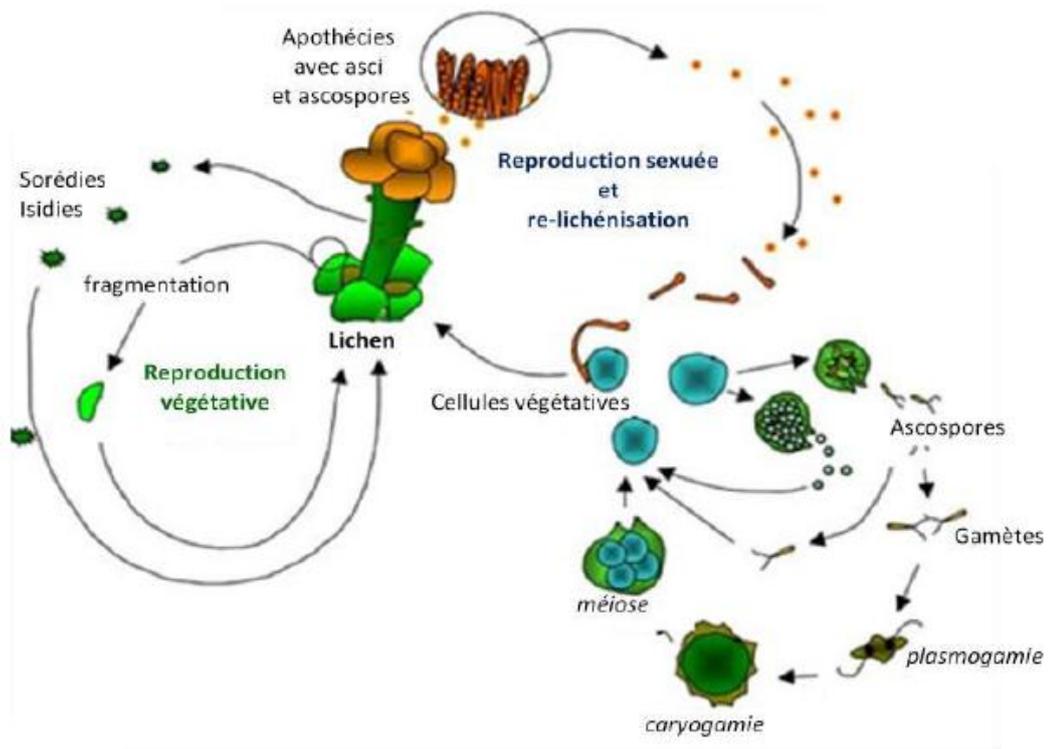


Figure 2 : Cycle théorique de reproduction des lichens : phase végétative et sexuée (Alluard, 2016).

I.5. Nutrition des lichens

Manquant d'organes pour l'absorption active de l'eau, structures pour réguler les échanges de gaz et barrière de perméabilité pour l'eau, les lichens sont susceptibles d'absorber l'eau, les substances nutritives et les gaz directement de l'atmosphère (Malaspina *et al.*, 2018).

- **Echange nutritionnels entre les partenaires des lichens**

Le lichen dépend d'un échange mutuel d'éléments entre les partenaires fongique et photosynthétique. Les deux partenaires trouvent un bénéfice réciproque avec un rôle bien défini pour chacun (Roland *et al.*, 2008).

Le champignon agit premièrement comme une source de support et de protection pour les cellules d'algue qui sont enchevêtrées dans les filaments du mycobionte. Il est aussi responsable d'acheminer de l'eau, des minéraux et de la vitamine C aux autres partenaires (Bellenfant *et al.*, 2010).

L'algue produit la matière organique par photosynthèse à partir du CO₂ et de l'eau en utilisant la lumière du soleil comme source d'énergie (Honegger, 2007). Le flux de vitamine B et de glucides en tant que polyols dans le cas des lichens d'algue verte et de glucose dans le cas des cyanolichens, du photobionte au mycobionte est bien établi. Le mycobionte gagne aussi une source d'azote dans le cas des cyanolichens (Nash III, 2008).

Les glucides produits par le photobionte sont nécessaires au champignon pour produire des métabolites lichéniques (Bellenfant *et al.*, 2010).

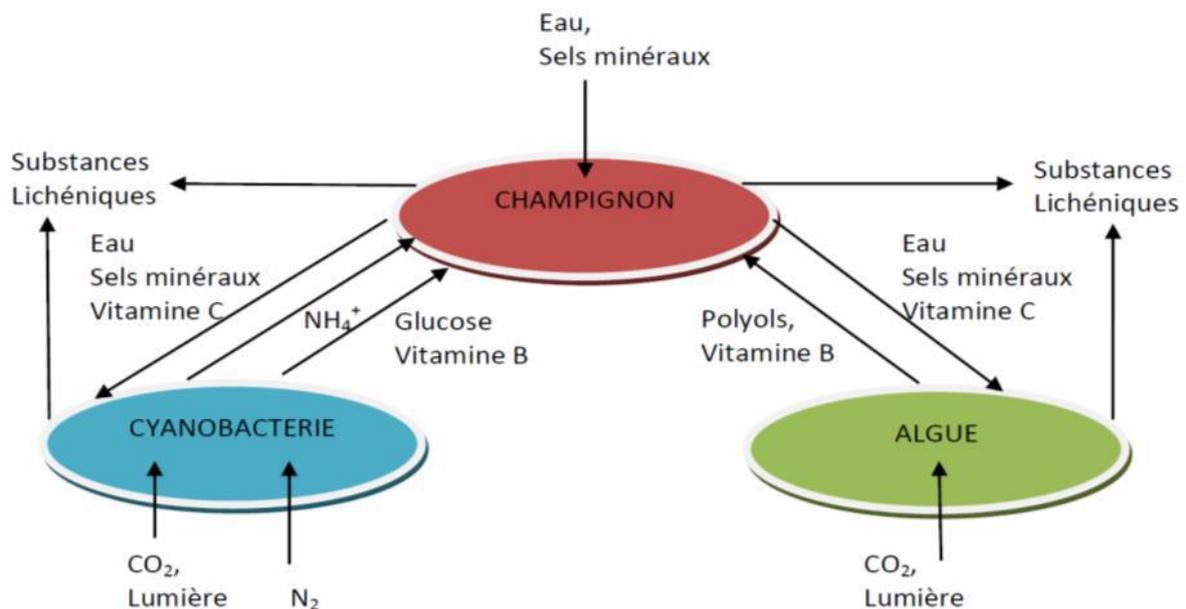


Figure 3: Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (Van Haluwyn *et al.*, 2009).

I.6. Ecologie et répartition des lichens

Les lichens sont répartis à travers presque toutes les régions du monde : ils sont largement répartis dans différents habitats et zones climatiques, ils colonisent la roche la plus dure, le sol le plus désert et peuvent supporter de très grosses variations de température (Aubert *et al.*, 2007).

Les lichens se trouvent également dans des peuplements où les conditions sont défavorables pour de nombreux autres organismes, et représentent environ 8 % de la couverture terrestre (Zarabska *et al.*, 2015).

Principaux groupements lichéniques

Les lichens sont présents dans le monde entier et en fonction de certains critères tels que la nature du substrat ils sont classés selon (Ozenda et Clauzade, 1970 ; Olivier, 2006 ; Roux *et al.*, 1999) en :

- **Lichens terricoles et humicoles** : Sont des lichens qui croissent sur la terre ou l'humus, le thalle est toujours entièrement situé à la surface du substrat, mais il émet toutefois des hyphes fixatrices à l'intérieur de celui-ci.
- **Lichens lignicoles** : Les lichens lignicoles sont des lichens qui poussent et se développent sur bois mort ; et en milieu plus humide et ombragé.
- **Lichens muscicoles** : Sont des lichens qui poussent sur les mousses.
- **Lichens foliicoles** : Les lichens foliicoles sont des lichens qui se développent sur les feuilles des arbres.
- **Lichens corticoles** : Ce sont des lichens qui se trouvent sur les écorces des troncs et de branches des arbres des villes et des forêts.
- **Lichens saxicoles** : les groupements saxicoles se rencontrent sur les substrats siliceux, les rochers, les murs et sur les toits. Fortement adhérents au substrat, auquel ils sont parfois incorporés en totalité ou en parties.
- **Lichens lichénicoles** : Sont des lichens qui se développent sur d'autres lichens.

Certains lichens sont spécifiques des roches calcaires (calcicoles) ou des roches siliceuses (calcifuges) (Van Haluwyn *et al.*, 2009).

I.7. Rôle et usages des lichens

Les lichens ont été utilisés depuis l'Antiquité comme plantes médicinales et pour de multiples autres usages alimentaires ou artisanaux. Ces usages lichéniques, encore en vigueur actuellement, représentent une importance économique non négligeable (Tiévant, 2001).

- **Usages alimentaires**

Dans l'écosystème, les lichens s'insèrent dans les chaînes alimentaires sont une source importante de nourriture pour de nombreuses espèces. Ils ont été employés comme nourriture

pour l'homme ou le bétail, mais seulement dans les régions très pauvres ou bien en période de disette ou guerre (Ozenda, 2000).

Dans l'alimentation humaine, les lichens ont joué un rôle moins important. Ces espèces ne constituent qu'un aliment de secours et leur consommation normale est limitée par leur caractère assez indigeste (Barth, 1985).

- **Usages médicaux**

Les lichens sont utilisés en médecine traditionnelle dans toutes les sociétés humaines pour leur potentiel antibiotique. Ils sont également utilisés en homéopathie pour la fabrication de sirops et de pastilles (Koyama et *al.*, 1989).

- **La bio-indication :**

Les lichens sont d'excellents bio-indicateurs. La présence ou l'absence de certaines espèces reflètent le taux de pollution et de qualité de l'air. Dans un milieu naturel, l'abondance et la diversité des lichens sont les signes d'une bonne santé écologique. Très peu de lichens supportent une pollution importante (Humbert, 2012).

- **Usages industriels**

Les huiles essentielles de certaines espèces de lichens sont utilisées pour la fabrication de parfums et pour la fabrication artisanale de teintures. D'autres utilisations sont courantes dans certains pays tels que les décorations (Cardon et Du chatenay, 1990).

II.1. Métabolites lichéniques

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leurs capacités à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils s'accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Macheix *et al.*, 2005).

Chez les lichens, l'algue induit la synthèse de métabolites secondaire par le champignon (les substances lichéniques), qui ont un rôle protecteur contre les fortes éclaircissements et contre les herbivores (Shrestha et Clair, 2013).

Les lichens produisent une large variété de composés organiques divisés en deux groupes principaux : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

II.1.1. 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. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque.

Les métabolites primaires sont des molécules organiques impliquées dans le métabolisme et la structure du lichen. Ils sont classés en quatre grandes catégories : les lipides, les acides aminés, les glucides et les acides nucléiques (Mitrovic *et al.*, 2011).

II.1.2. Les métabolites secondaires

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de divers composants. Parmi eux, des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques, microorganismes pathogènes...etc. Ces molécules sont appelés métabolites secondaires ou principes actifs (Kansol, 2009).

Le terme métabolite secondaire est utilisé pour décrire une large gamme de composés chimiques dans les plantes qui ne sont pas impliqués dans les processus biochimique de la croissance et de la reproduction des plantes (Amlan et Jyotisna, 2010).

Les lichens produisent un grand nombre de différents métabolites secondaires et la plupart d'entre eux se produisent exclusivement dans ces organismes symbiotiques (Coste, 2008). Jusqu'à maintenant plus de 800 métabolites secondaires, dont la structure a été élucidée, sont connus chez les lichens. Le statut symbiotique des lichens fait en sorte que des composés uniques y sont métabolisés. Ces composés sont souvent apparentés aux produits biosynthétisés par les mycètes non symbiotiques (Huneck et Yoshimura., 1996).

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 (Muller, 2001).

II.1.3. Les principales catégories des métabolites secondaires

II.1.3.1. Les polyphénols

Les polyphénols (8000 composés connus) représentent un groupe de métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal (Collin et Crouzet, 2011). Les composés phénoliques forment une famille de molécules organiques caractérisées par la présence de plusieurs groupes phénols (Jean et Alain, 2017).

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (Bruneton, 2009).

- **Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Pandey et Rizvi, 2009).

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chromoplastes (Guignard, 1996).

Les Principales classes des flavonoïdes sont : Flavones, flavonols, flavonones, flavanols et dihydroflavanols (Macheix *et al* ,2005).

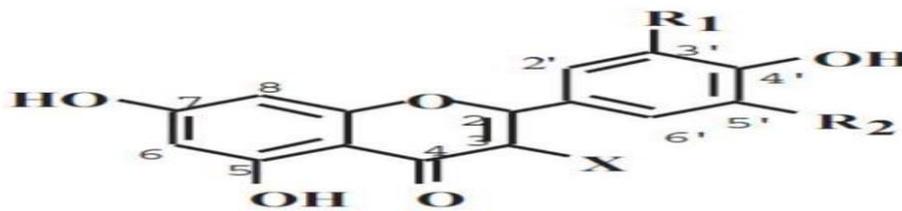


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (Lugasi *et al.*, 2003).

- **Les Tanins**

Les tanins sont des polyphénols à haute poids moléculaire (de 500 à 20 000 daltons), ils ont la capacité de combiner aux protéines ce qui explique leur pouvoir tannant. Ce sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux.

On distingue, d'après leur structure et leurs propriétés, deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Sauvionet *et al.*, 2013).

- **Les lignines**

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal et seraient formés par polymérisation oxydative de monolignols (monomères) qui sont les alcools p-coumarique, coniferique et sinapique (Sakagami *et al.*, 2005).

La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité

des tiges lignifiée. La lignine est un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations (Hopkins, 2003).

II.1.3.2. 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 (Pierre et Chin, 2016).

On distingue trois types d'alcaloïdes : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes.

II.1.3.3. 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).

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.1.4. Biosynthèse des composés phénoliques lichénique

Les lichens ont apparemment développé plusieurs voies de biosynthèse produire une incroyable diversité de composés phénoliques. Les métabolites de lichen sont souvent structurellement uniques, avec seulement un petit nombre d'entre eux étant trouvé dans d'autres champignons et des plantes supérieures (par exemple, anthraquinone pigments etc.) (Stocker, 2008).

Les substances de lichen sont classées par (Culberson et Elix, 1989) en fonction de leur origine biosynthétique et les caractéristiques structurelles chimiques. 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 shikimiques (tableau2)

Tableau 2. Classe des métabolites secondaire lichéniques (Stocker, 2008).

Voie de biosynthèse	Type de composé
Voie des acétates polymalonates	Acides aliphatiques secondaires, esters et dérivés apparentés, Composés aromatiques dérivés de polycétides, Composés phénoliques mononucléaires, Dérivés di- et tri-aryliques d'unités phénoliques simples, Depsides, tridepsides et esters benzyliques, Depsidones et diphényléthers , Depsones , Dibenzofuranes, acides usniques et dérivés, Anthraquinones et xanthonnes biogénétiques, Chromones ,Naphthaquinones et Xanthone.
Voie des mévalonates	Disester et triterpènes Stéroïdes
Voie de l'acide shikimique	Terphénylquinones, Dérivés de l'acide pulvinique

II.1.5. Activités biologiques des lichens

Les lichens produisent une variété de métabolites secondaires selon un procédé très énergivore où les partenaires fongique et photosynthétique travaillent en étroite collaboration (symbiose) pour fournir les éléments essentiels à la biosynthèse. Il est évident que les métabolites secondaires produits par les lichens doivent avoir un ou plusieurs rôles biologiques dans l'organisme vu la complexité et la dépense énergétique élevée du processus biosynthétique (Huneck et Yoshimura, 1996).

Les métabolites de lichens exercent une grande variété d'actions biologiques, y compris des activités antibiotiques, antimycobactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, antiproliférative et effets cytotoxiques. Un certain nombre d'espèces de lichens sont énumérées comme ayant l'usage comme dans le folk médicament pour le traitement des maladies de l'estomac, le diabète, la coqueluche, la tuberculose pulmonaire, le traitement du cancer et les maladies de la peau (Srivastava *et al.*, 2013).

II.2. Activité antioxydantes des métabolites secondaires lichéniques

Les antioxydants sont des substances essentiels qui possèdent la capacité de protéger le corps des dommages causés par les radicaux libres induisent une oxydation. Pour cette raison, une grande attention a été accordée aux antioxydants naturels pour leur capacité à protéger les organismes des dommages induits par le stress oxydatif, pour trouver de nouvelles sources naturelles d'antioxydants, comme les lichens (Kosanić ,2010).

Les lichens semblent être de bonnes sources naturelles et sûres d'antioxydants en raison de leur production de métabolites secondaires uniques qui diffèrent de ceux observés chez les non-lichénées et pourraient être utiles pour augmenter la valeur nutritionnelle de différents aliments (Kosanić ,2010). Les composés phénoliques de lichens jouent une fonction cruciale dans le règlement de la croissance et le développement du lichen en conditions climatiques stressantes et défavorables, il pourrait conclure que la nature antioxydante des lichens pourrait dépendre de leurs composés phénoliques (Rancovic, 2015).

Certains composés tels que l'acide usnique, l'acide salazanique sont capable de protéger les lichens en pigment, les espèces réactives de l'oxygène générées par des radiations UV intenses. Ainsi, ces composés peuvent trouver une valorisation en particulier en cosmétique dans les soins anti-âge ou des filtres solaires (Rancovic, 2015).

II.2.1. Stress oxydant

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes, qui pourrait mener aux dommages oxydants. C'est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des espèces radicalaire toxiques (Smirnoff, 2005).

II.2.2. Radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires, cet électron lui confère une certaine instabilité et haute réactivité (demi-vie courte) Les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Ortiz et al, 2013).

II.2.2.1. 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 3), 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 dérivé de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) ou d'autres atomes comme l'azote (Reactive nitrogen species : RNS) (Favier, 2003).

Tableau 3 : Différents types des espèces réactives (Gutowski et Kowalczyk, 2013).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}	Oxygène singulet	1O_2
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}	Perxyde d'hydrogène	$H_2 O_2$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}	Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$

II.2.2.2. Sources des radicaux libres

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

- **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).

- **Sources exogènes**

Dans les circonstances quotidiennes normales, des RLs sont produits en permanence en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense. Le tabagisme, poisons environnementaux, alcool et rayonnement ionisant favorisent la génération des RLs (Pickering et al, 2013).

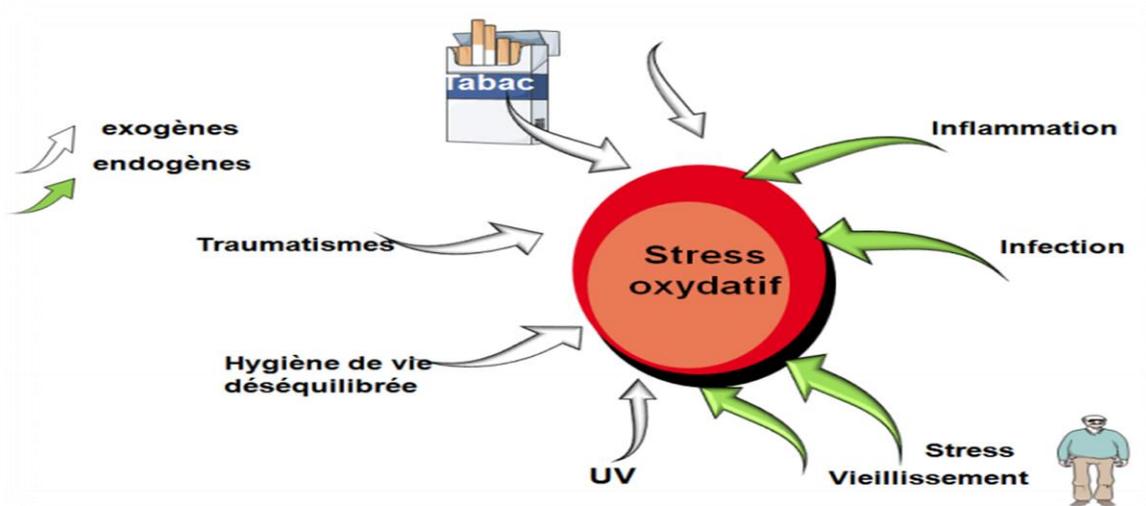


Figure 5 : Source des radicaux libres (Elkolli, 2017).

- **Rôles pathologiques des radicaux libres**

Lors d'un stress oxydant, les RLs non détoxiquées par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement et la dégradation des cellules et des tissus (Favier, 2003).

II.3. Les Antioxydants

Le terme « antioxydant » a été formulé comme « une substance qui en faibles concentrations, en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation de ces substrats ». Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Vansant, 2004).

II.3.1. Antioxydants enzymatiques

Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent :

- A éliminer les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation.
- A induire la synthèse des antioxydants.
- A augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène : les superoxydes dismutases (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPX) (Pincemail, 2002).

II.3.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs des radicaux libres. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques (Piquet *et al.*, 2007). Parmi les

antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

- **Acide ascorbique (vitamine C)**

La vitamine C ou acide ascorbique représentée par la (figure 6) est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène.

Elle est un antioxydant puissant hydrosoluble, capable de piéger / neutraliser à des concentrations très faibles les espèces réactives de l'oxygène. Elle est un réducteur susceptible de limiter la peroxydation lipidique et intervient dans la régénération des autres antioxydants tels que les α -tocophérol (Césarini, 2004).

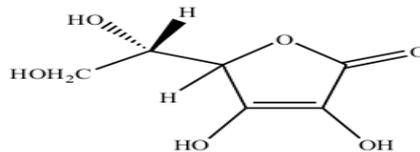


Figure 6: Acide ascorbique (Naidu, 2003).

- **Tocophérols (dont la vitamine E)**

Les tocophérols (figure 7) sont des composés liposoluble, ils regroupent quatre substance dont l'alpha-tocophérol aussi appelé Vitamine E est l'antioxydant majeur, la plus active biologiquement (Wang et Quinn, 2006).

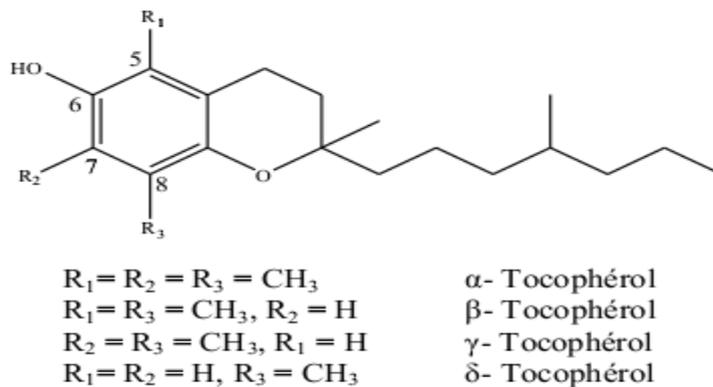


Figure 7 : Structures des tocophérols (Wang et Quinn, 2006).

- **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont des pigments fabriqués par les végétaux. Les plus importants sont le bêta-carotène, l'alpha-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et le lycopène. La plupart des caroténoïdes ont une propriété antioxydante, ce sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires particulièrement vis-à-vis de la lipoperoxydation des phospholipides membranaires grâce à leurs structures (Causse, 2005).

II.4. 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).

III.1. Matériel végétal

- **Récolte et choix des espèces**

Une sortie sur le site a été réalisée en mois de février 2018, dans la forêt de Guerrouche, située dans le Parc National de Taza (figure8), les prélèvements ont été effectués au niveau d'une station, située sur une altitude de 860m, l'identification de l'espèce a été faite en se basant sur la flore de (Tiévant, 2001). Le choix de l'espèce se justifie par son abondance dans la station sélectionnée dont nous avons récolté un échantillon aléatoire, représentatif et en quantité suffisante, pour réaliser notre étude.

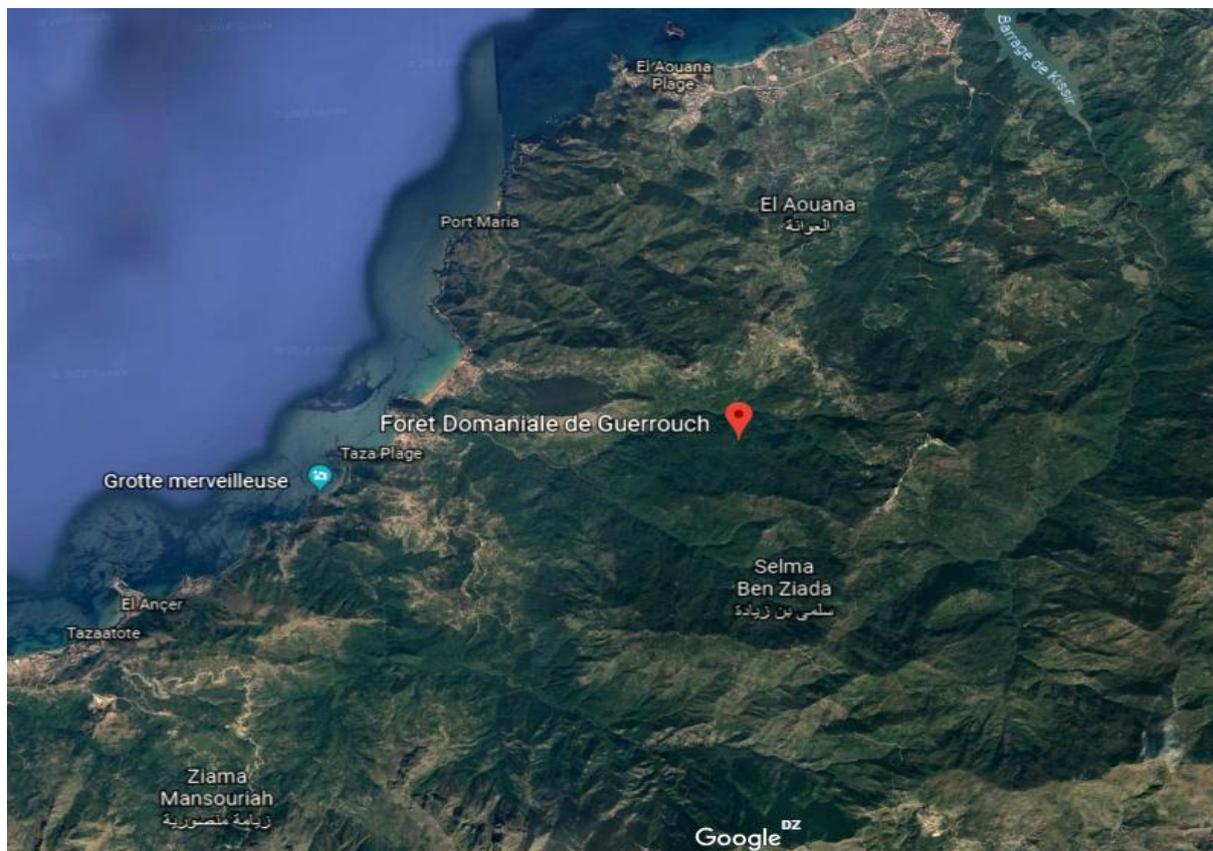


Figure 8 : Site de récolte (Forêt de Guerrouche) (Google earth).

III.2. Position systématique du lichen *Flavoparmelia caperata*.

Selon **Ozenda et Clauzad (1970)**, l'espèce étudiée est classé dans:

Classe : Ascolichens

Sous classe : Discolichens

Ordre : Cyclocarpales

Sous ordre : Licanorinées

Famille : Parmeliacées

Genre : *Parmelia*

Espèce : *Parmelia caperata*



Photo1 : *Parmelia caperata* (L.) Ach (Foret de Guerrouche).

II.3. Description de l'espèce

Parmelia caperata (L.) Ach est une espèce de lichen largement distribuée, elle se trouve, sur les écorce à PH légèrement acide (Caniglia *et al.*, 1998), 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 supérieur non ciliées 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 (Nash *et al.*, 2001).

III.4. Préparation de matériel végétal

III.4.1. Nettoyage, séchage et broyage

Après la récolte de l'espèce *Parmelia caperata*, les thalles sont nettoyés de tout les impuretés (poussière, support, mousses, sol...ect), puis séchés dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la lumière du soleil.

A l'aide d'un moulin électrique, les thalles séchés sont broyés entièrement en poudre fine pour augmenter la surface de contact de la matière végétale avec le solvant.

III.4.2.Préparation des extraits lichéniques

- **Extraction par macération**

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante (Feknous *et al.*, 2013).

Le principe consiste à faire imprégner 30g de poudre du lichen étudié dans un volume hydroalcoolique (Méthanol/Eau ; 80 : 20 ; v/v) de 150 ml sous agitation magnétique pendant 48 heures à température ambiante. L'extraction a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant jusqu'à épuisement de la matière fraîche (afin d'extraire le maximum de métabolites).

Après filtration l'extrait hydroalcoolique récupéré est concentré sous vide par un évaporateur rotatif à une température modérée (environ 45 °C) pour évaporer le solvant. Le résidu sec obtenu est ensuite traité par l'eau distillée. La solution ainsi obtenue est laissée reposer à froid pendant une nuit.

- **Fractionnement de l'extrait brut aqueux**

Après filtration de la solution précédente, on a obtenu un extrait aqueux clair. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'extrait aqueux, en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Après décantation, les trois phases organiques récupérées sont filtrées, séchées à l'aide d'un rotavapeur rotatif, puis elles ont été conservées à (-4) °C jusqu'à ce qu'elles soient utilisées dans les essais.

III.5.Détermination du rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction (Vuong *et al* 2013).

Il est calculé selon la formule suivante :

$$R \% = Pr / Pi \times 100$$

OÙ :

R : rendement d'extraction en %

Pr : poids du résidu

Pi : poids initial de la prise d'essai

Le rendement d'extraction est calculé pour les cinq extraits obtenus.

III.6. Etude phytochimique

III.6.1. Détermination de la teneur en phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de Folin–Ciocalteu décrite par Slinkard et Singleton (1977).

- **Principe de la méthode**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Slinkard et Singleton, 1977).

- **Mode opératoire**

Une quantité de 1ml de l'extrait (1 mg/ml) a été mélangée avec 46 ml d'eau distillée et 1ml du réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé, après 3 minutes, 3ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% a été ajouté. L'ensemble a été incubé à température ambiante pendant 2 heures, et la lecture a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 760nm contre un blanc constitué de tous les réactifs de l'expérience à l'exception de l'extrait lichénique.

La concentration des phénols totaux de nos extraits a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire d'acide gallique qui a été utilisé comme standard. Les résultats ont été exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait brut.

$$Y = 0.011x - 0.082$$

$$R^2 = 0.994$$

III.6.2. Détermination de la teneur 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 2 ml de l'extrait (1 mg/ml) a été mélangée avec 2ml d' AlCl_3 à 2%. L'ensemble a été incubé pendant 10 minutes et l'absorbance a été mesurée à 415 nm contre un blanc constitué de 2 ml AlCl_3 avec 1 ml d'eau distillée.

$$Y = 0.001x - 0.007$$

$$R^2 = 0.998$$

La détermination des teneurs en flavonoïdes dans nos extraits a été faite en utilisant l'équation de la régression linéaire du flavonoïde standard, la quercétine. Les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalent de quercétine par milligramme d'extrait brut.

III.7. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antiradicalaire des fractions obtenues a été évaluée par trois méthodes à savoir, le test de piégeage du radical libre DPPH[•], la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxydant Power) ou pouvoir réducteur, et enfin la capacité antioxydante totale ou « CAT ».

III.7.1. 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).

- **Principe**

Le test DPPH est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. 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 plante peut être déterminée (Dorman *et al.*, 2011).

- **Mode opératoire**

2 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,05 mg/ml) ont été ajoutés à 1 ml de chaque solution des extraits à différentes concentrations (de 0,1 à 1mg/ml). Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 1ml de méthanol avec 2 ml de la solution méthanolique de DPPH. L'ensemble a été agité à l'aide d'un vortex 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).

- **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; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards.

III.7.2. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits a été déterminé selon la méthode décrite par Diaz *et al.*, (2011).

- **Principe**

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe_3^+) en ion ferreux (Fe_2^+). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe_3^+ complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe_2^+ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (Diaz *et al.*, 2011).

- **Mode opératoire**

200 µl de l'extrait à différentes concentrations (de 0,1 à 1 mg/ml) ont été mélangés avec 400 µl d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 400 µl d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble a été incubé au bain-marie à 50°C pendant 30 minutes, après refroidissement, 400 µl d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% ont été ajoutés pour stopper la réaction et les tubes ont été centrifugés à 3000 tour/min pendant 10min. Un aliquote (400 µl) de surnageant a été combinée avec 400 µl d'eau distillée et 100 µl d'une solution aqueuse de Chlorure de Fer ($FeCl_3$) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé. Le contrôle positif a été représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

III.7.3.Capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate » ou « CAT»

- **Principe**

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/Mo (V)) à un PH acide. On mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant (Prieto *et al.*, 1999).

- **Mode opératoire**

La méthode consiste à mélanger 0.3 ml de chaque fraction à différentes concentrations (de 0.4 à 1 mg/ml) avec 3 ml d'un réactif composé d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 0,6 M), de phosphate de sodium (Na_2PO_4 , 28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). L'ensemble a été incubé au bain-marie à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre un témoin constitué de 3 ml du réactif mentionné ci-dessus, mélangé avec 0.3 ml du solvant dans lequel l'extrait est dissout. Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent d'acide ascorbique par milligramme d'extrait brut.

III.8. Analyse statistique

Tous les tests sont répétés trois fois, les résultats sont donnés sous forme de moyennes \pm écart type.

L'étude statistique est réalisée par le logiciel EXCEL 2007 en utilisant le test ANOVA à un facteur, ce dernier nous donne le degré de signification P où on dit la différence :

- N'est pas significative si $P > 0.05$ (NS)
- Significative si $0.05 > P > 0.01$ (*)
- Hautement significative si $0.01 > P > 0.001$ (**)
- Très Hautement significative si $P < 0.001$ (***)

IV.1. Rendement d'extraction

Les rendements d'extractions obtenus sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4: Rendements d'extractions des fractions obtenues.

Espèce	Extrait	Poids du résidu (g)	Rendement (%)	Aspect	Couleur
<i>parmelia caperata</i>	méthanolique	1.33	4.43	visqueux	orange foncé
	aqueux	0.08	0.26	pâteux	marron foncé
	chloroformique	0.0362	0.12	visqueux	Brune
	acétate d'éthyle	0.007	0.02	visqueux	Vert brune
	n-butanolique	0.0196	0.06	visqueux	brune

Les rendements d'extractions les plus élevés sont observés dans le cas de l'extrait brut méthanolique, et les fractions aqueuse et chloroformique avec respectivement 4.43%, 0.26%, 0.12%, suivi par le résidu n-butanolique avec 0,06% et enfin la fraction acétate avec 0,02%.

Les extraits obtenus après évaporation des solvants d'extraction sont des résidus de différentes couleurs, ce qui témoigne de contenu varié en métabolites.

Les métabolites secondaires des lichens sont des molécules aliphatiques ou aromatiques de faibles poids moléculaires, ils sont retrouvés principalement dans les fractions apolaires ou moyennement polaires (Dieu, 2015) cela est en accord avec nos résultats concernant la variabilité dans les rendements d'extraction obtenus.

Les métabolites secondaires des lichens peuvent être extraire en utilisant plusieurs solvant organiques, le dichlorométhane, le chloroforme, (Carlos *et al.*, 2009 ; Polovinka *et al.*, 2012) le tétrahydrofurane, l'acétone, l'acétate d'éthyle (Asplund et Gausla, 2008), l'éthanol ou encore le méthanol (Rankovic *et al.*, 2009) peuvent être employés.

Cependant l'extrait brut hydrométhanolique a donné un rendement de 4.43% supérieur a ce obtenus par Stojanovic *et al.*, (2010), une étude réalisée sur le lichen *Parmelia caperata* par macération avec le méthanol qui est de l'ordre de 3,6%.

L'étude de Dieu (2015) réalisée sur la même espèce par macération dans l'acétone a donné un pourcentage d'extraction de l'ordre de 8,2%.

Le rendement d'extraction total en métabolites secondaires est fortement lié à la méthode de broyage, du type d'extraction, du ratio solide/liquide et de l'intensité de l'agitation (Parrot *et al.*, 2014).

Cette variation du rendement peut être attribuée à l'origine géographique de la plante, les facteurs climatiques et la partie de la plante étudiée (Smith *et al.*, 1999).

IV.2. Etude phytochimique

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives des différents extraits de l'espèce étudiée, des dosages des phénols totaux et des flavonoïdes ont été effectués.

IV.2.1. Détermination de la teneur des phénols totaux

La teneur en phénols totaux estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu pour chaque extrait est déduite à partir d'une gamme étalon établie avec différentes concentrations d'acide gallique.

La quantité des phénols totaux correspondant aux fractions obtenues a été rapportée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait brut, elle est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage d'acide gallique (Annexe 1).

Les résultats sont représentés dans la figure ci-dessous.

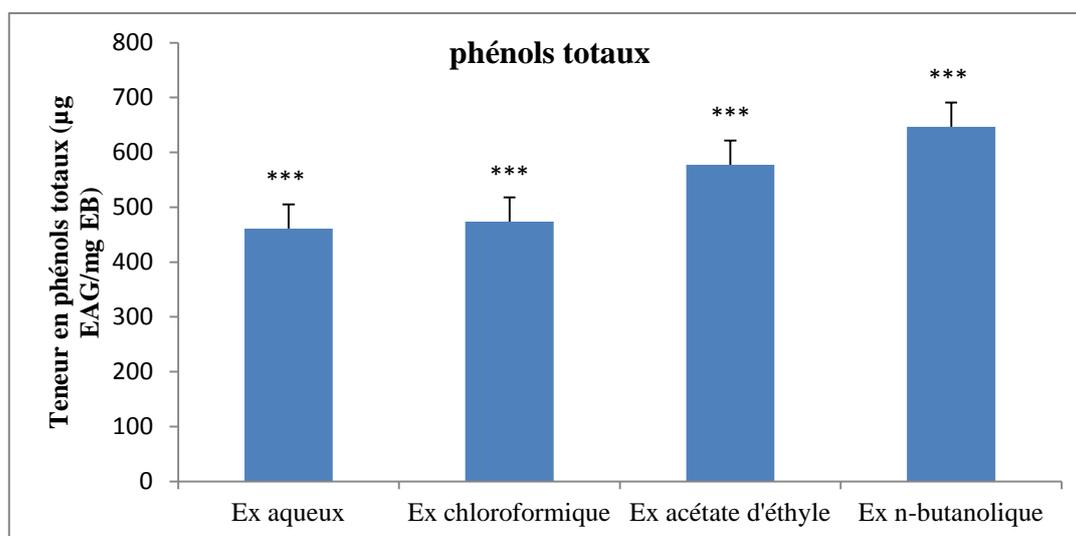


Figure 9: Teneur en phénols totaux.

D'après les résultats obtenus, la valeur la plus élevée est enregistrée pour la fraction butanolique (646.54 µg/mg), suivi par la fraction acétate d'éthyle et chloroformique avec respectivement (577.45 µg/mg), (473.81 µg/mg). Tandis que la valeur la plus faible est marquée pour l'extrait aqueux (461.09 µg/mg).

Statistiquement la différence entre les teneurs en phénols totaux en fonction des extraits est très hautement significative ($P=0.00013$) (Annexe 4).

Cette différence peut être liée à la nature du solvant ainsi qu'à la méthode d'extraction utilisée, puisque la solubilité des composés phénoliques contenus dans les fractions obtenues est affectée par la polarité des solvants utilisés (Garcia- Salas *et al.*, 2010).

Les études réalisées par Stojanovic *et al.*, (2010) et Mitrovic *et al.*, (2011) sur l'extrait brut méthanolique du lichen *parmelia caperata* révèlent la richesse de ce dernier en phénols totaux avec respectivement 36 µg EAG/mg EB, 272,49 µg/mg EB.

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

Ces résultats montrent et confirment la variabilité du contenu phénolique du lichen étudié. 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).

IV.2.2.Détermination de la teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes estimée par la méthode d' $AlCl_3$ pour chaque extrait est déduite à partir d'une gamme étalon établie avec différentes concentrations de la quercétine (Annexe 1). Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en microgramme équivalent de la par milligramme d'extrait brut. Les résultats sont représentés dans (la figure 10).

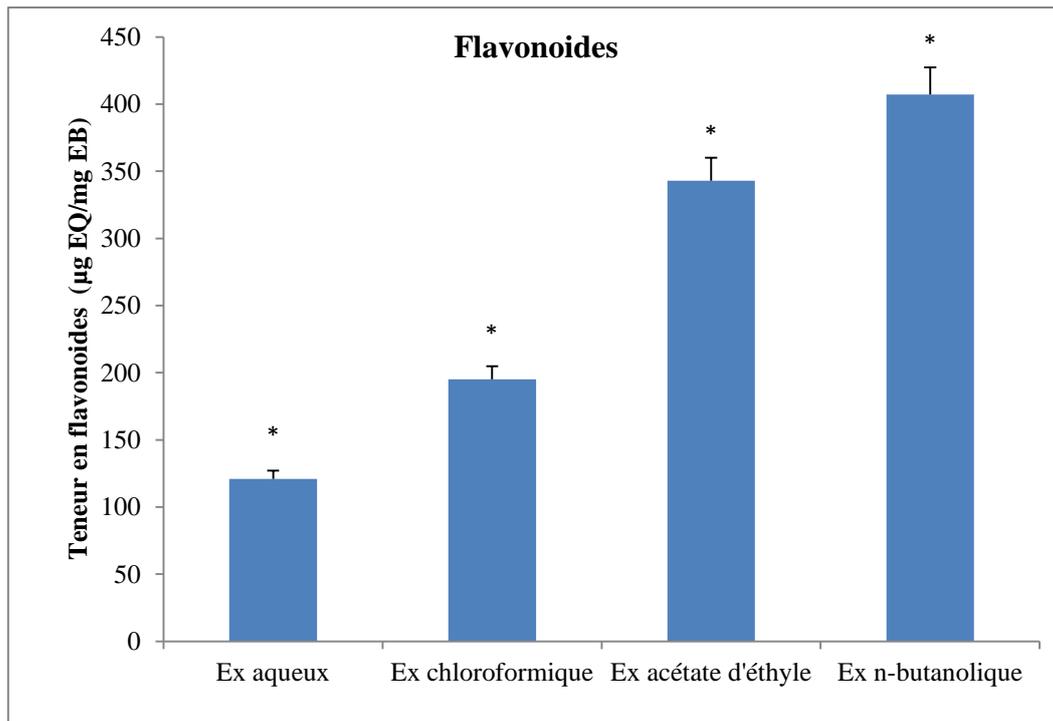


Figure 10 : Teneur en flavonoïdes.

On constate d'après les résultats obtenus, une nette différence dans la teneur en flavonoïdes entre les extraits testés. En effet la fraction n-butanolique a extrait une quantité la plus élevée (407 µg/mg) suivie par la fraction acétate d'éthyle et chloroformique avec respectivement (343 µg/mg, 195 µg/mg), tandis que la valeur la plus faible est notée pour la fraction aqueuse (121 µg/mg).

La quantité des flavonoïdes dans toutes les fractions obtenues sont supérieures à celle trouvée par Mitrovic *et al.*, (2011), une étude réalisée par macération avec le méthanol qui est de l'ordre 110,65 µg EQ/ g d'extrait.

Statistiquement la différence entre les teneurs en flavonoïdes des extraits analysés est significative ($p = 0.013$) (Annexe 4).

Ces résultats montrent et confirment la variabilité du contenu phénolique du lichen étudié. 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).

IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante

IV.3.1. Test de piégeage du radical libre DPPH'

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

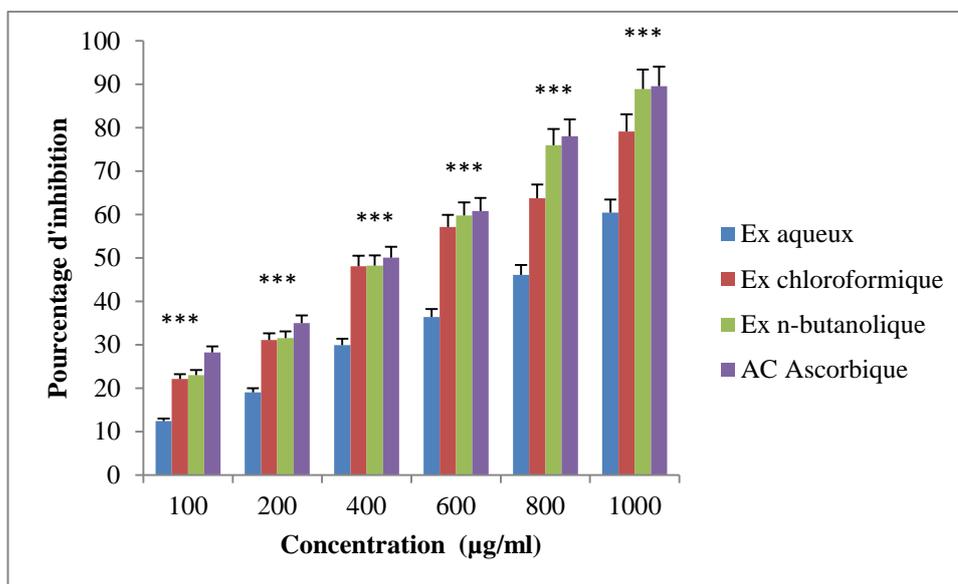


Figure 11: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH' en fonction des concentrations.

D'après les résultats obtenus ci-dessus, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente en fonction des concentrations soit pour le standard (l'acide ascorbique) ou pour les différents extraits. Le taux d'inhibition du radical libre pour les extraits était inférieur à celui du standard pour toutes les concentrations utilisées.

D'après la figure (11) le pourcentage d'inhibition du DPPH varie de (12.39% à 60.4%) pour l'extrait aqueux, de (22.09% à 79.1%) pour l'extrait chloroformique, et de (23.02% à 88.9%) pour la fraction butanolique. OÙ nous avons enregistré un pourcentage maximal de l'ordre de 88.9% chez la fraction butanolique similaire à celui exercé par le standard (acide ascorbique avec au taux maximal de l'ordre de 89.56 %.

Statistiquement on constate une différence très hautement significative ($p < 0.001$) entre les extraits testés (Annexe 4).

Pour comparer le pouvoir anti-radicalaire des fractions obtenues nous avons calculé l'IC₅₀ qui s'exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer 50% de la concentration du radical libre, elle est déterminée graphiquement par la régression linéaire établie entre les pourcentages d'inhibition et les différentes concentrations de chaque extrait (Annexe 2), elle est exprimée en $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Hobi et Eddouks, 2016). Les valeurs d'IC₅₀ sont représentées dans (la figure 12).

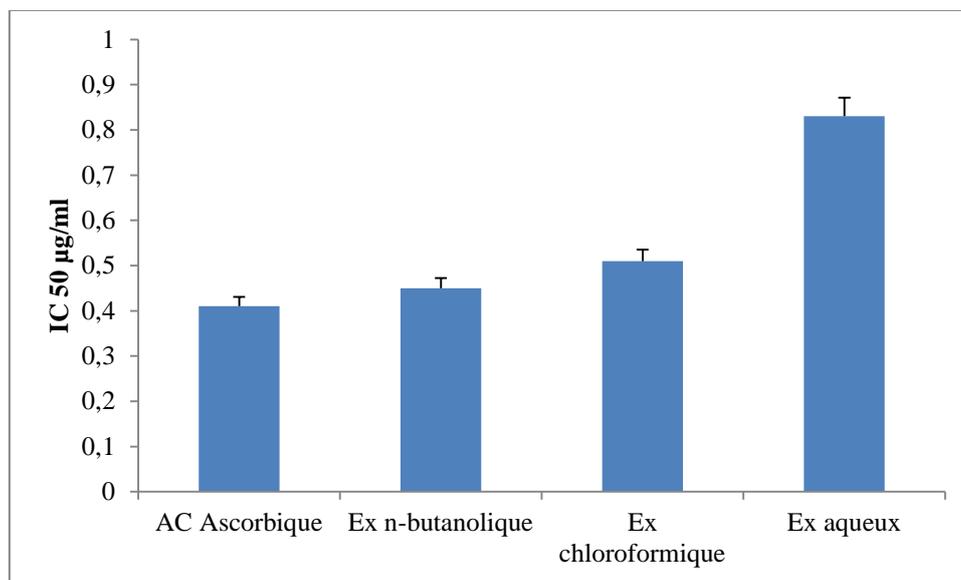


Figure 12 : Valeurs d'IC₅₀ des extraits testé et du standard (acide ascorbique).

D'après les résultats présentés dans la figure (12), l'IC₅₀ obtenue pour l'acide ascorbique ($\text{IC}_{50} = 0.41 \mu\text{g}/\text{ml}$) utilisé comme molécule de référence, est inférieure à celles des autres extraits. La fraction n-butanolique et chloroformique ont une activité scavenger du radical DPPH[•] très puissante, proche de celle enregistrée pour l'acide ascorbique. Tandis que la plus élevée des IC₅₀ calculées est notée pour la fraction aqueuse.

Le test DPPH[•] est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. 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.

Lorsqu'une solution de DPPH[•] est mélangée avec une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite (DPPH-H) avec une perte de la couleur violette.

La décoloration sera directement proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel à 517 nm. Elle permet d'évaluer le taux de réduction du DPPH[•] et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits étudiés.

Selon les résultats obtenus, on constate que l'extrait n-butanol est le plus actif, avec un taux d'inhibition maximal de l'ordre de 88.9%, la même fraction a enregistré la concentration la plus élevée en phénols et en flavonoïdes avec respectivement (646.54µg/mg et 407µm/mg), cela peut être lié à sa forte teneur en polyphénols qui peuvent servir comme donneurs d'électron dans le milieu.

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 antioxydante (Dieu, 2015).

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

Les études de Bechera *et al.*,(2009) ; Kosani'c *et al.*,(2013) et de Plaza *et al.*,(2014), vont dans le même sens, ils ont trouvé que le pouvoir antioxydant des extraits lichéniques testés est engendré par leur forte teneur en phénols ce qui signifie que les phénols sont de bon antioxydants, pour la plupart des lichens, des phénols, y compris depsides, depsidones et dibenzofuranes, sont des antioxydants importants en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres, (Kosanic *et al.*, 2012).

IV.3.2. Pouvoir réducteur (réduction de fer)

Le pouvoir réducteur des extraits du lichen *Parmelia caperata* est testé à différentes concentrations (0.1 mg/ml à 0.6mg/ml). Les valeurs des absorbances obtenus sont illustrées dans la figure (13) avec l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif.

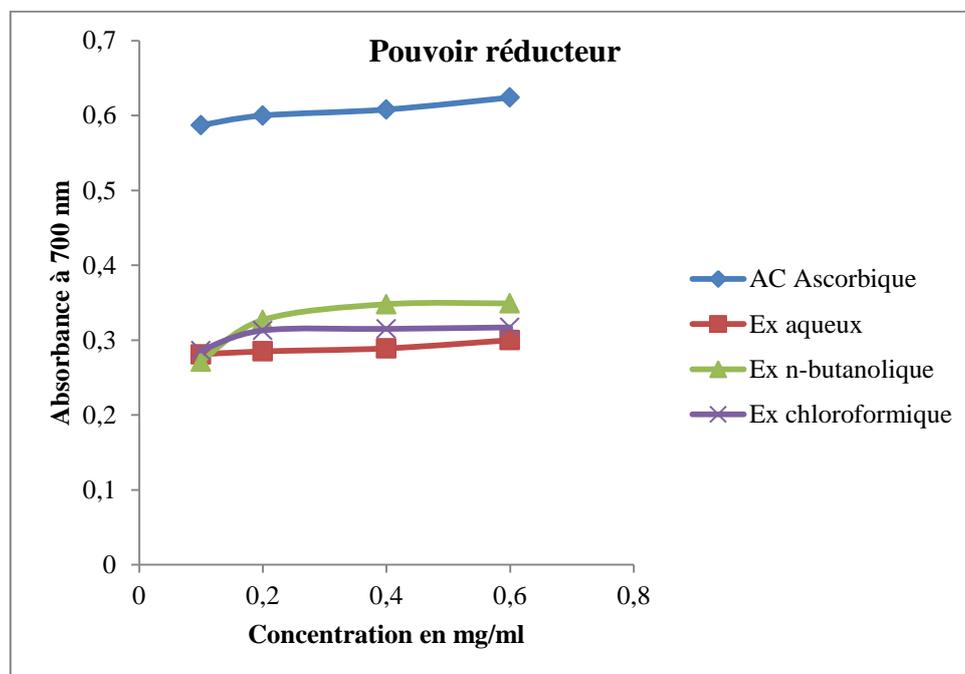


Figure 13 : pouvoir réducteur des fractions étudiées.

A partir des résultats ci-dessus, on remarque que le pouvoir réducteur des extraits est dose dépendant, c'est-à-dire que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des d'extraits.

Les résultats montrent que les deux fractions, n-butanolique et chloroformique exercent une bonne activité réductrice par rapport à celle de l'extrait aqueux, mais inférieures à celle du standard (l'acide ascorbique), donc la capacité des extraits réduire le Fe^{+3} est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Statistiquement la différence entre le pouvoir réducteur en fonction des extraits est très hautement significative ($p=0.0007$) pour toutes les concentrations (Annexe 4).

Cependant, la présence des réducteurs notamment les polyphénols dans les extraits de plante provoque la réduction de fer ferrique Fe^{+3} en fer ferreux Fe^{+2} . Par conséquent, la puissance de réduction est un des mécanismes antioxydants (Karagozler *et al.*, 2008).

• Calcul de Cr 0.5

Dans le but de comparer l'activité antioxydant de l'extrait et de l'acide ascorbique, on a introduit le paramètre de Cr 50 qui est la concentration du substrat pour laquelle le produit de la réduction donne une absorbance de 0.5 à 700 nm et qui représente la réduction de 50 % du fer. Il est déterminé graphiquement à partir de la droite de la régression linéaire établie entre les absorbances et les différentes concentrations de l'extrait testé et de l'acide ascorbique (Annexe3). Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure (14).

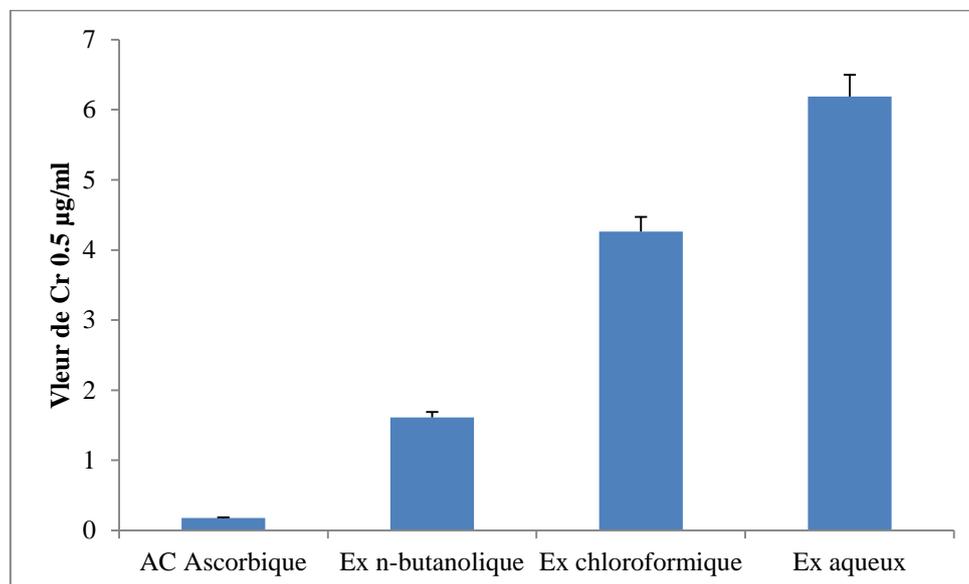


Figure 14 : valeur des Cr 0.5.

Les résultats obtenus montrent que la capacité à réduire le fer est variable, elle est plus importante pour l'acide ascorbique (0.18µg/ml), suivi par la fraction butanolique (1.61µg/ml), puis l'extrait chloroformique et aqueux avec respectivement (4.26µg/ml et 6.19 µg/ml).

A l'issu des résultats obtenus on constate la nette puissance réductrice de l'extrait n-butanolique par rapport au autres, néanmoins l'acide ascorbique présente la plus importante activité à réduire le (Fe^{+3}) en (F^{+2}).

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence de réductones dans le milieu réactionnel.

L'action antioxydante des réductones est basée sur la rupture de la chaîne des radicaux libres en faisant don d'un atome d'hydrogène. La réduction de l'ion ferreux (Fe^{3+}) en ion ferrique (Fe^{2+}) mesurée par l'intensité de la bleu-vert résultante solution qui absorbe à 700 nm. (Gordan, 1990).

Le résultat présenté indique ici que la puissance réductrice du fer ferrique marquée l'activité des l'extraits est due à la présence de polyphénols qui peut agir de la même manière que les réductones pour donner les électrons et réagir avec les radicaux libres à les convertir en produits plus stables (Sasikumar *et al.*, 2010).

Une augmentation de l'absorbance correspond a une augmentation de pouvoir réducteur de l'échantillon testé (Oyaizu, 1986), cependant l'absorbance de l'extrait est proportionnelle à sa puissance réductrice cela confirme les résultats obtenus, les extraits testés ont un important pouvoir réducteur de fer, cette activité est toujours corrélé avec la teneur élevée en phénols totaux (Plazaet *al.*, 2014).

Le genre *Parmelia*, a fait l'objet de plusieurs études Manojlovic (2012), Rancovic *et al.*, (2007) et Sharma (2011) ont montré que les extraits lichéniques de *Parmelia caperata*, *P. saxatilis* et *P. suclata*, *P. perlata* sont riches en composés phénoliques, notamment l'acide usnique, les depsides, les depsidones et les dibenzofurannes isolés de ces espèces sont responsables de nombreuse activités biologiques *in vitro* ou *in vivo* notamment l'activité antiradicalaire.

IV.3.3. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des extraits étudiés est exprimée en nombre d'équivalents d'acide ascorbique à partir d'une courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus sont exprimés en microgramme équivalent d'acide ascorbique par milligramme de l'extrait brut ($\mu\text{g EAS/mg EB}$). Les résultats sont représentés dans la figure (15).

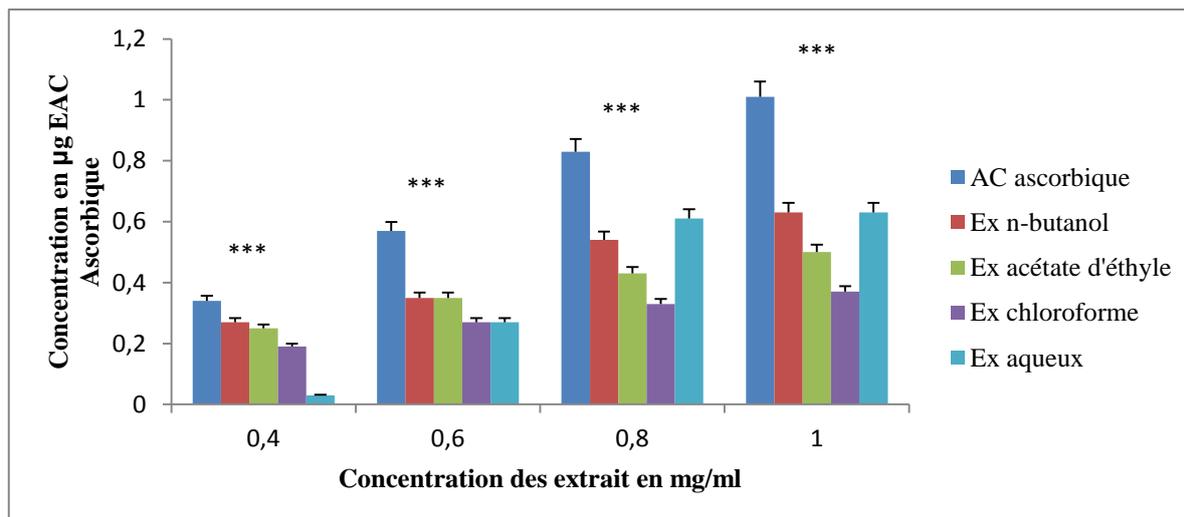


Figure 15: Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des extraits testés et l'antioxydant de référence.

D'après les résultats obtenus, on remarque que dans la concentration de 1mg/ml, la fraction d'acide ascorbique a un pouvoir antioxydant le plus élevé (1.01µg/mg), suivi par la fraction n-butanol et la fraction aqueuse qui ont le même pouvoir antioxydant (0.63µg/mg), ensuit la fraction d'acétate d'éthyle et de chloroforme (respectivement 0.50 µg/mg, 0.37 µg/mg).

Statistiquement la différence entre le pouvoir réducteur en fonction des extraits est très hautement significative ($p < 0.001$) (Annexe 4).

Les capacités antioxydantes totales des extraits étudiés sont supérieures à celle trouvée par Stojanović *et al.*, (2010) qui est de l'ordre 19.38µg/g. Ce pouvoir antioxydant observé dans les quatre extraits peut être dû essentiellement à la richesse des extraits en polyphénols, et aussi en fonction de la nature chimique des molécules bioactives.

IV.3.4. Corrélation entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante

Puisque le lichen *Parmelia caperata* contient divers constituants phénoliques et que ces types de composés possèdent des propriétés antioxydantes, les corrélations entre chaque

dosage antioxydant (DPPH, et CAT) et la teneur totale en phénols ont été étudiées par une analyse de régression (coefficient de corrélation, R) (Fernandez, 2016).

La courbe de corrélation entre la teneur en phénols totaux et les IC50 des différentes fractions montre une corrélation moyenne ($R^2=0.534$), tandis que la CAT de différentes fractions est fortement corrélée ($R^2=0,853$) avec leurs teneurs en phénols totaux, néanmoins la teneur en flavonoïdes est faiblement corrélée avec les IC50 (Annexe 03).

Ces résultats pourraient s'expliquer par plusieurs faits incluant la diversité structurale des composés phénoliques. Des études antérieures sur la relation structure-activité ont démontré que la puissance antioxydante et les mécanismes de réaction des composés dérivés du phénol dépendent à la fois de la position du groupe hydroxyle et du nombre. Lopes *et al.*, (2008) ont confirmé que la liaison hydrogène des groupes carbonyles aux radicaux hydroxyles réduisait significativement l'activité de piégeage des constituants du lichen.

Cependant, il y a beaucoup de divergences sur une telle corrélation chez les espèces de lichens. Certains auteurs n'ont trouvé aucune corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en phénols totaux des extraits de lichen (Odabasoglu *et al.*, 2005), mais d'autres ont décrit des relations fortes entre les teneurs totales en phénols et flavonoïdes et l'effet antioxydant (Rankovic *et al.*, 2011). Nos résultats sont en ligne avec cette information et suggèrent que l'activité antioxydante de certains extraits testés peut être attribuée à la présence de composés non phénoliques.

Conclusion

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique et l'évaluation du pouvoir antioxydant de différents extraits de lichen *Parmelia capera* obtenus par fractionnement de son extrait brut hydrométhanolique en effectuant une extraction de type liquide-liquide par l'utilisation de quatre solvant organiques à polarité croissante.

La teneur des phénols totaux, adaptant par la méthode de Singleton et Ross. La teneur la plus élevée des polyphénols est constatée dans la fraction n-butanol 646.54 µg EAG/mg, puis la fraction d'acétate d'éthyle 577.45 µg EAG/mg, puis par le chloroforme (473.81 µg EAG/mg). Tandis que la valeur la plus faible est marquée pour l'extrait aqueux (461.09 µg EAG/mg).

En parallèle, La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode du trichlorure d'aluminium qui donne une couleur jaune avec les flavonoïdes. Nous avons observé que la teneur la plus élevée est de l'extrait n-butanolique (407 µg E Q/ mg).

L'activité antiradicalaire des fractions obtenues a été évaluée par trois méthodes à savoir, le test de piégeage du radical libre DPPH, la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxydant Power) ou pouvoir réducteur, et enfin la capacité antioxydante totale ou « CAT ».

L'évaluation quantitative de l'effet antioxydant a montré que l'extrait butanolique de l'espèce étudiée est le plus actif (IC₅₀ = 0,45 µg/ml), cette valeur ne présente pas une différence significative avec le témoin positif (acide ascorbique : IC₅₀ = 0,41 µg/ml). Nous avons trouvé une corrélation positive élevée ($R^2 = 0,853$) entre les teneurs en phénols totaux et la capacité antioxydante,

La richesse de nos extraits en composés phénoliques peut justifier ces activités. D'une manière générale, les lichens constituent une bonne source naturelle de produits biologiquement actifs.

En perspectives, il est souhaitable de réaliser des études *in vivo* et complémentaires pour comprendre le mécanisme moléculaire et cellulaire des activités biologiques qui sont attribuées aux métabolites secondaire de cette plante.

- Faire une étude biochimique sur le lichen *Parmelia caperata*

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments antiradicalaires à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.

Références bibliographiques

A

- Alluard, P.L.** 2016. Analyses de lichens par spectrométrie de masse: déréplication et histolocalisation. *Université de Rennes 1, sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*. 357 p.
- Amlan, K., Patra, A., & Jyotisna, S.** 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71 :1198–1222.
- Asplund, J., & 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.
- Asta, J.** 1975. Ce monde méconnu des lichens. *Bull. Bio. Club, Grenoble*, 69-90.
- Aubert, S., Juge, C., Boisson, A.M., Gout, E., & Bligny, R.** 2007. *Planta*. P226, 1287-1297.

B

- Barth, A.** 1985. L'utilisation actuelle des algues et des lichens en pharmacie et en alimentation. Thèse de docteur en pharmacie, Paris XI, n°35/83, 12-49. *Ann. Pharm Fr*, 64 : 373-381.
- Beaudeau, J.L., Peynet, J., Bonnefon, R.D., Therond, P., & Delattre, A.L.** 2006. Stress oxydant, Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygene et de l'azote : implication dans la transription et la régulation des gènes.
- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., & Makhija, U.** 2005. Antioxydant and antibacterial activities of lichen us neaghattensis in vivo. *Biotech. Lett*, 27 : 991-995.
- Bellenfant, S ; Vallade, J ; Beguinot, J ; Sirugue, D ; & Lemmel.** 2010. Lichens : Une symbiose exemplaire. *Bourgogne-Nature*.16 p.
- Boullard, B.** 1997. Dictionnaire plantes et champignons, *Editeur ESTEM*, 875p.
- Boustie, J & Grube, M,** 2005. Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources* 3(2); 273–287.
- Bruneton, J.** 2009. Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4 éme édition. *Edition Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales*, Paris, p 261 , 308 , 571.

Büdel, B., & Scheidegger, C. 1996. Thallus morphology and anatomy. In Lichen biology, Nash III. T. H. *Cambridge University Press*, pp 37-64.

Buettner, G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys*, 300:535-543.

C

Caniglia, G., Tassoni, T., & 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.

Cardon, D. & Du Chatenay G. 1990. Guide des teintures naturelles: Plantes, lichens, champignons, mollusques et insectes. *Delachaud et Niestlé*, 400 p.

Carlos, I.Z., Carli, C.B.A., Maia, D.C.G., Benzatti, F.P., Lopes, F.C.M., Roese, F.M., Watanabe, M., Micheletti, A.C., Dos Santos, L.C., Vilegas, W., & Honda, N.K. 2009. Immunostimulatory effects of the phenolic compounds from lichens on nitric oxide and hydrogen peroxide production. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(4), 847-852.

Causse, C. 2005. Les secrets de santé des antioxydants : C'est naturel, c'est ma santé. *Alpen éditions s.a.m*, p 30.

Césarini, J.P. 2004. Le sélénium : actualités. *John Libbey Eurotext Edition*, p 14.

Collin, S., & Crouzet, J. 2011. Polyphénols et procédés. *Edition Lavoisier TEC & DOC*, p5, 13, 16, 235.

Collombet, C. 1989. Lichen d'Islande et lichen pulmonaire. Sciences pharmaceutiques. *dumas-00809411. Université Joseph Fourier Grenoble I*, 30,31.

Coste, C. 2008. Introduction à l'étude des lichens. 26 rue de Venise, 81100 Caster, p 1,7.

Coste, C. 2011. Ecologie et fonctionnement des communautés lichéniques saxicoles-hydrophiles. *Université de Toulouse*, p 132.

Culberson, C.F., & Elix, J.A. 1989. Lichen substances in harbore j.b. ed. *methods in plant biochemistry. plant phenolics. academic press, london.* (1): 509-535 pp.

D

- Diaz, L., De-Montijo, S., Medina, A., Meléndez, P., Laurence, V., & Marti-Mestres, G.** 2011. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* Against Acne-Inducing Bacteria, and their cytoprotective and antioxydant effects on fibroblaste. *Rev Peru Biol*, 18 : 153-158.
- Dieu, A.** 2015. Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichéniques : Etude phytochimique de trois lichens et approche synthétique de deux composés actifs. *Université de Limoges*, 340 p.
- Diniz-Filho, J.A.F., Bini, L.M., & Hawkins, B.A.** 2003. Spacial autocorrelation ans red herrings in geographical ecology. *Global Ecology and Biogeography*, 12, 53-64.
- Dorman, H.J., Bachmayer, O., Kosar, M., & Hiltunen, R.** 2004. Antioxydant properties of aqueoous exacts from selected lamiaceae spicies grown in Turkey. *J. Agr. Food Chem*, 52 : 762-770.

E

- Elkolli, M.** 2017. Structure et activité des substances naturelles : principes et applications. Master académique en écologie microbienne, *université Ferhat Abbas*, Sétif, p 44.
- Elix, J.A., & orgotter, E.S.** 2007. Biochemistry and secondary metabolites. *University of Sydney Library*.

F

- 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.
- Feknous, S., Saidi, F., & Mohamed .S. R.** 2013. Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Nature & Technologie . Sciences fondamentales et Engineering*, n° 11/ Pages 07 à 13.

Fernández, C.E., Burgos, C., Divakar, P.K., Crespo, A., & Serranillos, M. P.G. 2016. Evaluation of the Antioxidant Capacities and Cytotoxic Effects of Ten *Parmeliaceae* Lichen Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 3169751, 11 pages.

G

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15, 8813-8826.

Gordan, M.H. 1990. Food antioxidants. *Elsevier*, London, New York, pp. 1-18.

Guignard, J. L. 1996. Abrégé de biochimie végétale. *Edition Masson*, Paris, p 160.

Gutowski, M., & Kowalczyk, S. 2013. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA biochimica polonica*, 60(1); 1-16.

H

Honegger, R., & Zippler, U. 2007. Mating systems in representatives of *Parmeliaceae*, *Ramalinaceae* and *Physciaceae* (Lecanoromycetes, lichen-forming ascomycetes). *Mycological research III* , 424-432.

Hopkins, W.G. 2003. Physiologie végétale. *De Boeck superieur*, 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, *Springer-Verlag*, Berlin.

J

Jean, C.L. 2010. Biologie végétale. 3^{ème} Ed, *Dunod*, Paris, 316 p.

Jean, P.J., & Yan, C.J. 2016. L'automedication chez les animaux dans la nature. *Connaissances et savoirs*, 226 p.

Jonathan, S. 2004. Les lichens marqueurs biologiques. *Université de Metz*, p 1.

Jean, L., & Alain, C. 2017. De l'œnologie à la viticulture. *Quae*, 279 p.

K

Kansole, M.M.R. 2009. Etude ethnobotanique, phytocchimique et activités biologiques de quelques *lamiaceae* du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth*. Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

Karagozler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.C., & Uygun, D.A. 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chem*, 111 : 400-407.

Koyama, M., Takahashi, K., Chou, T.-C., Darzynkiewicz, Z., Kapuscinski, J., Kelly, T. R. & Watanabe, K. A., 1989. Intercalating agents with covalent bond forming capability. A novel type of potential anticancer agents. 2. Derivatives of chrysophanol and emodin. *J. Med. Chem.*, 32 (7): 1594-1599.

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

L

Lohézic-Le Devéhat, F., Tomasi, S., Elix, J.A., Bernard, A., Rouaud, I., Uriac, P., & Boustie, J. 2007. Stictic Acid Derivatives from the Lichen *Usnea articulata* and Their Antioxidant Activities. *J. Nat. Prod.*, 70, 1218-1220.

M

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. *Edition Presses Polytechniques & Universitaires Romandes*, Suisse, p Vii, 2, 3.

Malaspina, P, Casale, M, Malegori, C, Hooshyari, M, Di Carro, M, Magi, E, & Giordani, P. 2018. Combining spectroscopic techniques and chemometrics for the interpretation of lichen biomonitoring of air pollution. *Chemosphere* 198, 417-424.

Mnojilavic, N., Rankovic, B., & Kosanic, M. 2012. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites *Phytomedicine* , 19 : 1166-1172.

Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., Stefanović, O., Čomić, L., Đačić, D., Ćurčić, M., & Marković, S. 2011. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5428-5448.

Müller, K. 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Springer-Verlag. Appl Microbiol Biotechnol* 56:9–16.

Murtagh, G.J., Dyer, P.S., & Crittenden, P.D. 2000. Reproductive systems, sex and the single lichen. *Nature*, 404, 464.

Murtagh, G. J.; Dyer, P. S.; & Crittenden, P. D. 2000. *Nature* , 404, 564-564.

N

Nash III, T. H. 2008. Lichen Biology. *Cambridge University Press*, 2nd Ed. 498 p.

Nash, T.C., Raven, B.D., Greis, C., & Bungantz, F. 2001. Lichen Flora of the greater sonoran desert region, Vol 1.

Naidu, K. A. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An Overview. *Nutrition Journal* 2 (7), 1-10.

O

Odabasoglu, A., Aslan, A., & Cakiretal. 2005. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species, *Fitoterapia*, vol. 76, no. 2, pp. 216–219.

Olivier, B. 2006. Aperçu de la végétation lichénique du site Saint Daumas (Var) 84250, *Le Thor France*, 64 p.

Ortiz, G.G., Pacheco, M.F.P., Bitzer, Q.O.K., Ramírez, A.A.C., Flores, A.L.J., Ramírez, V., Macias, I.M.A., & Torres, S.E.D. 2013. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*, 1-14.

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.

Ozenda, P. 2000. Les végétaux : organisation et diversité biologique. 2^{ème} ed. *Dunod*, Paris, 516 p.

Ozenda, P., & Clauzade, G. 1970. Les lichens : étude biologique et flore illustrée. *Ed. Masson*, Paris, p 801, 808.

P

Pandey, K.B., & Rizvi, S. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270-278

Parrot, D. 2016. Etude de quatre lichens marins, maritime ou terrestre et des bactéries associées : Evaluation de la diversité bactérienne et recherche de métabolites d'intérêt. *INSA de Rennes*, France, 303 p.

Pickering, A.M., Vojtovich, L., Tower, J., & Davies, J.A. 2013. Oxidative stress adaptation with acute, chronic and repeated stress. *Free radical biology and medicine*. 55; 109-118.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.O. 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 233–239.

Plaza, C., Lorena, E., Diaz, D.T., Robert, K., & Lukingf, I. 2014. Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan andes. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2(5), 138-147.

Piquet, M.A. & Hébuterne, X. 2007. Nutrition en pathologie digestive. *Edition Wolters Kluwer France*, p 93.

Pierre, J., & Chin, Y. 2016. L'automedication chez les animaux dans la nature. *Connaissance et savoirs*, 226 p.

Polovinka, M.P., Komarova, N.I., Korchagina, D.V., Sokolov, D.N., Luzina, O.A., Vlasenko, N.G., Malyuga, A.A., Romanova, E.V., & Salakhutdinov, N.F. 2012. Secondary metabolites of the lichen *Cladonia stellaris*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 48, No.3.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269, 337 – 341.

R

Rankovic, B., Mišić, M., & 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.

Rankovic, B., Kosanic, M., & Stanojkovic, T. 2011. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* , 11:97.

Rankovic, B. 2015. Lichen secondary metabolites bioactive properties and pharmaceutical potential. *Springer*, India, 202 p.

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.

Roland, J.C ; El Maarouf. B.H ; & Bouteau, F. 2008. Atlas de biologie végétale 1. Organisation des plantes sans fleurs, algues et champignon, 7^{ème} éd. *Dunod*. Paris. 142 p.

Roux, C., Bricaud, O., & Tranchida, F. 1999. Importance des lichens dans la gestion d'une réserve naturelle : l'exemple de la réserve de la vallée de la Grand'Pierre et de Vitain (Loir-et-Cher, France). *Bull. Soc. Linn. Provence*, 50 : 203-231.

S

Sakagami, Y., Iinuma, M., Piyasena, K.G., & Dharmaratne, H.R. 2005. Antibacterial activity of alpha-mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. *Phytomedicine*.12(3):203-8.

Sasikumar, J.M., Gincy, M.M., & Teepica, P.D. 2010. Comparative studies on antioxidant activity of methanol extract and flavonoid fraction of *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Electron J Environ Agric Food Chem* 9:227–233.

Sauvion, N., Paul, A.C., Denis, T., & Frédéric, M.P. 2013. Interactions insectes- Plantes. *Quae*, RD 10.78026 Versaille Cedex, France, 784 p.

- Shrestha, G., & Clair, L.L.S.** 2013. Lichens : a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochem Rev* ,12 : 229-244.
- Slikard, K., & Singleton, V.L.** 1977. Total phenol Analysis : Automation and comparaison with Manuel Methos. American Society for Enology and Viticulture, 28 : 49-55.
- Smirnoff, N.** 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. *Copyright by Blackwell Publishing Ltd.*
- Smith, K., Butters, M., Paget, W. E., Goubet, D., Fromentin, E., & Nay, B.** 1999. Selective mono-chlorination of aromatic compounds. *Green Chemistry*, 1, 83-90.
- Srivastava, P., Logesh, A.R., Upreti, D.K, Dhole, T.N & Srivastava, A,** 2013, In-vitro evaluation of some Indian lichens against human pathogenic bacteria, *Mycosphere* 4 (4): 734–743.
- Stocker, W.** 2008. Metabolic diversity of lichen- forming ascomycetous fungi : culturing, polyketed and shikimate metabolites production, and PKS genes. *Nad Prot Rep*, 25(1) : 188-200.
- Stojanovic, G., Stojanović, I., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., & Kostić, D.** 2010. Reducing power and radical scavenging activity of four *Parmeliaceae* species. *Cent. Eur. J. Biol.* 5(6) : 808-813.
- Sun, V., Wang, S., Zhao, W., Gwen, H.G., Hongxun, T .,Luj, J.J., Wang, Y., & Chen, X.P.** 2016.chemical constituents and biological research on plants in the genus curcuma .4(20):9-16.

T

- Thadhani, V.M., Choudhary, M.I., Ali , S., Omar, I., Siddique, H., & Karunaratne, V.** 2011. Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Natural Product Research*, Vol. 25, No. 19, 1827–1837.
- Tiévant, P.** 2001. Guide des lichens : 350 espèces de lichens d'Europe. *Delachaux et Niestlé*, Paris, 304 p.

V

Van Haluwyn, C., Asta, J., & Gaveriaux, J.P. 2009. Guide des lichens de France : Lichens des arbres. *Ed. Berlin*, Paris, 231, 240 p.

Vansant, G. 2004. Radicaux libres et antioxydants : principes de base. *Ed Institut Danone*.

Verma, N., Behera, B.C., & Sharma, B.O. 2012. Glucosidase Inhibitory and Radical Scavenging Properties of Lichen Metabolites Salazinic Acid, Sekikaic Acid and Usnic Acid. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* , 40 (1), 7-21.

Vuong, Q.V., Hirun, S., Roach, P.D., Bowyer, M.C., Phillips, P.A., & Scarlett, C.J. 2013. *Journal of Herbal Medicine*, 3 : 104–111.

W

Wang, X., & Quinn, P.J. 2006. The structure and phase behaviour of α -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie* 88, 1883-1888.

Y

Yamamoto, Y., Hara, K., KwKmi, H., Komine, M., Upreti, D.K., Paradeep, K., Shukla, D.V., & Rajpai, R. 2015. Lichen substances and their biological activities in : Recent advances in lichenology modern methods and approaches in lichen systematic and culture techniques. 2^{ème} edition. *Springer*. India. 232 p.

Z

Zarabska, D., Ejewicz, B., Studzin, E., Sroka, S., & Faqtnowicz, W. 2015. Transplantation of lichen thalli: a case study on *Cetraria islandica* for conservation and pharmaceutical purposes. *Fungal Ecology* ,1 6 : 3 4-4 3.

Annexe 1 : Analyse quantitative

1. Teneur en phénols totaux

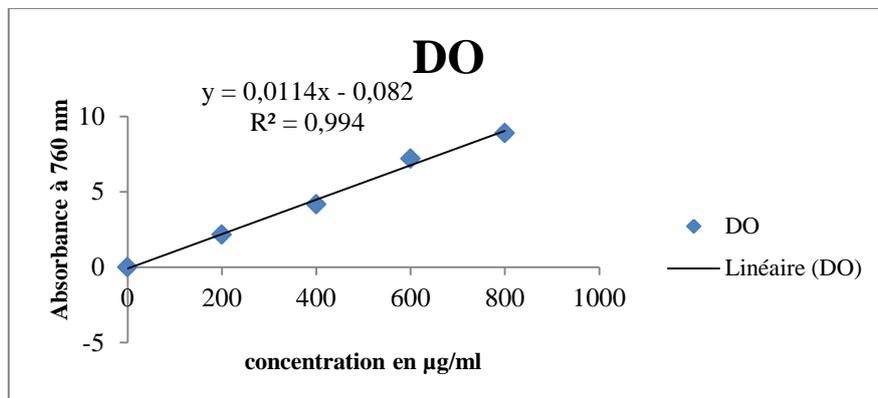


Figure 1 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

2. Teneur en flavonoïdes

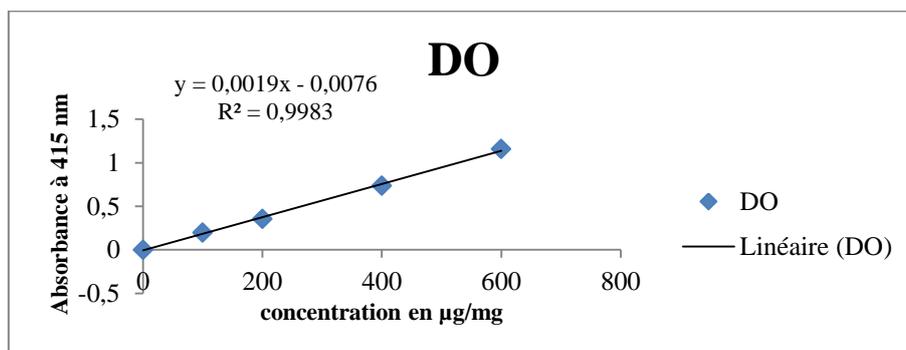


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercetine

Annexe 2 : Evaluation de l'activité antioxydante

1. Teste de piégeage du radical libre DPPH'

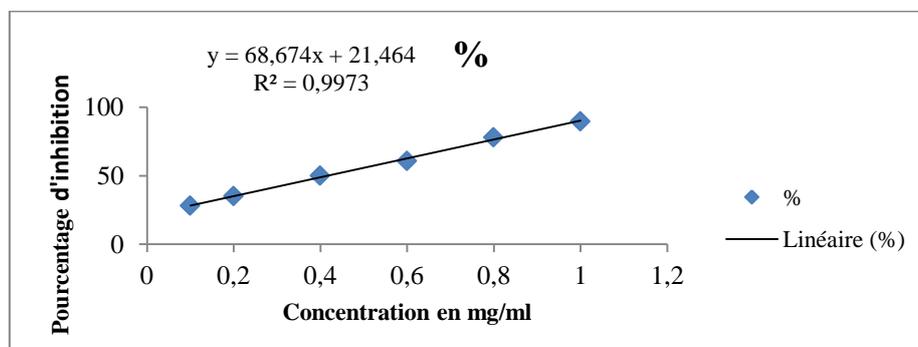


Figure 3 : Pourcentage d'inhibition d'acide ascorbique.

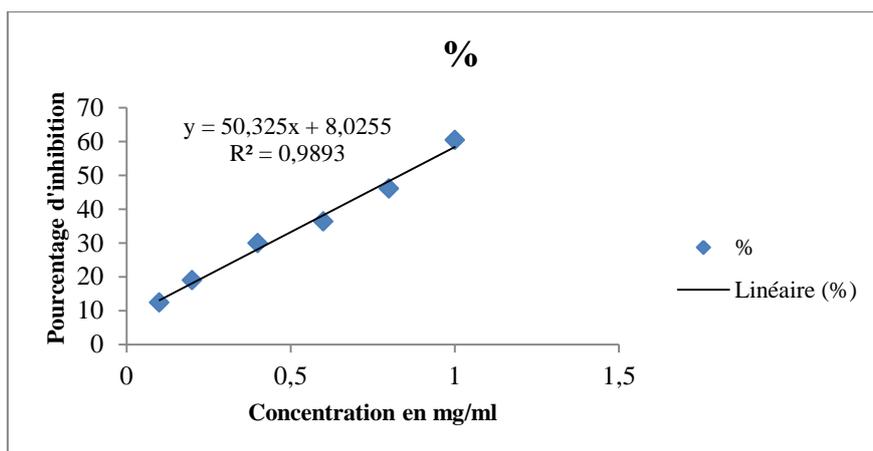


Figure 4 : Pourcentage d'inhibition d'extract aqueux.

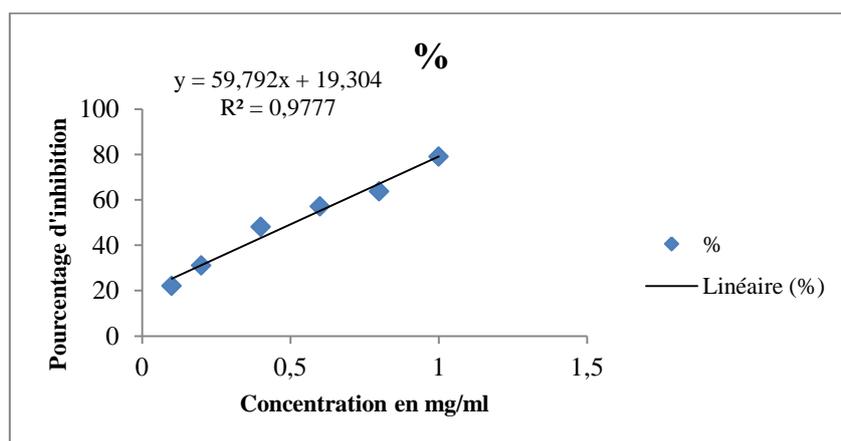


Figure 5 : Pourcentage d'inhibition d'extract chloroformique.

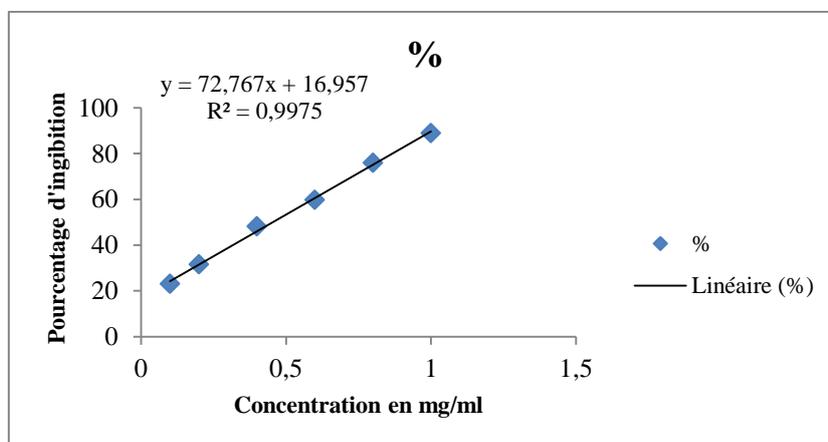


Figure 6 : Pourcentage d'inhibition d'extract n-butanolique.

2. Test de la réduction du fer (FRAP)

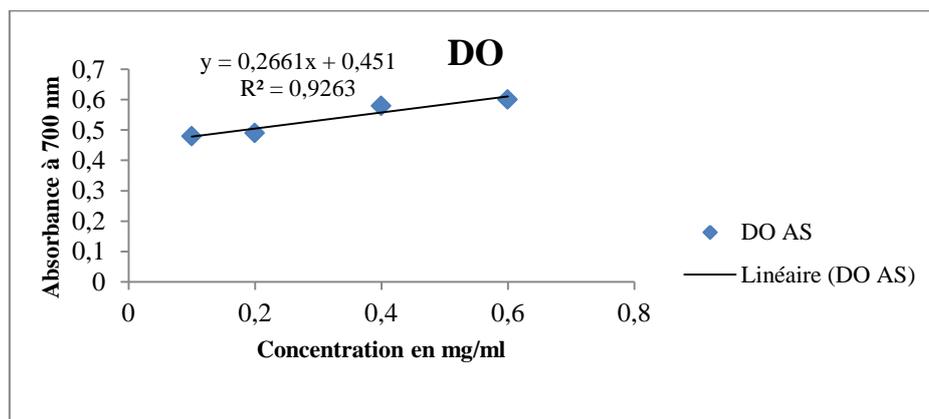


Figure 7 : Régression linéaire du pouvoir réducteur d'acide ascorbique.

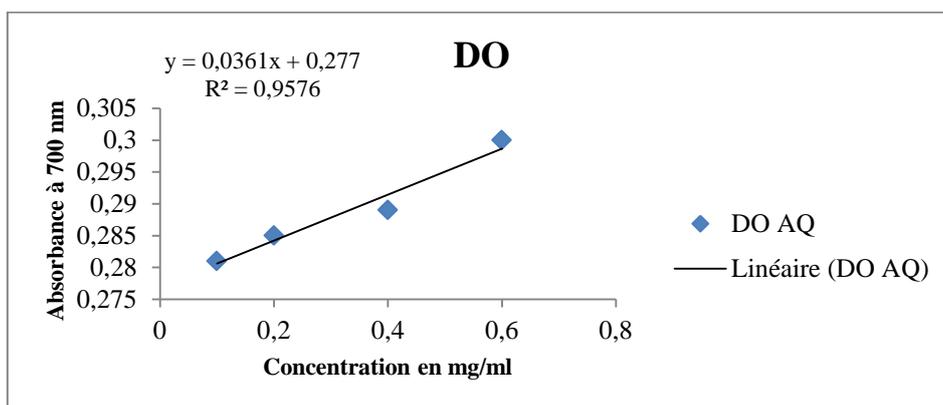


Figure 8 : Régression linéaire du pouvoir réducteur d'extrait aqueux.

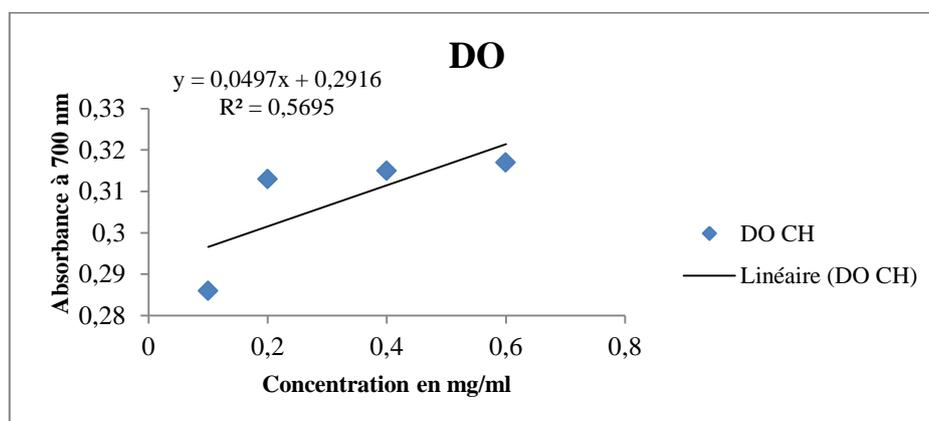


Figure 9 : Régression linéaire du pouvoir réducteur d'extrait chloroformique.

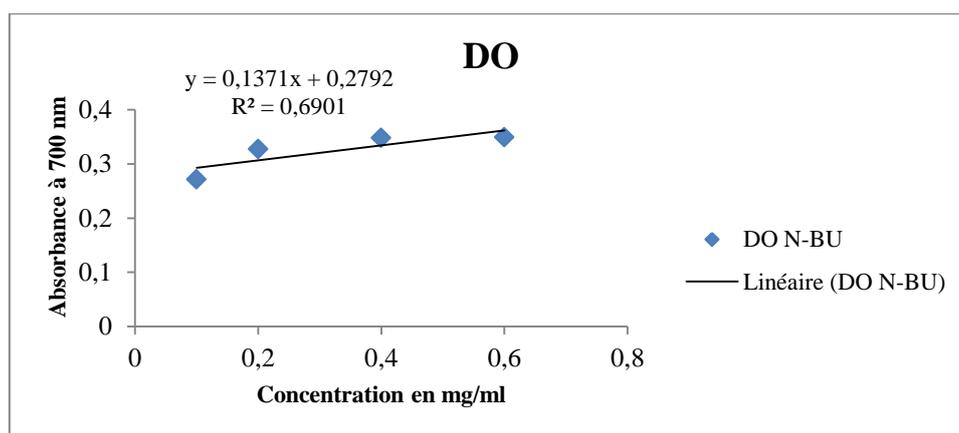


Figure 10 : Régression linéaire du pouvoir réducteur d'extrait n-butanolique.

3. Capacité antioxydante totale

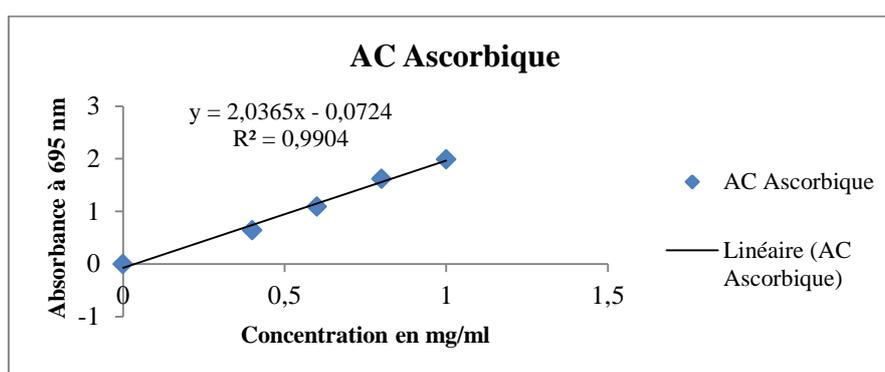


Figure 11 : régression linéaire d'acide ascorbique.

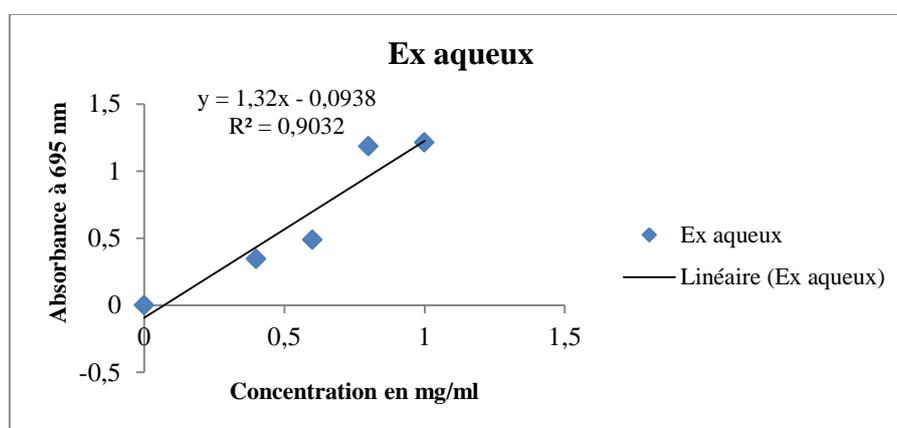


Figure 12 : régression linéaire d'extrait aqueux.

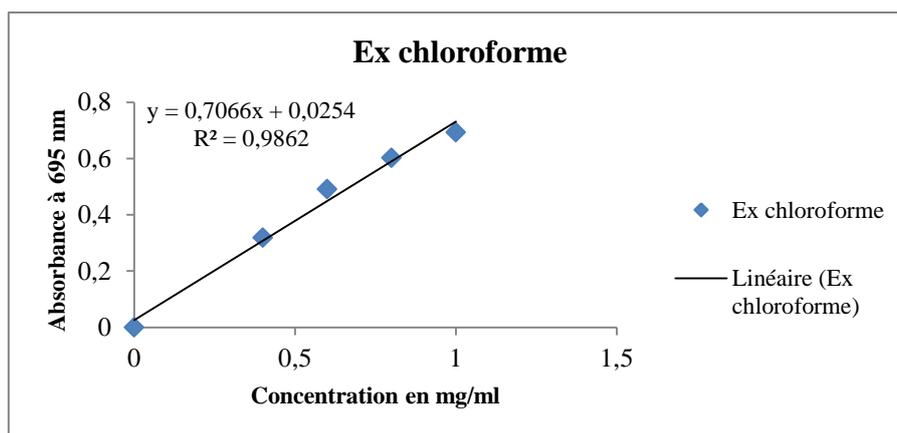


Figure 13 : régression linéaire d'extrait chloroformique.

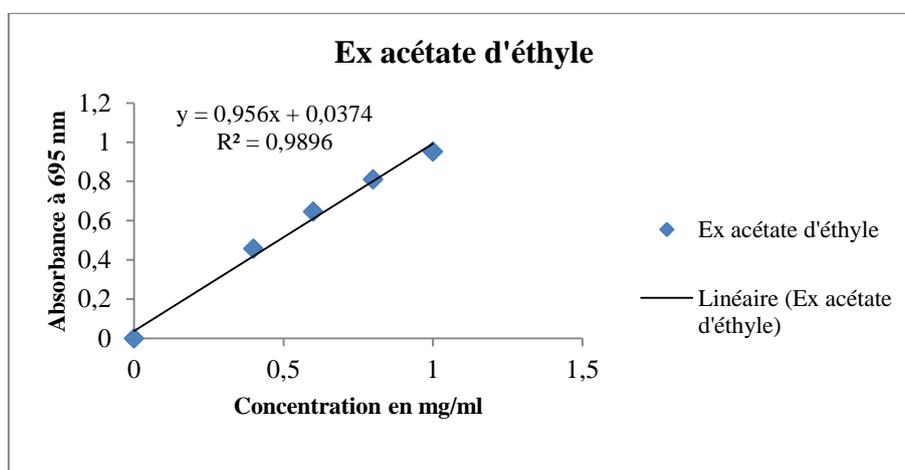


Figure 14 : régression linéaire d'extrait acétate d'éthyle.

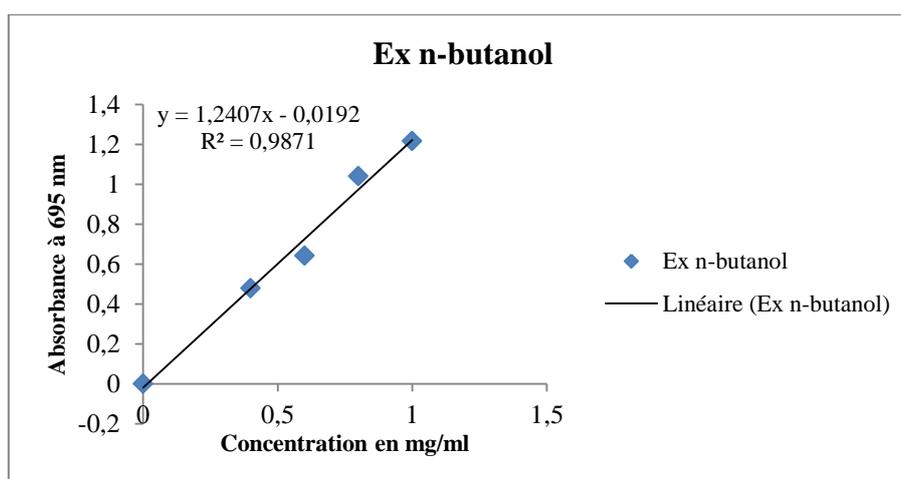


Figure 15 : régression linéaire d'extrait n-butanolique.

Annexe 3 : Corrélations entre chaque dosage antioxydant (DPPH et CAT) et la teneur totale en phénols et en Flavonoïdes

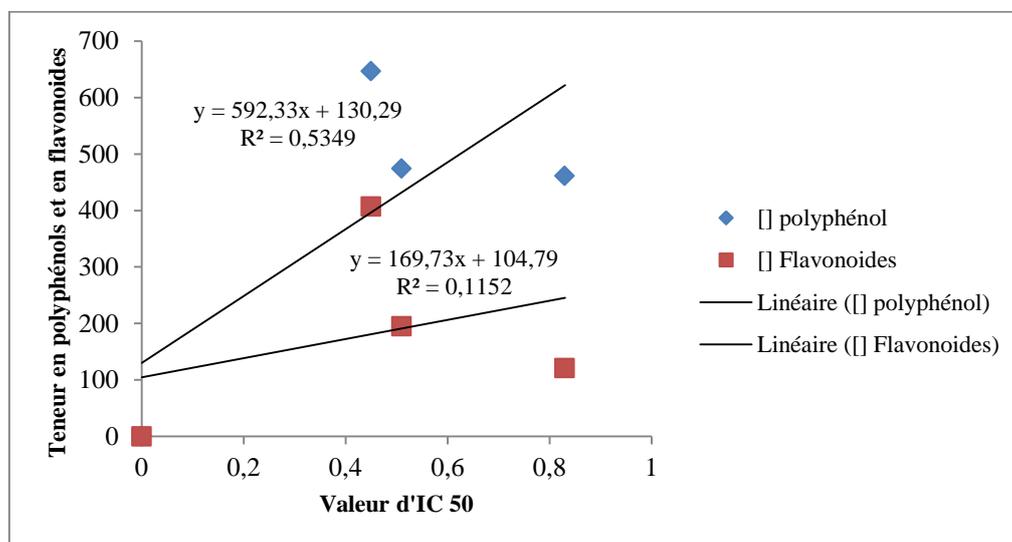


Figure 16 : régression linéaire de la corrélation entre le contenu phénolique total et flavonoïdes avec le dosage de DPPH .

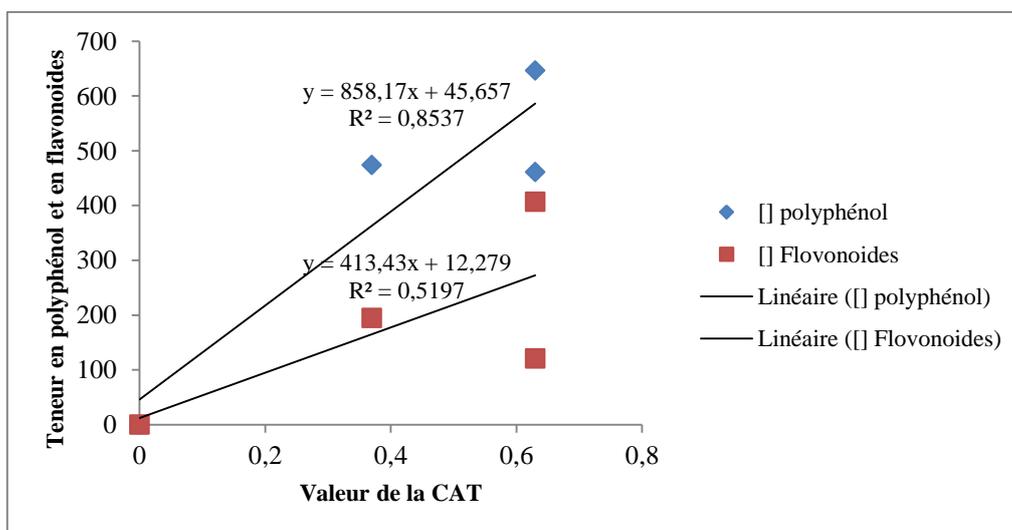


Figure 17 : régression linéaire de la corrélation entre le contenu phénolique total et flavonoïdes avec le dosage de la CAT.

Annexe 4 : tableaux d'étude statistiques

1. Test d'ANOVA à un facteur des phénols totaux

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	ddl	MS	F	Probabilité	Seuil critique pour F
Entre Groupes	8,50576667	3	2,83525556	28,2536677	0,00013136	4,06618056
A l'intérieur	0,8028	8	0,10035			
Total	9,30856667	11				

2. Test d'ANOVA à un facteur des flavonoïdes

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	ddl	MS	F	Probabilité	Seuil critique pour F
Entre Groupes	0,15490092	3	0,05163364	6,839421	0,01341523	4,06618056
A l'intérieur	0,06039533	8	0,00754942			
Total	0,21529625	11				

3. Test d'ANOVA à un facteur du DPPH

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	ddl	MS	F	Probabilité	Seuil critique pour F
Entre Groupes	0,363786	2	0,181893	24803,5909	1,7687E-12	5,14325285
A l'intérieur	4,4E-05	6	7,3333E-06			
Total	0,36383	8				

4. Test d'ANOVA à un facteur du FRAP

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	ddl	MS	F	Probabilité	Seuil critique pour F
Entre Groupes	0,000342	2	0,000171	30,1764706	0,00073939	5,14325285
A l'intérieur	3,4E-05	6	5,6667E-06			
Total	0,000376	8				

5. Test d'ANOVA à un facteur de la CAT

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	ddl	MS	F	Probabilité	Seuil critique pour F
Entre Groupes	0,072126	3	0,024042	5342,66667	1,524E-13	4,06618056
A l'intérieur	3,6E-05	8	4,5E-06			
Total	0,072162	11				

Présenté par : YEDRI Amina	Encadreur : M ^{elle} SALEM S
HEBBACHE Amel	Date de soutenance : Juin 2018

Nature du diplôme : Master 2 en biologie : toxicologie fondamentale et appliquée

Thème : Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits du lichen *Parmelia caperata*.

Résumé

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante des extraits d'une espèce de lichen *Parmelia caperata*. Les broyats ont été soumis à une extraction et fractionnement pour avoir quatre extraits : chloroformique, acétate d'éthyle, n-butanol et aqueux.

La teneur en phénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, alors que les flavonoïdes ont été évalués par la méthode de chlorures d'aluminium $AlCl_3$. L'estimation quantitative par la méthode colorimétrique des flavonoïdes et des phénols totaux a montré que les extraits sont riches en ces composés avec une différence significative entre les fractions testées.

L'évaluation de pouvoir antioxydant qui a été réalisé chez tous les extraits en utilisant les trois tests : méthode de piégeage de radicale libre DPPH, test de la réduction de fer et test de la capacité antioxydante totale a indiqué que les différents extraits ont montré une bonne efficacité antioxydante dont la fraction butanolique est la plus active ($IC_{50} = 0,45 \text{ ug/ml}$ en comparant avec celle du standard qui est de l'ordre de $0,41 \text{ ug/ml}$).

Les résultats obtenus ont montré une corrélation positive élevée ($R^2 = 0,853$) entre les teneurs en phénols totaux et la capacité antioxydante.

Mots clés : Extraits lichéniques, phénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydantes.

Abstract

The purpose of this study is to evaluate the antioxidant activity of extracts of a species of lichen *Parmelia caperata*. The crushed materials were extracted and fractionated to obtain four extracts: chloroformic, ethyl acetate, n-butanol and aqueous. The total phenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, whereas the flavonoids were evaluated by the $AlCl_3$ aluminum chloride method. The quantitative colorimetric estimation of flavonoids and total phenols showed that the extracts are rich in these compounds with a significant difference between the fractions tested.

The antioxidant assessment that was performed in all extracts using the three tests: DPPH free radical scavenging method, iron reduction test, and total antioxidant capacity test indicated that the various extracts good antioxidant efficiency and that the butanolic fraction is the most active ($IC_{50} = 0.45 \text{ ug / ml}$ compared with that of the standard which is of the order of 0.41 ug / ml). The results obtained showed a high positive correlation ($R^2 = 0.853$) between the total phenol contents. And the antioxidant capacity

Key words : lichenic extracts, total phenols, flavonoids, antioxidant activity.

ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة من مقتطفات من نوع من الاشنات. تم استخلاص المواد المسحوقة وتقطيرها للحصول على أربعة مستخلصات: كلوروفورميك ، أسيتات إيثيل ، ن - بيوتانول ومائي.

تم تحديد محتوى الفينول الكلي باستخدام كاشف الفولان سيوكالو ، في حين تم تقييم الفلافونويد بواسطة طريقة كلوريد الألومنيوم ، وأظهر التقدير اللوني الكمي للفلافونويد والفينول الكلي أن المقتطفات غنية بهذه المركبات مع وجود فرق كبير بين الكسور التي تم اختبارها.

واختبار تقييم مضادات الأكسدة الذي تم إجراؤه في جميع المستخلصات باستخدام الاختبارات الثلاثة: طريقة كسح الجذور الحرة واختبار خفض الحديد ، قدرة مضادات الأكسدة الكلية أشارت إلى أن المستخلصات المختلفة لها فعالية جيدة مضادة للأكسدة التي يكون جزء بوتانولاني هو الأكثر نشاطا مقارنة مع المعيار ، وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود علاقة إيجابية عالية بين محتويات الفينول الكلي والقدرة المضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات الحزازية ، الفينول الكلي ، الفلافونويد ، النشاط المضاد للأكسدة.