

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de La recherche scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Dosage des polyphénols et étude de leur activités
antioxydants des extraits du lichen *Collema cristatum*
récolté dans le Parc National de Gouraya (Bejaia)**

Soutenu le : 13 Juin 2016

Présenté par :

M^{elle} BELKHIR Sarra

M^{elle} SLIMANI Kahina

Composition du jury :

M^{me} A. ZEBBOUDJ

Pr. (UAMB)

Présidente

M^{me} H. DJOUDAD-KADJI

MCB (UAMB)

Promotrice

M^{me} Y.BERRI

MAA (UAMB)

Examinatrice

Année universitaire : 2015/2016

La nature est éternellement jeune, belle et généreuse, elle verse la poésie et la beauté à tous les êtres, à tous les plantes, qu'on laisse s'y développer.

George Sand



Pas un prestidigitateur n'égale la nature : elle opère sous nos yeux, en pleine lumière, et cependant il n'y a pas moyen de pénétrer ses trucs.

Rémy de Gourmont

REMERCIEMENTS

Louange à **DIEU**, le tout puissant, qui nous a donné la force pour accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier sincèrement notre promotrice M^{me} **DJOUAD-KADJI H.** Maitre de Conférence à l'UAMB pour sa disponibilité, son aide, ses conseils et ses orientations. Nous la remercions vivement pour le choix du sujet qui est original et intéressant.

Nous remercions également M^{me} **AMIR H.** Maitre de Conférence à l'UAMB pour avoir codirigé ce travail ainsi que pour son aide et son soutien.

Nos remerciements vont aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à notre travail. Nous remercions particulièrement M^{me} **ZEBBOUDJ A.** Professeur à l'UAMB pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de notre mémoire. Nous remercions également M^{me} **BERRI Y.** Maitre Assistante à l'UAMB pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions Mr. **BELKHIR M.A.** Professeur à l'UAMB, pour son aide et ses conseils.

Nous remercions Mr. **KADJI B.** Maitre Assistant B à l'UAMB, pour son aide.

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

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

DEDICACES

Tout au début, je tiens à remercier le bon dieu de m'avoir donné du courage et de la patience afin de réaliser ce travail que je dédie :

A mes chers parents pour leur sacrifice, leur multiple soutien, et leur encouragement, leur tendresse, disponibilité durant toutes mes années d'étude. Que dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie. J'espère que je suis à la hauteur de ce que vous attendez de moi. Je vous aime.

A ma chère sœur : Sabrina et son mari et ses enfants : Romaisa, Serine, Mouhamed-Ayoub.

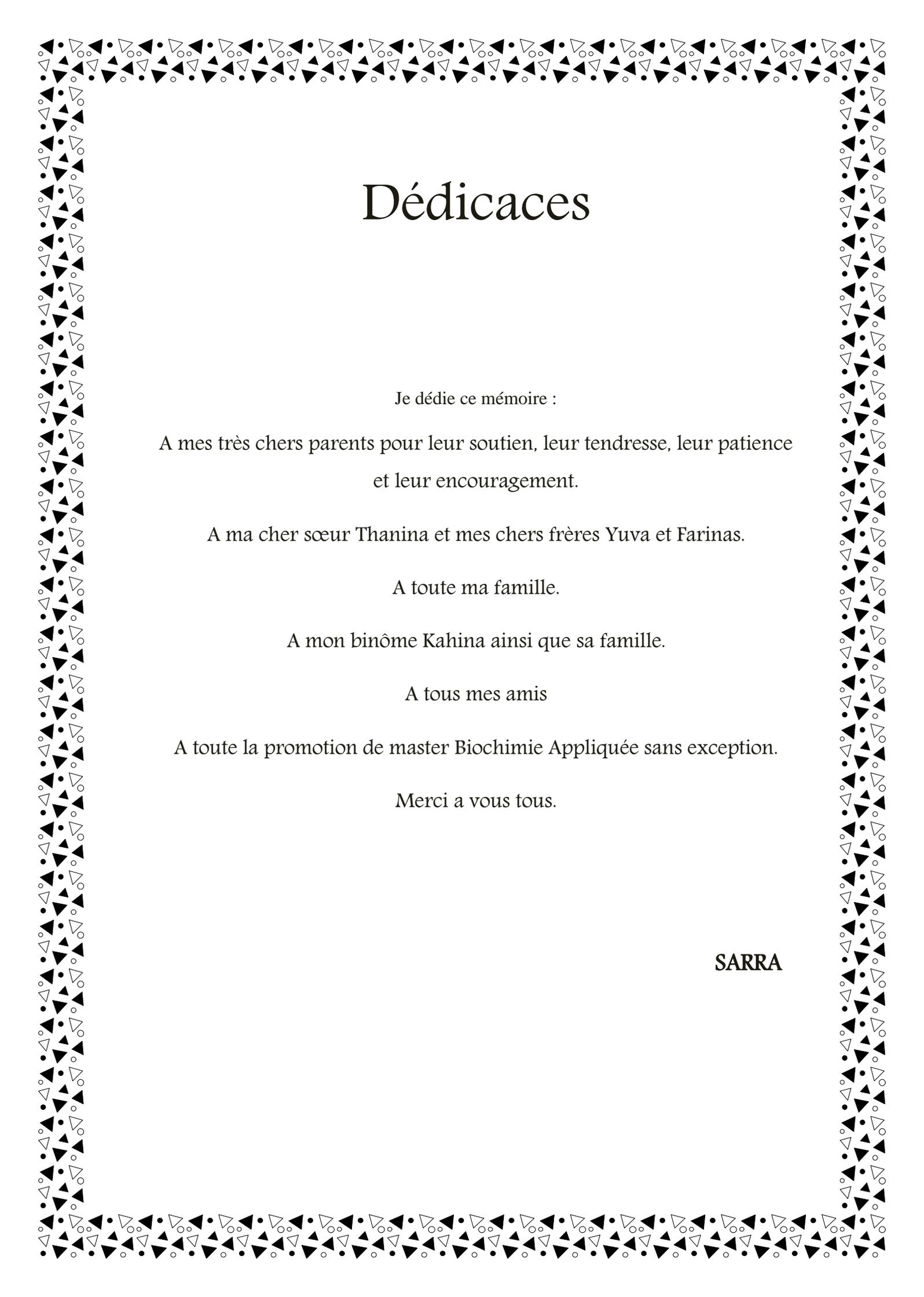
A mes chers frères : Omar, Sofiane, Massinissa.

A mohamed et sa famille

A mon binôme Sarra et sa famille

A ma famille, mes amies et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

KAHINA

A decorative border composed of repeating geometric shapes: small circles, triangles, and squares, arranged in a repeating pattern around the perimeter of the page.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents pour leur soutien, leur tendresse, leur patience
et leur encouragement.

A ma cher sœur Thanina et mes chers frères Yuva et Farinas.

A toute ma famille.

A mon binôme Kahina ainsi que sa famille.

A tous mes amis

A toute la promotion de master Biochimie Appliquée sans exception.

Merci a vous tous.

SARRA

SOMMAIRE

Remerciements

Dédicaces

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

INTRODUCTION.....1

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. GENERALITES SUR LES LICHENS.....3

1.1. Définition et Historique.....3

1.2. Classification des lichens.....4

1.3. Ecologie et répartition4

1.4. Morphologie et anatomie des thalles.....4

1.5. Usages des lichens.....5

1.6. Caractéristiques spécifiques des lichens.....5

2. GENERALITES SUR LE GENRE *COLLEMA* ET L'ESPECE *COLLEMA CRISTATUM*5

2.1. Caractéristiques et distribution du genre *Collema*.....5

2.2. Position taxonomique du genre *Collema*6

2.3. Description de l'espèce *Collema cristatum*.....6

3. METABOLITES SECONDAIRES LICHENIQUES.....7

3.1. Les alcaloïdes7

3.2. Les terpenoïdes.....7

3.3. Les composés phénoliques8

3.3.1. Biosynthèse des composés phénoliques.....8

3.3.2. Classe des composés phénoliques8

3.4. Les flavonoïdes9

3.5. Les tanins.....9

3.5.1. Les tanins condensés.....10

3.5.2. Les tanins hydrolysables.....10

4. ACTIVITES BIOLOGIQUES11

5. NOTION DE STRESS OXYDATIF ET DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....11

5.1. Le stress oxydant11

5.1.1. Définition.....11

5.1.2. Les radicaux libres.....12

5.2. Les antioxydants.....13

5.2.1. Définition.....13

5.2.2 Mécanisme d'action.....13

SOMMAIRE

6. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIRADICALAIRE...	13
7. LA MATIERE GRASSE DES LICHENS.....	14
7.1. Définitions des lipides.....	14
7.2. Les Acides gras.....	15
7.3. Les grandes catégories d'acides gras.....	15
7.4. Les lipides des lichens.....	16

II. MATERIEL ET METHODES

1. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL.....	17
1.1. Description du site de récolte.....	17
1.2. Choix de l'espèce	17
1.3. Récolte.....	17
2. PREPARATION DE LA POUDRE ET DES EXTRAITS.....	18
2.1. Préparation de la poudre.....	18
2.2. Choix des solvants et préparation des extraits	18
3. DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU.....	20
4. DOSAGE ET DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES.....	20
4.1. Dosage des composés phénoliques.....	20
4.1.1. Dosage des polyphénols totaux	20
4.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	21
4.1.3. Dosage des tanins condensés.....	22
4.2. Détermination des activités antioxydantes.....	23
4.2.1. L'activité scavenger du radical DPPH.....	23
4.2.2. Le pouvoir réducteur.....	24
4.2.3. Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	25
4.2.4. Piégeage du radical hydroxyle (OH).....	26
4.2.5. Capacité antioxydante totale (CAT)	27
5. CARACTERISATION DES ACIDES GRAS	28
6. ANALYSES STATISTIQUES.....	29

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU	30
2. LES DOSAGES.....	30
2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	30
2.2. Teneur en flavonoïdes	32
2.3. Teneur en Tanins condensés.....	33

SOMMAIRE

3. ACTIVITES ANTIOXYDANTES	35
3.1. Activité scavenger du DPPH.....	35
3.2. Le Pouvoir réducteur.....	36
3.3. Test de blanchiment de β-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	37
3.4. Activité de scavenger du radical hydroxyle OH•.....	38
3.5. Activité antioxydante totale (CAT).....	39
4. CORRELATIONS ENTRE LES DOSAGES ET LES ACTIVITES.....	40
5. COMPOSITION EN ACIDES GRAS.....	41
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	42
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	43
ANNEXES	

Liste des abréviations

AAO : Activité antioxydant	FRAP : Pouvoir antioxydant par réduction ferrique
AAR : Activité antiradicalaire	
Abs : Absorbance	H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
Ac : Acétone	K₃Fe(CN) : potassium ferricyanide
ADN : L'acide désoxyribonucléique	MDA : malonaldéhyde
AH : Antioxydant	MeOH : Méthanol
AG : Acide gras	mg EAG/g E : milligramme d'équivalent en acide gallique par gramme de l'extrait
ANOVA : Analyse de la variance à une seul critère de la classification	mg EQ/g E : milligramme d'équivalent en quercétine par gramme de l'extrait
ATP : Adénosine triphosphate	mg EC/g E : milligramme d'équivalent en catéchine par gramme de l'extrait
CAT : Activité antioxydante totale	O₂ : Oxygène moléculaire
CLHP : Chromatographie liquide haute Performance	OH· : Radical hydroxyle
CP : Composés phénoliques	P^H : Potentiel d'Hydrogène
CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse	PR : Pouvoir réducteur
CPG/FID : Chromatographie en phase gazeuse- ionisation de flamme	R² : Coefficient de corrélation (de détermination).
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle	SNV : sciences de la nature et de la vie
EDTA : Disodium Ethylenediamine tetraacetic acid	TCA : Trichloro-acetic acide
ERN : Espèces réactives du Nitrogène	TC : Tanins condensés
ERO : Espèces réactifs de l'oxygène	V/V : Rapport volume par volume
ETOH : Ethanol	β-CARO : β-Carotène
FLA : Flavonoïde	

Liste des figures

Figure 1 :	Echanges nutritionnels entre les partenaires de lichens.....	1
Figure 2 :	Principaux types de thalles rencontrés chez les lichens.....	2
Figure 3 :	Distribution du genre <i>Collema</i> dans le monde entier.....	3
Figure 4 :	L'espèce <i>Collema cristatum</i> à l'état sec et humide.....	4
Figure 5 :	Structure des principales classes des polyphénols.....	6
Figure 6 :	Structure chimique de base des flavonoïdes.....	6
Figure 7 :	Structure chimique générale des tanins condensés.....	7
Figure 8 :	Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).....	7
Figure 9 :	Déséquilibre de balance Radicaux libre / Antioxydants.....	9
Figure 10 :	Les quatre étapes de réduction mono-électronique de l'oxygène.....	9
Figure 11 :	Structure de base des acides gras.....	12
Figure 12 :	Situation géographique lieu de récolte : Parc national de Gouraya.....	17
Figure 13 :	Les étapes de la préparation de la poudre et des extraits.....	19
Figure 14 :	Structure de l'acide gallique (Acide 3,4,5 trihydroxybenzoïque).....	20
Figure 15 :	Structure de la quercétine.....	22
Figure 16 :	Structure de la catéchine.....	22
Figure 17 :	Structure chimique du radical libre DPPH [·] (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle).....	23
Figure 18 :	Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl).....	23
Figure 19 :	Teneur en phénols totaux des extraits de <i>Collema cristatum</i>	30
Figure 20 :	Teneur en flavonoïdes des extraits de <i>Collema cristatum</i>	32
Figure 21 :	Teneur en tanins condensés des extraits de <i>Collema cristatum</i>	33
Figure 22 :	Effet du solvant d'extraction sur l'activité scavenger du radical DPPH des extraits de <i>Collema cristatum</i>	35
Figure 23 :	Effet du solvant d'extraction sur le pouvoir réducteur des extraits de <i>Collema cristatum</i>	36
Figure 24 :	Effet du solvant d'extraction sur l'activité de blanchiment de β -carotène des extraits de <i>Collema cristatum</i>	37
Figure 25 :	Effet du solvant d'extraction sur l'activité de piégeage du radical hydroxyle (OH) des extraits de <i>Collema cristatum</i>	38
Figure 26 :	Effet du solvant d'extraction sur l'activité antioxydante totale (CAT) des extraits de <i>Collema cristatum</i>	39
Figure 27 :	Chromatogramme de la composition en acides gras de <i>C. cristatum</i> obtenus par une CPG.....	42

INTRODUCTION

Radicaux libres, espèces réactives oxygénées (ERO), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives à ces notions (Defraigne et Pincemail, 2007).

Il est admis que l'oxygène moléculaire constitue un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces dernières sont impliquées dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des ERO peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, à savoir : les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui est à l'origine de diverses pathologies dont fait partie : les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, etc (Favier, 2003).

Pour remédier à cette situation, il a été mis en évidence un très grand nombre de molécules antioxydantes, connues comme véritable bouclier contre les radicaux libres. Ces molécules peuvent être biologiques ; naturellement fabriquées par notre organisme ; ou bien apportées par l'alimentation. Chaque antioxydant a une localisation bien spécifique et cible des radicaux libres particuliers (Tanguy & *al.*, 2009).

C'est ainsi que la définition du terme « antioxydant » englobe toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Shimizu, 2004).

L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif citées plus haut. Ces composés sont un groupe complexe de substances naturelles qui ont attiré une attention considérable par les chercheurs (Collin et Crouzet, 2011).

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes (Bahorun, 1997), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Akowuah & *al.*, 2004).

Les lichens, étant une association entre une algue verte et/ou une cyanobactérie et un champignon, font preuve d'une autonomie énergétique (photosynthèse algale). Ces capacités remarquables sont dues à une physiologie particulière et un métabolisme qui aboutit à la formation de métabolites secondaires (essentiellement produits par le champignon) (Ranković, 2015).

INTRODUCTION

Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de substances biologiquement actives. Ainsi, de nombreuses espèces font l'objet d'études phytochimiques approfondies afin de mettre à jour des composés nouveaux, qui pourraient trouver des applications dans des domaines tels que l'industrie pharmaceutique (Yamamoto & *al.*, 2015).

Il est à préciser que les métabolites secondaires lichéniques auraient la capacité à piéger les radicaux libres : le radical hydroxyle, l'oxygène singulet, l'anion superoxyde et le dioxyde d'azote. Cette activité sert à protéger le thalle d'un stress oxydatif. La forte activité antioxydante des lichens a été reliée par de nombreuses études à la teneur en composés chimiques notamment en polyphénols (Mitrovic & *al.*, 2011) et d'autres comme l'acide lécanorique, l'acide salazinique, l'acide sistique ou l'acide usnique (Manojlovic & *al.*, 2012).

C'est dans ce contexte d'étude que s'inscrit ce présent travail, dont l'objectif principal étant d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits totaux de l'espèce de lichens *Collema cristatum*, collectée dans la région de Bejaïa.

Au préalable nous avons procédé à la détermination de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins condensés

En second temps, nous avons évalué l'activité antioxydante en moyen de cinq méthodes, à savoir :

-
- ✓ Le test de DPPH ;
 - ✓ Le test du pouvoir réducteur ;
 - ✓ Le blanchissement du β -carotène ;
 - ✓ Le test de piégeage du radical hydroxyle (OH \cdot) ;
 - ✓ Le test de la capacité antioxydante totale (CAT).
-

Lors de ce travail, nous avons effectué également une caractérisation préliminaire des acides gras de la *Collema cristatum* par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Ce manuscrit alors, est subdivisé en trois parties essentielles. La première a été consacrée à une synthèse bibliographique portée principalement sur les lichens, les activités antioxydantes et les acides gras. Alors que, la deuxième a été réservée pour l'explication des protocoles expérimentaux adaptés en réponse aux objectifs de cette l'étude. En dernier rang, nous avons exposé les différents résultats obtenus accompagnés de leurs discussions.

INTRODUCTION

Radicaux libres, espèces réactives oxygénées (ERO), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives à ces notions (Defraigne et Pincemail, 2007).

Il est admis que l'oxygène moléculaire constitue un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces dernières sont impliquées dans des processus physiologiques à des faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des ERO peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, à savoir : les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui est à l'origine de diverses pathologies dont fait partie : les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, etc (Favier, 2003).

Pour remédier à cette situation, il a été mis en évidence un très grand nombre de molécules antioxydantes, connues comme véritable bouclier contre les radicaux libres. Ces molécules peuvent être biologiques ; naturellement fabriquées par notre organisme ; ou bien apportées par l'alimentation. Chaque antioxydant a une localisation bien spécifique et cible des radicaux libres particuliers (Tanguy & *al.*, 2009).

C'est ainsi que la définition du terme « antioxydant » englobe toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Shimizu, 2004).

L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif citées plus haut. Ces composés sont un groupe complexe de substances naturelles qui ont attiré une attention considérable par les chercheurs (Collin et Crouzet, 2011).

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes (Bahorun, 1997), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Akowauh & *al.*, 2004).

Les lichens, étant une association entre une algue verte et/ou une cyanobactérie et un champignon, font preuve d'une autonomie énergétique (photosynthèse algale). Ces capacités remarquables sont dues à une physiologie particulière et un métabolisme qui aboutit à la formation de métabolites secondaires (essentiellement produits par le champignon) (Ranković, 2015).

INTRODUCTION

Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de substances biologiquement actives. Ainsi, de nombreuses espèces font l'objet d'études phytochimiques approfondies afin de mettre à jour des composés nouveaux, qui pourraient trouver des applications dans des domaines tels que l'industrie pharmaceutique (Yamamoto & *al.*, 2015).

Il est à préciser que les métabolites secondaires lichéniques auraient la capacité à piéger les radicaux libres : le radical hydroxyle, l'oxygène singulet, l'anion superoxyde et le dioxyde d'azote. Cette activité sert à protéger le thalle d'un stress oxydatif. La forte activité antioxydante des lichens a été reliée par de nombreuses études à la teneur en composés chimiques notamment en polyphénols (Mitrovic & *al.*, 2011) et d'autres comme l'acide lécanorique, l'acide salazinique, l'acide sistique ou l'acide usnique (Manojlovic & *al.*, 2012).

C'est dans ce contexte d'étude que s'inscrit ce présent travail, dont l'objectif principal étant d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits de l'espèce de lichens *Collema cristatum*, collectée dans la région de Bejaïa.

Au préalable nous avons procédé à la détermination de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins condensés

En second temps, nous avons évalué l'activité antioxydante en moyen de cinq méthodes, à savoir :

-
- ✓ Le test de DPPH ;
 - ✓ Le test du pouvoir réducteur ;
 - ✓ Le blanchissement du β -carotène ;
 - ✓ Le test de piégeage du radical hydroxyle (OH) ;
 - ✓ Le test de la capacité antioxydante totale (CAT).
-

Lors de ce travail, nous avons effectué également une caractérisation préliminaire des acides gras de la *Collema cristatum* par l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Ce manuscrit alors, est subdivisé en trois parties essentielles. La première a été consacrée à une synthèse bibliographique portée principalement sur les lichens, les activités antioxydantes et les acides gras. Alors que, la deuxième a été réservée pour l'explication des protocoles expérimentaux adaptés en réponse aux objectifs de cette l'étude. En dernier rang, nous avons exposé les différents résultats obtenus accompagnés de leurs discussions.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. GENERALITES SUR LES LICHENS

1.1. Définition et historique

Le terme lichen est d'origine grec « *leikhen* » qui fut employé, la première fois au IV^{ème} siècle avant J-C par Theophraste, pour désigner une « plante » croissant sur des troncs d'arbre (Boullard, 1990).

Les lichens ou **champignons lichénisés** sont des organismes composés, présents dans le monde entier. Ils sont formés, par symbiose, à partir de l'association d'un champignon appelé **mycobionte** (hétérotrophe) avec une algue nommée **photobionte** (autotrophe) (Nash, 2008 ; Suty, 2015).

La Relation symbiotique entre les deux partenaires (Figure 1), le photobionte fabrique, grâce à la photosynthèse de la chlorophylle, la matière organique carbonée. Pour cela, elle absorbe l'eau, les sels minéraux, ainsi que le gaz atmosphérique et les transforme en sucres et en vitamines C. Elle cède ensuite ces substances au champignon. Tandis que le mycobionte n'ayant pas de chlorophylle, absorbe des substances minérales et des nutriments grâce auxquels il fabrique des protéides qu'il cède à l'algue. Les produits de l'algue sont ensuite transformés par le champignon en polysaccharides et en métabolites secondaires, appelés substances lichéniques (Fortin, 2007 ; Van Haluwyn & al., 2009).

L'association symbiotique permet donc la production de composés originaux et spécifiques qui ne pourraient pas être synthétisés par chaque individu seul (Bates & al., 2011).

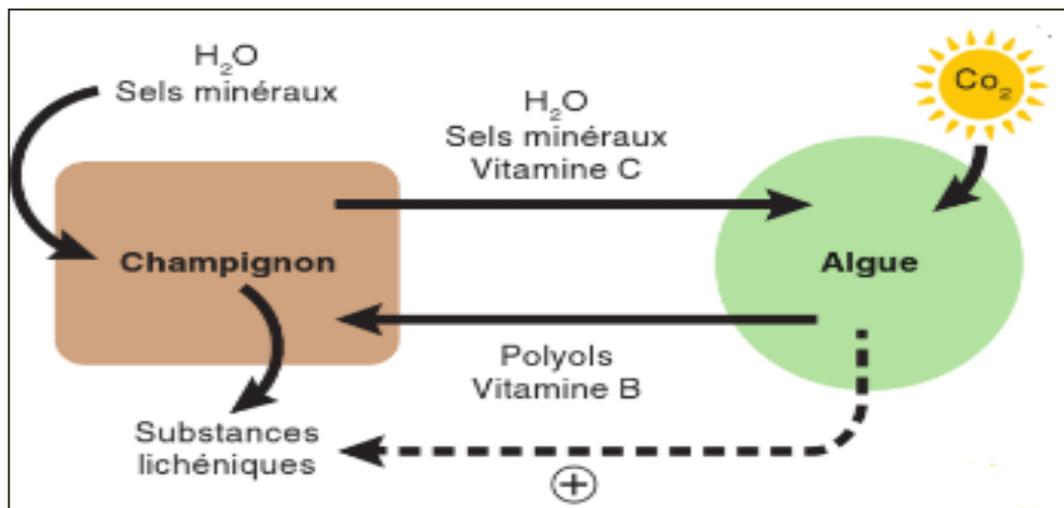


Figure 1 : Echanges nutritionnels entre les partenaires de lichens (Suty, 2015).

1.2. Classification

Les espèces lichéniques représentent plus de 20 % de la biodiversité mondiale fongique. On dénombre environ 20 000 espèces de lichens, dont une majorité reste microscopique (Suty, 2015). Les lichens appartiennent au règne des fungi au groupe des ascomycètes (<http://www.afl-lichenologie.fr/>).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.3. Ecologie et répartition

Les lichens sont répandus à travers presque toutes les régions du monde : des zones les plus extrêmes, vers les pôles, jusqu'aux sommets, dans les déserts rocheux, et représentent environ 8 % de la couverture terrestre (Lutzoni & Miadlikowska, 2009 ; Lange & *al.*, 2001).

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

1.4. Morphologie et anatomie des thalles

A la différence des plantes supérieures, les lichens ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille, mais un appareil végétatif rudimentaire : le thalle. Les différences dans l'aspect du thalle permettent de distinguer généralement 7 types de thalles (Figure 2). (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Lichen>).

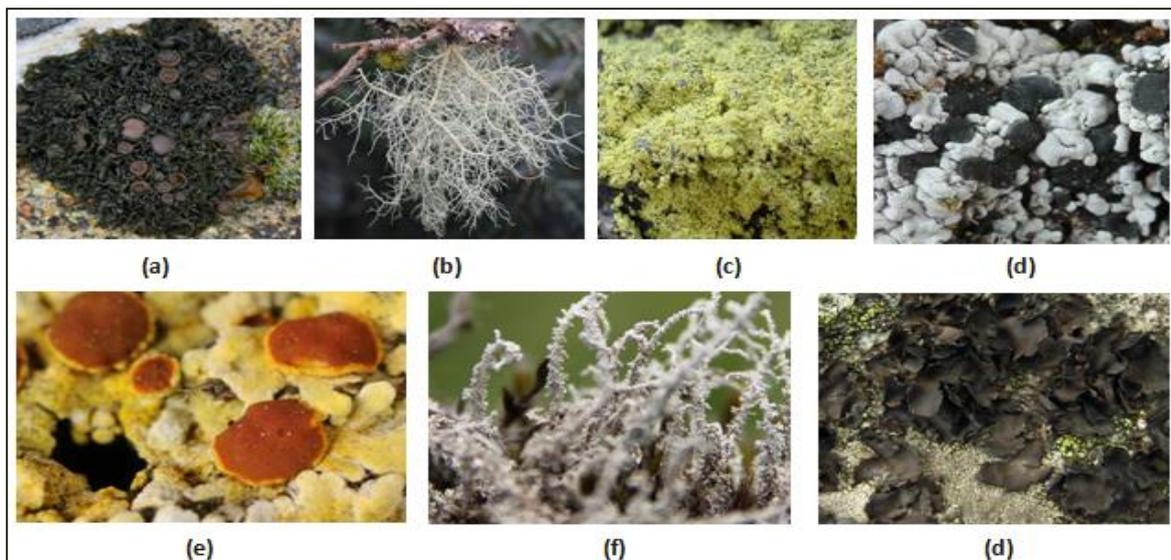


Figure 2: Principaux types de thalles rencontrés chez les lichens (<http://www.afl-lichenologie.fr/>). modifiée

(a) Thalle gélatineux de *Collema cristatum* ; (b) Thalle fruticuleux de *Usnea florida* ; (c) Thalle foliacé de *Umbilicaria polyphylla* ; (d) Thalle squamuleux de *Toninia rosulata*; (e) Thalle crustacé de *Fulgensia fulgens*; (f) Thalle lépreux de *Chrysothrix chlorina* ; (g) Thalle complexe de *Stereocaulon vulcani* *Stereocaulon corticatulum*.

1.5. Usages des lichens

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

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.6. Caractéristiques spécifiques des lichens

Les lichens sont de remarquables exemples d'organismes poikilohydriques, c'est-à-dire dont l'état hydrique varie passivement avec les conditions environnementales atténuantes. Les cas contraires sont les organismes homéohydriques qui peuvent réguler la teneur en eau de leurs organes (feuilles, aiguilles ...) de façon plus ou moins constante. Tous les organismes poikilohydriques (lichens, bryophytes, fougères, certaines plantes vasculaires primitives) se dessèchent rapidement et par conséquent, la disponibilité en eau joue un rôle déterminant pour leur survie et leur distribution (Nash, 1996).

En absence de l'humidité, les lichens cessent leur croissance et entrent en dormance sur de longues périodes. En période de sécheresse, quand la teneur en eau est réduite à environ 20 % de son poids sec, le lichen se rétracte et devient sec et inactif, mais il est capable de survivre jusqu'à la prochaine pluie où il redeviendra actif. On appelle ce comportement la reviviscence. Cette capacité à la reviviscence permet aux lichens de supporter de nombreux stress : sécheresse, froid, chaleur, rayonnements ionisants (Leclerc & Floch, 2010).

Les organismes poikilohydriques utilisent la pluie comme principale source d'eau. Les lichens puisent d'autres sources d'eau, telles que le brouillard ou la rosée.

La croissance des lichens est très lente à cause de quatre facteurs (Suty, 2015) :

- ✓ L'environnement défavorable dans lequel ils vivent ;
- ✓ La production de composés secondaires qui consomment 40% du carbone fixé;
- ✓ La pauvreté en nutriments ;
- ✓ Le faible rendement de la photosynthèse de l'algue.

2. GENERALITES SUR LE GENRE *COLLEMA* ET L'ESPECE *COLLEMA CRISTATUM*

2.1. Caractéristiques et distribution du genre *Collema*

Les espèces du genre *Collema* appartiennent à la famille de Collemataceae, qui est une grande famille de champignons formant des associations symbiotiques avec des algues du genre *Nostoc*. La principale caractéristique de ces lichens est leur habitude gélatineuse, qui est due à une matrice polysaccharide autour des colonies de *Nostoc* qui gonfle et devient extrêmement gélatineuse lorsqu'elle est mouillée-. Ils sont soit saxicoles ou terricoles. Ils se développent soit en montagne, régions froides, soit en régions chaudes ou humides (Figure 3) (Monica & al., 2014).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

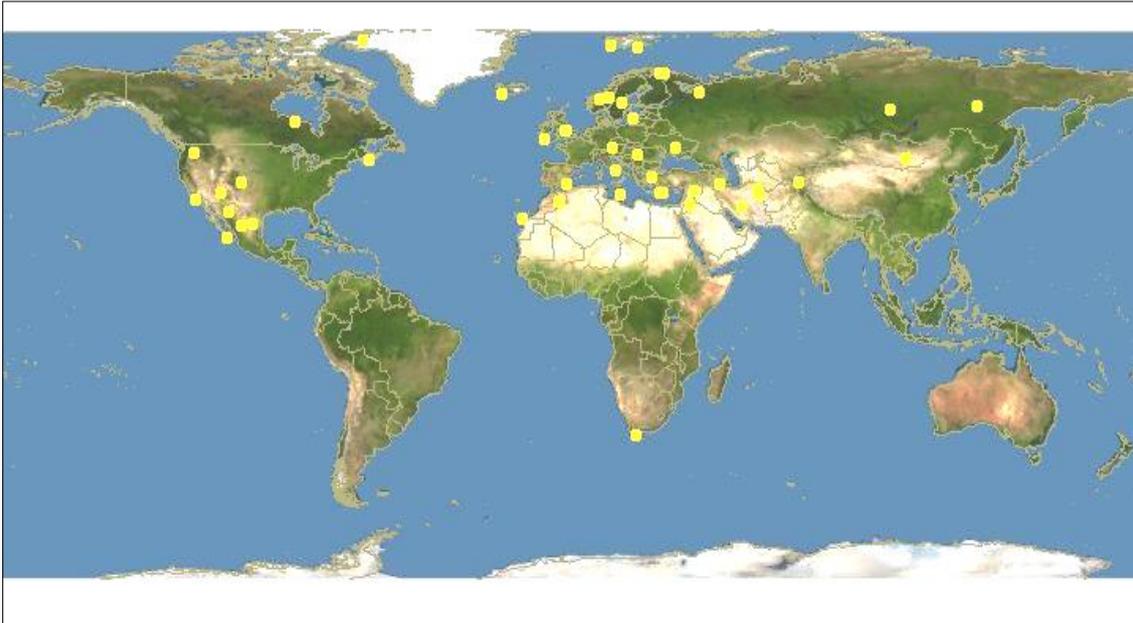


Figure 3 : Distribution du genre *Collema* dans le monde
(<http://www.discoverlife.org/20/q?search=Collema+cristatum>)

2.2. Position taxonomique du genre *Collema*

Au niveau de classification au sein des Fungi, les lichens du genre *Collema* appartiennent à la classification suivante : (<https://en.wikipedia.org/wiki/Collema>)

Règne : Fungi
Classe: Ascomycètes
Sous-classe: Ascomycetidae
Ordre: Lecanorales
Famille: Collemataceae
Genre: *Collema*

Parmi les espèces de ce genre :

Collema cristatum
Collema auriforme
Collema flaccidum...

2.3. Description de l'espèce *Collema cristatum*

L'espèce *Collema cristatum* comprend traditionnellement un thalle de type gélatineux de forme foliacée, de petite à grande, jusqu'à 20 cm de large, arrondie, profondément lobés. Ils sont noirs et cassants à l'état sec, et pulpeux de couleur vert olive à l'état humide (Figure 4). Le photobionte est une cyanobactérie appartenant au genre *Nostoc* (Carolyn & Harris, 1904) :

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

- ✓ Les isidies peuvent être absentes ou présentes, généralement absentes, marginaux, globuleuses.
- ✓ Les apothécies: habituellement présentes, localisées au centre du thalle, concave ou convexe, elles sont nombreuses et se présentent sous forme de disque de 1 à 1,5 cm de diamètre, de couleur rouge à rouge-brun foncé ou noir.



Collema cristatum à l'état sec



Collema cristatum à l'état humide

Figure 4: Photo de l'espèce *Collema cristatum* à l'état sec et humide (photo originale).

3. LES METABOLITES SECONDAIRES LICHENIQUES

Les lichens produisent une large variété de composés organiques divisés en deux groupes principaux : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Plus de 1000 substances secondaires lichéniques ont été identifiés à ce jour (Molnari & Farkas, 2010).

Les métabolites primaires : regroupent les protéines, les lipides, les polyols, les polysaccharides, les pigments (chlorophylles, xanthophylles, carotènes...) et autres composés organiques intervenant dans le métabolisme et la structure des lichens (Podterob, 2008 ; Mitrovic & al., 2011) .

Les métabolites secondaires : sont des substances originales divisées en plusieurs familles et sont principalement responsables de l'aptitude des lichens à se développer dans des conditions extrêmes. Ils représentent en moyenne 5 à 10 % de la masse sèche du thalle (Shukla & al., 2010). Ils renferment trois classes principales : les alcaloïdes, les terpenoïdes et les composés phénoliques.

3.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés au goût amer qui ont des propriétés basiques. Ils figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine. Ils comprennent entre autres, la morphine, la cocaïne, et la nicotine. (Raven & al., 2000)

3.2. Les terpenoïdes

Les terpenoïdes, appelés aussi terpènes, sont des composés d'unités isoprène (C_5H_8), et comprennent les huiles essentielles, le taxol et les glycosides carditoniques. Ils représentent de loin la plus vaste catégorie de métabolites secondaires, avec plus de 22000 composés décrits. Le terpenoïde le plus simple est un hydrocarbure, l'isoprène (C_5H_8). (Raven & al., 2000).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

3.3. Les composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques au règne végétal issues du métabolisme secondaire. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Bruneton, 1993). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (Mompom & *al.*, 1998). Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de groupes phénoliques. L'élément structural de base est un cycle aromatique à 6 atomes de carbones (un noyau benzoïque) auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH), libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (Bruneton, 1993 ; Hennebelle & *al.*, 2004). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénols, à des composés hautement polymérisés, tel que les tanins (Chira & *al.*, 2008).

3.3.1. Biosynthèse des composés phénoliques

L'origine biosynthétique des composés phénoliques est le métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un poly-acétate (Naczka & Shahidi, 2004).

La voie de l'acide shikimique conduit à la formation des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis désamination de ces derniers, aux cinnamates et à leur dérivés (lignines, comarines...). La voie de poly-acétate aboutit à la formation des acides phénols et d'autres composés phénoliques à partir de cyclisation d'unités acétate (Guignard, 2000).

Les fonctions principales attribuées à ces composés sont la protection contre les pathogènes (les bactéries et les champignons) et les herbivores (Gravot, 2008).

3.3.2. Classe des composés phénoliques

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Figure 5).

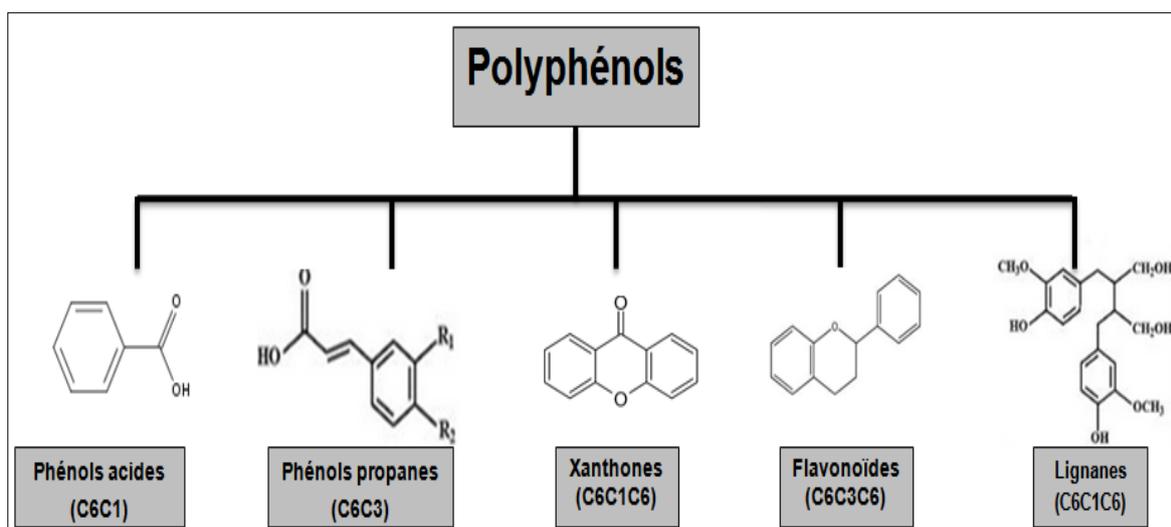


Figure 5 : Structure des principales classes des polyphénols (Crozier & *al.*, 2006) ; modifié.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

3.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le groupe le plus important et le plus abondant des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont largement présentes dans l'alimentation d'origine végétale (Brusselmans & *al.*, 2005). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitués de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle pyranique (C). Ils sont donc arrangés à une configuration C6-C3-C6 (Figure 6) (Chira & *al.*, 2008 ; Pietta, 2000 ; Manach & *al.*, 2004).

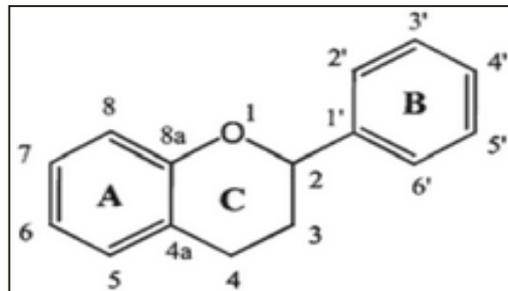


Figure 6: Structure chimique de base des flavonoïdes (Collin & Crouzet, 2011).

Actuellement, environ 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder & Grunhage, 2003). La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C (Yao & *al.*, 2004 ; Tsimogiannins & Orepoulou, 2006).

En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonols, flavones, flavanes, aures, isoflavanones... (Havsteen, 2002).

3.5. Les tannins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour « tanner » les peaux d'animaux, autrement dit pour transformer une peau en cuir. Ce sont des métabolites secondaires importants dans le règne végétal, ils sont des composés phénoliques polymériques de haut poids moléculaire, on distingue deux catégories de tannins différentes par leur structure et par leur origine biogénétique : Les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Hopkins, 2003).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

3.5.1. Les tanins condensés

Sont des polymères d'unités flavonoïdes (flavan-3-ols et/ou flavan-3,4-diols) reliées par des liaisons fortes carbone-carbone ayant un poids moléculaire élevé (de 1000 à 30000 Da). Les chaînes de polymères comptent de 2 à 20 unités environ (Hagerman, 2002). Ils ne sont pas hydrolysables mais ils peuvent être oxydés par des acides forts libérant des anthocyanidines (Figure 7) (Hopkins, 2003 ; bruneton, 2008).

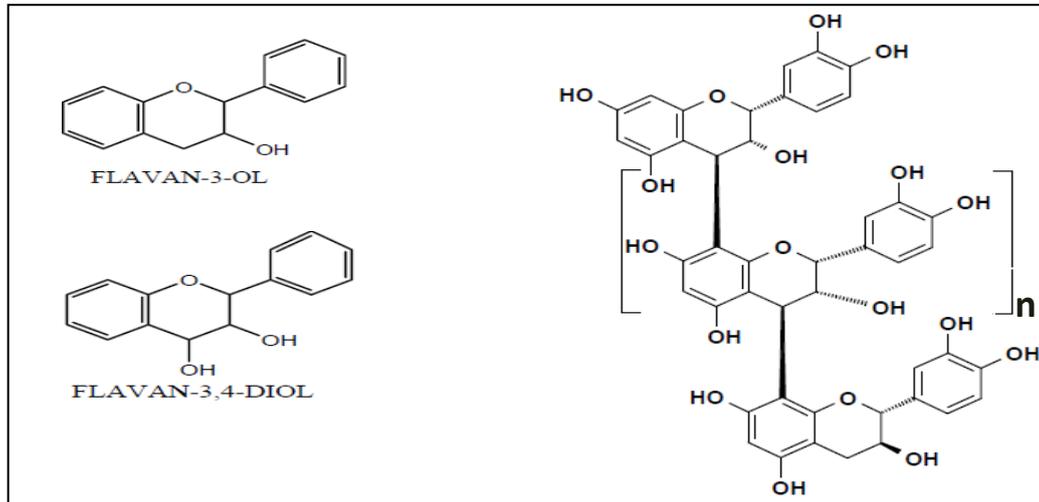


Figure 7 : Structure chimique des tanins condensés (Pokorny & al, 2001; Hagerman, 2002).

3.5.2. Les tanins hydrolysables :

Ce sont des oligo- ou polyester d'un sucre qui est généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acides phénol qui est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitannins (Figure 8) (Hopkins, 2003 ; Collin & Crouzet, 2011).

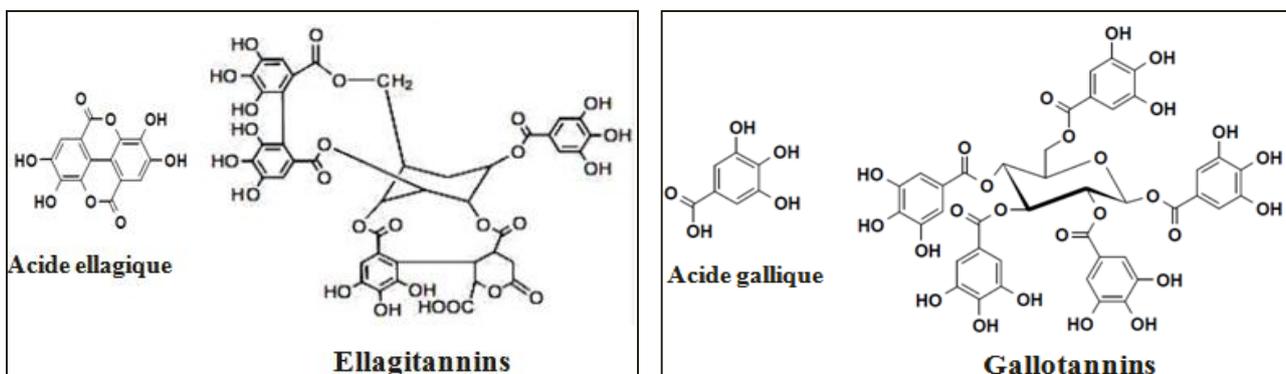


Figure 8: Structure chimique des gallotannins et ellagitannins et leurs acides associés : L'acide gallique et L'Acide ellagique (Hagerman, 2002) modifié.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

4. ACTIVITES BIOLOGIQUES

Les métabolites secondaires lichéniques, souvent appelés acides lichéniques, sont produits principalement par le mycobiote (Stocker-Wörgötter, 2008). Leur rôle est encore peu connu. Ils doivent probablement aider le thalle lichénique à se protéger de son environnement souvent hostile, contre les herbivores, les pathogènes et les facteurs abiotiques. Pour cette raison, la plupart des molécules isolées des lichens font souvent preuve de multiples activités biologiques comme l'atranorine, présentant à la fois des activités antioxydantes, antimicrobiennes et photoprotectrices (Molnár & Farkas, 2010).

Plusieurs études montrent que les métabolites secondaires lichéniques ont une grande variété d'activités biologiques comprenant :

Activité antimicrobienne : antibiotique, antifongique et antivirale (Activité cytotoxique, antitumorale).
Activité antiherbivore et anti-insecticide.
Activité antioxydante et de photoprotection.
Activité inhibitrice sur la croissance des plantes

Certains effets néfastes ont également pu être mis en évidence tels que des phénomènes d'allergie à certaines molécules. Ce phénomène cause quelques problèmes, notamment dans l'industrie des cosmétiques qui utilise l'extrait d'*Evernia prunastri* et de *Pseudevernia furfuracea* notamment, dans de nombreuses préparations parfumées (Huneck, 1999).

5. NOTION DE STRESS OXYDATIF ET DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

5.1. Le stress oxydant

5.1.1. Définition

Dans les systèmes biologiques, l'oxygène moléculaire (O_2) est normalement transformé en molécules d'eau (H_2O) au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule la majorité d'énergie nécessaire (sous forme d'adénosine triphosphate (ATP)) pour assurer ses multiples fonctions (Favier, 2003). Le processus n'est toutefois pas parfait car une faible partie de l'oxygène (2 à 5%) est convertie en métabolites toxiques: les radicaux libres (ERO et ERN) (Pincemail, 2014).

Le stress oxydant se définira donc comme un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres (Espèces réactives de l'oxygène) à caractère pro-oxydant et les antioxydants (Figure 9), dans laquelle les pro-oxydants sont en excès par rapport aux systèmes de défense anti-oxydantes. Cela peut être dû à une surproduction de ERO et/ou une diminution des capacités antioxydantes (Pincemail, 2014 ; Delattre & al., 2007).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

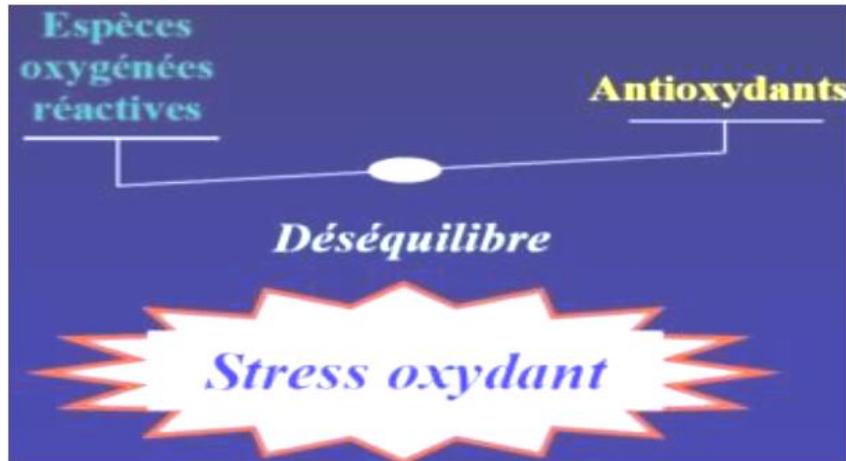


Figure 9 : Déséquilibre de balance Radicaux libres / Antioxydants (Shimizu, 2004).

5.1.2. Radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataire) sur la couche externe (Jacques & André, 2004 ; Dellatre & *al.*, 2007).

Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

Ces radicaux sont responsables de l'altération des macromolécules cellulaires à savoir l'ADN, les protéines, et les lipides en produisant le vieillissement cellulaire qui est à la base de certaines maladies comme le cancer, maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Favier, 2003).

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène**. Parmi ces derniers : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (ROO) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) présenté comme le plus toxique. Ils sont formés par réduction de l'oxygène moléculaire (O_2) (Figure 10).

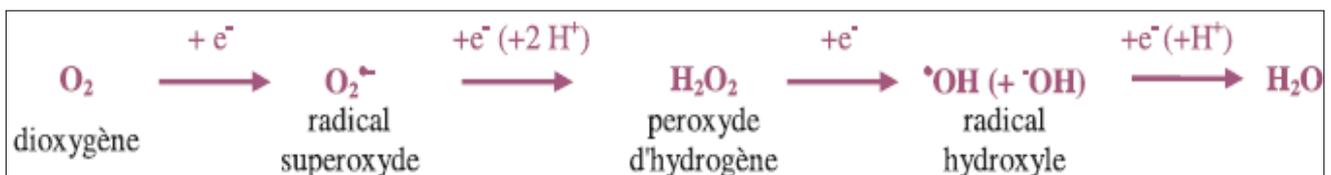


Figure 10 : Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène (Favier, 2003).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

5.2. Antioxydants

5.2.1. Définition

Les antioxydants sont définis par Halliwell comme «toute substance chimique qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat» (Halliwell, 1994 ; Pastre & Priymenko, 2007 ; Le cren, 2012).

Ils piègent les radicaux libres en inhibant les réactions à l'intérieur des cellules provoquées par ces derniers (Benbrook, 2005). Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui ont rôle pour protéger les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des radicaux libres et pour mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. (Shimizu, 2004 ; Tanguy & Begué-Simon., 2009).

Les antioxydants peuvent être d'origine endogène ou exogène. Ils sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Tanguy & Begué-Simon, 2009).

5.2.2. Mécanisme d'action

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

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques. Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (Berger, 2006).

6. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIRADICALAIRE

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyles phénoliques dans leurs structures (Rice-Evans & al., 1996).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydant par piégeage de radicaux différents, comme :

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygène Radical Absorbance Capacity);
Les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter);
Les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique);
La méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphenyl-picrylhydrazyle).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydant peut être mesuré quantitativement d'une façon bien précise (Popovici & *al.*, 2009 ; Hua & *al.*, 2008).

Ces méthodes peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes (Sanchez-Moreno, 2002 ; Haung & *al.*, 2005) :

- ✓ Soit par le transfert d'un proton ;
- ✓ Soit par le transfert d'un simple électron.

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Sanchez-Moreno, 2002).

Tandis que, les méthodes de deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité de piégeage des radicaux libres. Elles comportent la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'hydroxyle (OH), du radical superoxyde (O₂), de l'acide hypochloreux (HOCl) et de l'oxyde nitrique (NO) (Sanchez-Moreno, 2002).

Parmi ces techniques, nous citons :

- ✓ La méthode par piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) ;
- ✓ Le test de blanchiment de β-carotène ;
- ✓ La méthode par piégeage du radical hydroxyl (OH•) ;
- ✓ Le test de capacité antioxydante totale (CAT).

7. LA MATIERE GRASSE DES LICHENS

7.1. Définitions des lipides

Les lipides font partie des «matières grasses» des organismes vivants et sont l'un des trois composés importants du processus anabolique, les glucides et les protéines. Ils sont caractérisés par une propriété physique : la solubilité. Ce sont des substances organiques à solubilité nulle ou faible dans l'eau, mais par contre élevée dans les solvants organiques apolaires, tels que l'hexane, le chloroforme.... Les lipides sont principalement constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène et ont une densité inférieure à la densité de l'eau. Ils se répartissent en différentes catégories dont la plus courante est appelée «lipides vrais» (Moussard, 2006).

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

7.2. Acides gras

Les acides gras (AG) sont des molécules communes à l'ensemble des lipides vrais. Un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique ou ramifiée, présentant des chaînes d'au moins 4 carbones jusqu'à généralement 28 avec ou sans double liaison. C'est un constituant naturellement retrouvé dans les lipides tels que les huiles, les graisses animales et végétales (Figure 11) (Moussard, 2006).

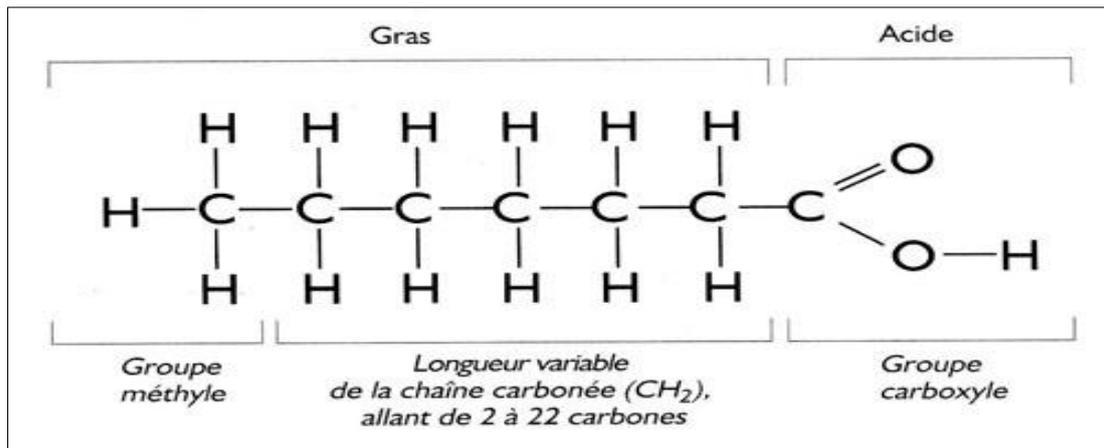


Figure 11 : Structure de base des acides gras (Moussard, 2006).

7.3. Les grandes catégories d'acides gras

Différentes catégories ont été définies (Garrett et Grisham, 2000) :

Les acides gras saturés linéaires ou ramifiés : qui présentent des liaisons carbone-carbone covalentes simples. Ils sont majoritairement présents dans les matières grasses d'origine animale (comme le beurre ou la crème) et sous forme cachée dans les viandes, les fromages, les pâtisseries. Il faut en limiter les apports car, consommés en excès, ils favorisent l'apparition des maladies cardiovasculaires.

Les acides gras monoinsaturés : qui n'ont qu'une seule double liaison entre les atomes de carbone. On les rencontre aussi bien dans le monde animal que végétal: viandes et poissons. Leur meilleur représentant est l'huile d'olive. Dans le cadre d'une alimentation équilibrée, ces acides gras ont un rôle bénéfique sur le fonctionnement du cœur et des vaisseaux sanguins.

Les acides gras polyinsaturés "cis" : qui possèdent plusieurs doubles liaisons. Ils se retrouvent principalement dans les huiles végétales et les poissons gras. Ils interviennent dans de nombreuses réactions de l'organisme. Deux acides gras polyinsaturés dits acides gras essentiels, l'**oméga 3** et l'**oméga 6**, doivent être apportés par l'alimentation car notre organisme ne les fabrique pas.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

7.4. Les lipides des lichens

Les lipides de lichens ont suscité un intérêt scientifique depuis le début des années 1980. En 1992, Dembitsky a résumé les résultats obtenus par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme ou à une spectrométrie de masse (CPG / FID et CPG / MS) des fractions lipidiques à partir d'une grande variété d'espèces de lichens (Dembitsky, 1992).

La composition en acides gras totaux des lichens a été étudiée par de nombreux auteurs (Yamamoto & Watanabe, 1974 ; Dertien & *al.*, 1977 ; Solberg & *al.*, 1987 ; Dembitsky, 1992 ; Torres & *al.*, 2003 ; Reis & *al.*, 2005 ; Hanus & *al.*, 2008 ; Temina & *al.*, 2010) avec des techniques qui ont évolué au cours du temps.

Temina et ses collaborateurs, (2010) ont effectué une analyse des acides gras du genre *Collema* en utilisant la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CPG/MS), et ont permis d'identifier de nombreux acides gras saturés et insaturés contenus dans l'espèce *Collema cristatum* : (Temina & *al.*, 2010).

- Acides gras saturés : C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C:20.
- Acides gras insaturés : C15:1, C16:1, C18:1, C20:1, C16:2, C18:2, C20:2, C16:3, C18:3, C20:3, C16:4, C18:4, C20:4.



MATERIEL ET METHODES



II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL

1.1. Description du site de récolte

Nous avons récolté nos échantillons au niveau du Parc National de Gouraya. Ce site se situe sur le littoral de la wilaya de Béjaïa, au nord-est de l'Algérie (Figure 12). Il s'ouvre sur la Méditerranée, au nord et à l'est, sur une longueur de 11,5 km de corniches et falaises tombant à pic dans la mer. Il est limité par la ville de Béjaïa et la route N° 24 au sud; à l'ouest par la commune de Toudja et la plage de Boulimat (Rebbas & *al.*, 2011).

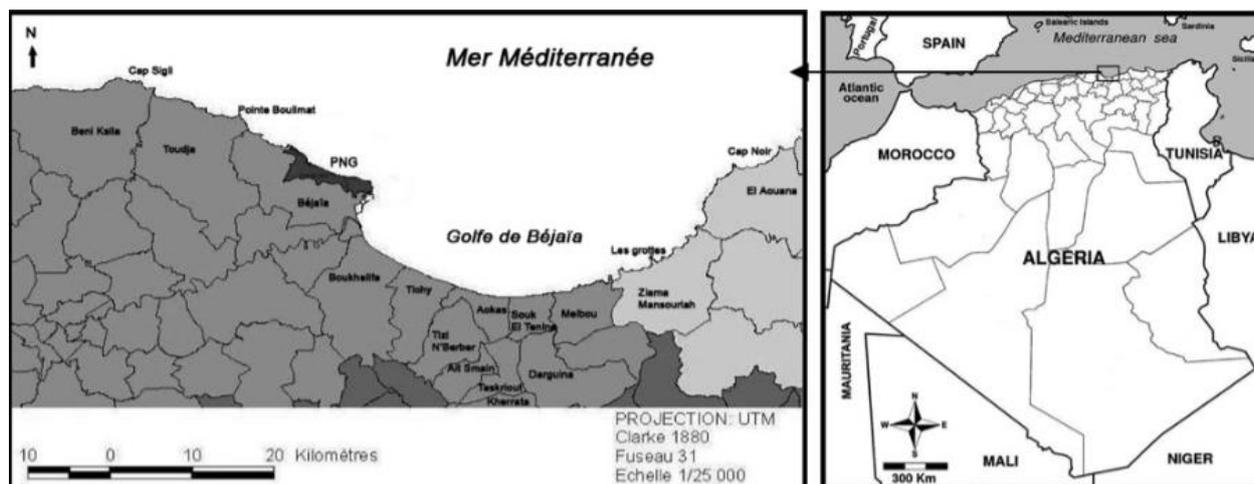


Figure 12: Situation géographique du lieu de récolte « Parc national de Gouraya » (Rebbas & *al.*, 2011)

1.2. Choix de l'espèce

D'après l'inventaire des lichens au niveau du Parc National de Gouraya (PNG) réalisé par Rebbas & *al.* (2011), il a été mis en évidence 50 espèces classées en 14 familles.

Sur la base de ces résultats, nous avons réalisé une fiche descriptive et des campagnes de prospection sur terrain ont été effectuées, visant les endroits suivants : Gouraya, les Aiguades et Cap carbone. Ceci a permis de constater une abondance particulière du lichen *Collema cristatum*, raison pour laquelle nous avons porté le choix d'étude sur cette dernière espèce.

1.3. Récolte

Pour la récolte, plusieurs sorties ont été effectuées en mois d'octobre 2015 et en mois de janvier 2016. L'espèce *C. cristatum* a été récoltée sur des roches à l'aide d'un grattoir et stockée dans des enveloppes en Papier. Pour s'assurer de l'identité de l'espèce, une concertation des spécialistes en botanique a été établie au niveau du laboratoire de Biologie Végétale de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université de Béjaïa.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons observé que les espèces de lichens préfèrent pousser sur les hauteurs de montagnes à des endroits humides, surtout après des périodes de pluies. Ces observations ont été également rapportées par Nash (1996).

2. PREPARATION DE LA POUDRE ET DES EXTRAITS

2.1. Préparation de la poudre

Les échantillons du lichen *C. cristatum* récoltés ont été :

- ✓ Lavés pour éliminer les débris et les impuretés ;
- ✓ Séchés à température ambiante, à l'air libre et à l'abri de la lumière ;
- ✓ Congelés à -18°C pendant 24h ;
- ✓ Lyophilisation à une température de -60°C pendant 5 heures.
- ✓ Le lyophilisat (l'échantillon séché) récupéré a été ensuite broyé en poudre fine grâce à un mixeur électrique ;
- ✓ L'échantillon broyé a été tamisé à l'aide d'un tamis d'un diamètre de maille de 500µm.
- ✓ La poudre obtenue est conservée au réfrigérateur à 6°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

2.2. Choix des solvants et préparation des extraits

L'extraction a été faite par macération en utilisant plusieurs solvants organique, à savoir :

- ✓ Le méthanol ;
- ✓ L'éthanol ;
- ✓ L'acétone ;
- ✓ L'eau distillée ;
- ✓ Méthanol/Eau (50: 50, V/V) ;
- ✓ Ethanol/Eau (50: 50, V/V) ;
- ✓ Acétone/Eau (50: 50, V/V).

Les sept extraits sont préparés ainsi :

- ✓ Dans un bécher, 3g de la poudre sont mis en contact avec 50ml du solvant d'extraction ;
- ✓ Le mélange est soumis à une agitation pendant 4h à l'aide d'un agitateur magnétique (et des barreaux magnétiques) ;
- ✓ Ensuite les mélanges sont filtrés en utilisant un papier filtre.
- ✓ Les extraits obtenus (les filtrats) sont conservés au réfrigérateur à 6°C dans des Eppendorffs en verre.

Les différentes étapes concernant la préparation de la poudre et les extraits sont récapitulées dans la figure 13.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

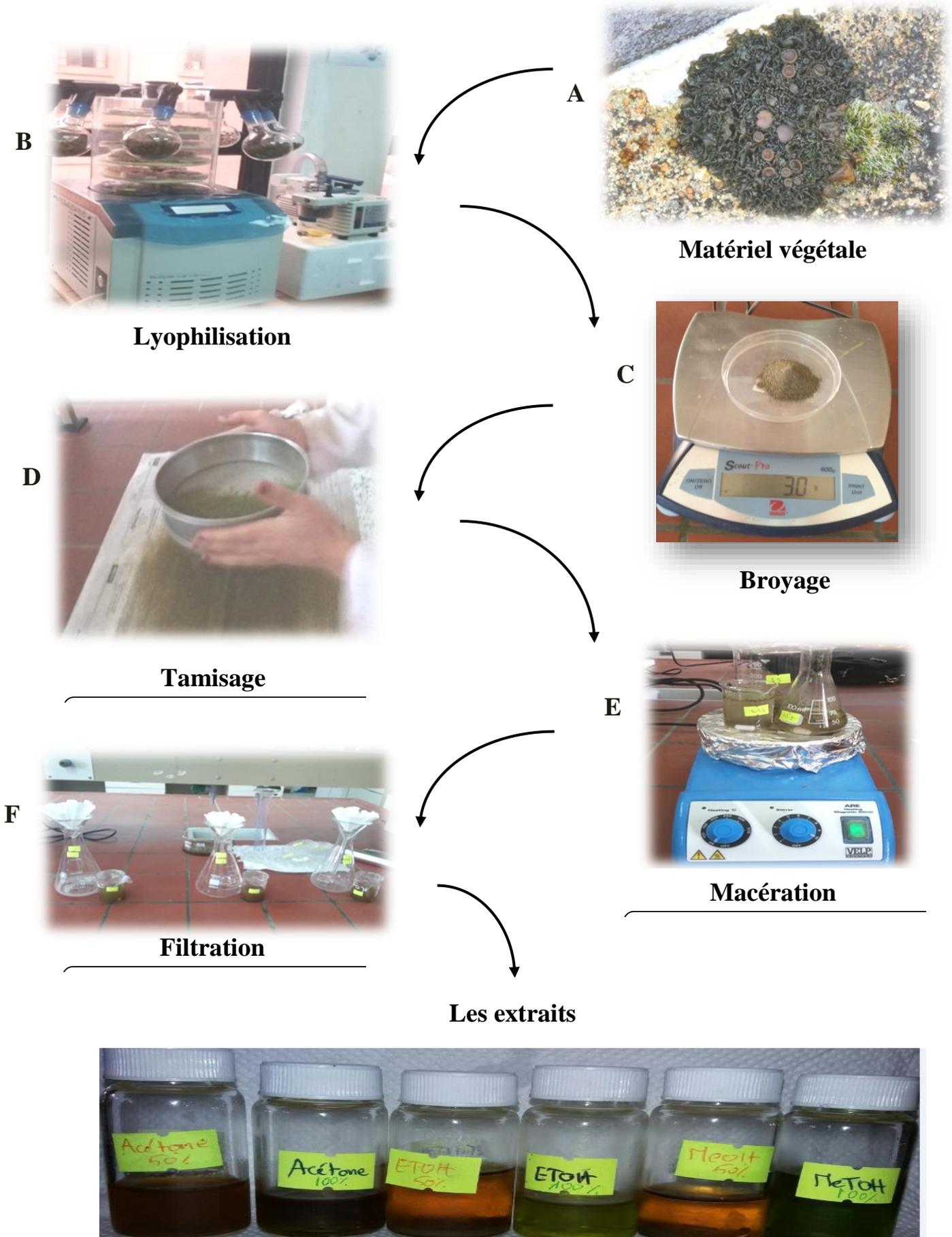


Figure13 : Les étapes de la préparation de la poudre et des extraits (photos originales).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3. DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU

Pour l'estimation de la teneur en eau (%) de notre échantillon, la technique de séchage au lyophilisateur a été retenue.

La teneur en eau est la différence entre le poids de l'échantillon avant et après la lyophilisation. Le pourcentage de la matière sèche est donné par la formule suivante :

$$H\% = (M1-M2) \times 100$$

H% : taux d'humidité ou teneur en eau.

M1 : masse en g de l'échantillon avant la déshydratation (lyophilisation).

M2 : masse en g de l'échantillon après la déshydratation (lyophilisation).

4. DOSAGE ET DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES

4.1. Dosage des composés phénoliques

4.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu qui a été décrite en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses (Singleton et Rossi, 1965).

a. Principe

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 ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Le principe est basé sur la réduction en milieu alcalin de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribereau-Gayon, 1968).

Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique dont la formule chimique est présentée dans la figure ci dessous.

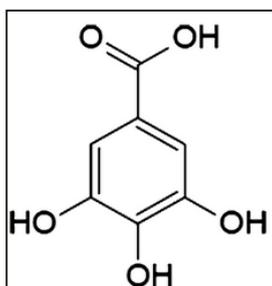


Figure14 : Structure de l'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) (Martins & al., 2010).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

b. Mode opératoire

- ✓ Dans des tubes à essais, on introduit, à l'aide d'une micropipette, un mélange de 100µl de notre extrait, 0.5ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10^{ème}) et 0.4ml de la solution de carbonate de sodium (7.5%) ;
- ✓ L'ensemble est incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 1 heure ;
- ✓ Après l'incubation, on fait la lecture spectrophotométrique ;
- ✓ L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de l'ordre 750 nm d'après le balayage contre un blanc sans extrait pris comme référence (dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon).

4.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

a. Principe

Le chlorure d'aluminium (AlCl₃) forme un complexe de couleur jaune très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. C'est-à-dire Les flavonoïdes présents dans nos extraits forment un complexe jaunâtre par chélation des métaux (le fer et l'aluminium), en perdant deux électrons il s'unit a deux atomes d'oxygène du composé phénolique qui est dans ce cas donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon, 1968). Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 415 nm.

b. Mode opératoire

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) cité par Bahorun & al., (2004) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

- ✓ 1 ml de chaque extrait a été ajouté à un volume égal (1ml) d'une solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol) ;
- ✓ Le mélange a été incubé pendant 10 minutes ;
- ✓ L'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde d'ordre 415 nm ;

Le standard utilisé pour tracer la courbe d'étalonnage des flavonoïdes est la quercétine (Figure 15).

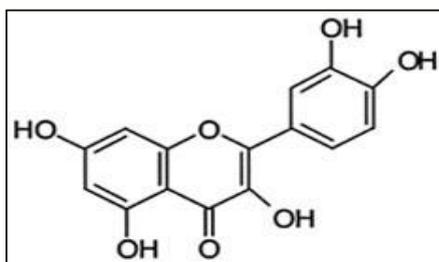


Figure 15: Structure de la quercétine (Shankar et Srivastava, 2012).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.1.3. Dosage des tanins condensés

a. Principe

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

b. Mode opératoire

La teneur en tanins condensés dans nos extraits a été déterminée en utilisant la méthode proposée par Swain et Hillis (1959).

- ✓ 2 ml du réactif de la vanilline (1g de vanilline dissous dans 70 % d'acide sulfurique) et mélangé avec 1 ml d'extrait.
- ✓ Le mélange obtenu est ensuite incubé à 50°C (au bain marie) pendant 20 min.
- ✓ Après l'incubation, l'absorbance a été mesurée à 500 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.
- ✓ Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard (Les résultats des teneurs sont exprimés en milligramme de catéchine équivalent (CE) par gramme de l'extrait). La structure de la catéchine est donnée en figure 16.

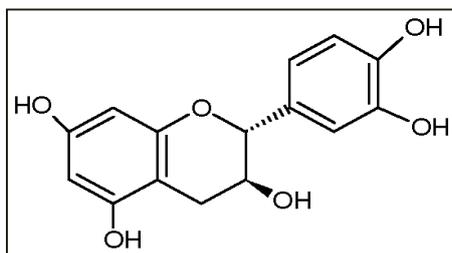


Figure 16 : Structure de la catéchine (Brusselmans & al., 2005).

4.2. Détermination des activités antioxydantes

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

Dans notre étude nous avons utilisé différents tests chimiques, à savoir :

- ✓ L'effet scavenger des antioxydants sur le radical (DPPH) ;
- ✓ Le pouvoir réducteur (test Feric Reducing Antioxydant Power assay (FRAP) qui mesure les pouvoir de réduction des ions de fer ;
- ✓ Le test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique ;
- ✓ Le Piégeage du radical hydroxyle(OH \cdot) ;
- ✓ La capacité antioxydante totale (CAT).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.2.1. L'activité scavenger du radical DPPH

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un composé chimique de formule brute $C_{18}H_{12}N_5O_6$ et de masse molaire 394.32g/mol. Il possède un électron non apparié sur un atome d'azote (Figure 17) (Popovici & al., 2009 ; Molyneux, 2004).

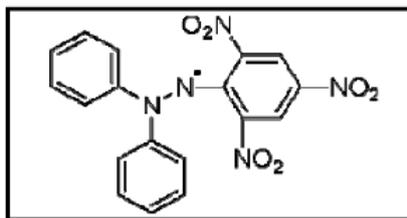


Figure 17 : Structure chimique du radical libre DPPH[•] (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) (Popovici & al., 2009).

a. Principe

La méthode est basée sur la réduction du radical DPPH. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron au radical synthétique DPPH. De coloration violette (forme oxydée) pour le réduire et le stabiliser en DPPH 2,2 Diphényl-1- picryl hydrazine) de coloration jaune-verte (Figure 18) (Maataoui & al., 2006).

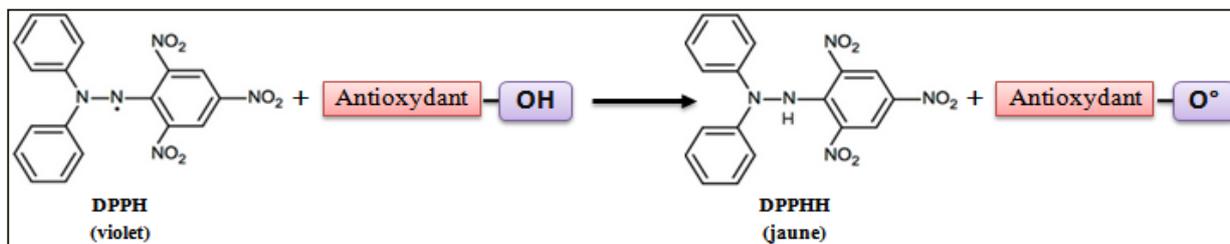


Figure 18 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Liang et Kitts, 2014).

b. Mode opératoire

L'effet scavenger du DPPH est déterminé par la méthode de Kroyer et Hegedus (Kroyer et Hegedus, 2001).

- ✓ 300µl d'extrait sont ajoutés à 2700µl de DPPH (60µM) ;
- ✓ L'absorbance a été lue à 517nm après 1heure d'incubation à l'obscurité ;
- ✓ Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH.est exprimé par la formule suivante :

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

A témoin : Absorbance du témoin (300µl méthanol+ 2700 µl DPPH).

A échantillon : Absorbance de l'extrait (300µl extrait+2700µl DPPH).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.2.2. Le pouvoir réducteur

a. Principe

L'analyse du pouvoir réducteur, d'un antioxydant, est basée sur la réduction du complexe fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, en fer ferreux (Fe^{2+}), en présence des antioxydants réducteurs par transfert des électrons. En effet, le (Fe^{3+}) participe à la formation du radical hydroxyle (OH) par la réaction de fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Chew & al., 2009). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés (Oyaizu, 1986).

b. Mode opératoire

Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode de Arabshahi-Delouee et Urooj (2007);

- ✓ 0.5ml d'extrait est additionné à 1,25ml de tampon phosphate (0,2M, PH 6,6) et 1,25ml de ferricyanure de potassium (1%).
- ✓ Après incubation à 50°C pendant 20min, 2,5ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés au mélange.
- ✓ Après les faire soumettre au vortex pendant quelques minutes. 2,5ml du surnageant sont mélangés avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml du chlorure ferrique (0,1%).
- ✓ Après incubation à l'obscurité pendant 3min, l'absorbance est mesurée à 700nm.

4.2.3. Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

a. Principe

Le β -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de la qualité de ces produits (Bougatef & al., 2009).

Cependant, dans le test du blanchiment du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres. La décoloration du β -carotène résulte de son oxydation par les radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes formés à partir de l'oxydation de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par le Tween 20. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) de manière non spécifique.

La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du β -carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système (Unten & al., 1997).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

b. Mode opératoire

Le test de blanchiment de β -carotène est estimé par la méthode de Sun et Ho, (2005).

Préparation de l'émulsion du β - carotène :

- ✓ Une quantité de 2 mg de β -carotène est dissoute dans 10 ml du chloroforme ;
- ✓ 1 ml de la solution obtenue est prélevé dans une fiole contenant préalablement 200 mg Tween 20 et 20 μ l d'acide linoléique ;
- ✓ Cette solution est évaporée jusqu' à disparition de l'odeur du chloroforme ;
- ✓ Puis, un volume de 100 ml de l'eau oxygénée diluée à 10% est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement ;
- ✓ Dans des tubes à essai, 4 ml de l'émulsion du β -carotène/acide linoléique est additionnée à 200 μ l d'extrait ;
- ✓ Après incubation dans un bain marie à 50°C pendant 120 min, l'absorbance des extraits est mesurée à 470 nm. le contrôle contient 2ml d'émulsion du β -carotène/acide linoléique et 100 μ l de l'eau distillée mesuré directement (à t=0mn), puis incubés dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon.

L'activité antioxydante (AA%) des extraits est évaluée en termes de blanchiment de β -carotène (pourcentage d'inhibition) en employant la formule suivante :

$$(\%) = [(A_{A(120)} - C_{C(120)}) / (C_{C(0)} - C_{C(120)})] * 100$$

$A_{A(120)}$: représente l'absorbance en présence de l'extrait à t = 120 mn.

$C_{C(120)}$: représente l'absorbance du contrôle à t = 120 mn.

$C_{C(0)}$: représente l'absorbance du contrôle à t = 0 mn.

4.2.4. Piégeage du radical hydroxyle (OH \cdot)

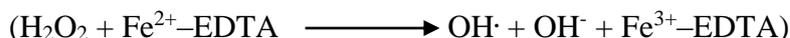
a. Principe

Le OH \cdot Est un radical libre extrêmement réactif formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de Haber Weiss (Castro et Freeman, 2001). Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé, lui permet de réagir avec les lipides, les protéines les polypeptides et l'ADN (Siddhuraju et Becker, 2007).

In vitro, la capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton en mesurant la génération du radical OH \cdot et son effet sur l'oxydation et la dégradation des molécules biologiques telles que le désoxyribose de l'ADN. Dans cette technique le système implique l'auto-oxydation du complexe (Fe²⁺-EDTA) dans un milieu aqueux pour former O₂ \cdot^- , qui est rapidement dismuté en H₂O₂ à pH 7.4.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Après, ce dernier interagit avec Fe^{2+} pour former les radicaux $\text{OH}\cdot$ en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur (réaction de Fenton).



La dégradation du désoxyribose par $\text{OH}\cdot$ dégage certains produits estimés en malonaldéhyde (MDA), d'un chromogène rose lors du chauffage avec l'acide thiobarbiturique et dans un milieu acide. La présence des antiradicaux protège et diminue la production des MDA (Halliwell & *al.*, 1987).

Notant que, le rôle d'ascorbate est la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et cela provoque la réaction de Fenton.



a. *Mode opératoire*

La méthode de désoxyribose adoptée dans cette étude est celle de Halliwell & *al.*, (1987).

Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants :

- ✓ 0.4 ml de la solution tampon phosphate (50 mmol/l, pH = 7.4) ;
- ✓ 0.1 ml de l'extrait ;
- ✓ 0.1 ml de l'EDTA (1.04 mmol/l) ;
- ✓ 0.1 ml de chlorure ferrique (1 mmol/l) ;
- ✓ 0.1 ml de 2-désoxyribose (60 mmol/l).

La réaction est commencée :

- ✓ Par l'addition de 0.1 ml de l'acide ascorbique (2 mmol/l) et 0.1 ml de peroxyde d'hydrogène (10 mmol/l) ;
- ✓ Après incubation à 37°C pendant 1 heure, 1 ml de l'acide thiobarbiturique (10 g/l) est ajouté dans le milieu réactionnel ;
- ✓ Suivi par 1 ml de l'acide chlorhydrique (25%) ;
- ✓ Les mélanges sont placés au bain marie à 100°C pendant 15 min ;
- ✓ L'absorbance des solutions est mesurée à 532 nm ;
- ✓ La capacité du piégeage du radical hydroxyle est évaluée avec le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de 2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles.

Le pourcentage du piégeage est calculé en basant sur la formule suivante:

$$(\%) = [\text{A}_0 - (\text{A}_1 - \text{A}_2)] * 100 / \text{A}_0$$

A_0 : représente l'absorbance du contrôle sans extrait

A_1 : représente l'absorbance après l'addition de l'extrait et de désoxyribose

A_2 : représente l'absorbance de l'extrait sans désoxyribose.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.2.5. Capacité antioxydante totale (CAT)

a. Principe

Cette technique est basée 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 pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) dans un milieu acide.

b. Mode opératoire

La capacité antioxydante totale des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prieto & *al.*, (1999) ;

- ✓ Un volume de 0.4 ml de chaque extrait est mélangé avec 4 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium) ;
- ✓ Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 min ;
- ✓ Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695nm contre un blanc qui contient 4ml de la solution du réactif et 0,4ml de l'eau distillée et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.
- ✓ La capacité antioxydante totale est exprimée en gramme équivalents acide ascorbique par 100g de la matière sèche à partir d'une courbe d'étalonnage.

5. CARACTERISATION DES ACIDES GRAS

La méthode utilisée est la Chromatographie en Phase Gazeuse (C.P.G.).

a. Principe

La chromatographie en phase gazeuse repose sur les mêmes principes que la chromatographie sur papier ou sur couche mince : ce peut être une chromatographie de partage (le plus fréquemment) ou d'adsorption.

La séparation des constituants d'un mélange se fait à chaque niveau, le long d'une colonne tubulaire, par l'affinité différentielle des composants du mélange, entraînés par un éluant : le gaz vecteur, vis-à-vis d'une phase stationnaire. La phase fixe peut être solide : C G S, ou liquide : C G L.

b. Réactifs et matériel

- ✓ NaOH 0,5 mol/l dans le méthanol ;
- ✓ Trifluorure de bore dans le méthanol ;
- ✓ Solution saturée de chlorure de sodium ;
- ✓ Ether de pétrole ;
- ✓ Mélange d'esters méthylés d'acides gras témoins : C12 : 0; C14 :0; C16 :0; C18 : 0; C18 : 1; C18 : 2 ; C18 : 3 ; C20 :0 ;
- ✓ Ballon à saponifier ;
- ✓ Réfrigérant ascendant ;
- ✓ Anneau de lestage ;
- ✓ Ampoule à décanter ;
- ✓ Bain mari 60° C ;

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

- ✓ Plaque chauffante ;
- ✓ Microseringue de 5 µl ;
- ✓ Chromatographe Autosystem XL Perkin Elmer équipé de :

-
- ❖ Gaz vecteur : azote ;
 - ❖ Colonne remplie : DEGS 10 % sur chromosorb W HP 80/100 L 2 m Ø 1/8'' ou colonne capillaire : ELITE WAX Perkin Elmer L 15 m Ø 0,25 mm, phase stationnaire polyéthylène glycol (liquide et polaire) ;
 - ❖ Injecteur pour colonne remplie à injection directe ou injecteur split pour colonne capillaire ;
 - ❖ Détecteur FID.
-

c. Technique

Pour utilisation de la colonne capillaire :

Etape pré-analytique : saponification - estérification

- ✓ Peser dans un ballon à saponifier environ 0,6 g du corps gras à étudier ;
- ✓ Ajouter 5 ml de solution de soude méthanolique ;
- ✓ Adapter le réfrigérant et porter 20 mn au bain-marie à 60° C sous la hotte ;
- ✓ Refroidir ;
- ✓ Ajouter 5 ml de BF₃ méthanol ;
- ✓ Porter à nouveau 20 mn au bain-marie à 60° C toujours sous la hotte ;
- ✓ Transvaser dans une ampoule à décanter, ajouter 30 ml d'éther de pétrole et 20 ml de NaCl saturé ;
- ✓ Agiter vigoureusement puis laisser décanter ;
- ✓ Rejeter la phase aqueuse ;
- ✓ Filtrer la phase organique dans un bécher de 250 ml ;
- ✓ Evaporer sur la platine chauffante à 100°C jusqu'à obtenir une goutte d'huile ;
- ✓ Reprendre par 6 ml d'éther de pétrole ;
- ✓ Filtrer dans un tube à essai ;

Etape analytique : CPG

- ✓ Régler la température injecteur CAP ;
- ✓ Régler la pression du gaz vecteur ;
- ✓ Régler le débit de fuite ;
- ✓ Régler la température du four ;
- ✓ Allumer le détecteur FID ;
- ✓ Injecté la solution ;
- ✓ Parallèlement, injecter le mélange d'esters méthylés d'acides gras témoins dans les mêmes conditions opératoires.

Résultats : Toutes les données sont traitées par le logiciel HPchem de Agilent technologies.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

6. ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les données représentent la moyenne de trois essais. L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application de l'analyse de la variance (ANOVA) et la comparaison des données est prise à la probabilité $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$. Cette application a été assurée par le logiciel Statistica 5.5 (1999).

RESULTATS ET DISCUSSION



III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU

Les résultats ont montré que la teneur estimée en eau pour l'espèce *C. cristatum* est de 60%. La teneur en eau chez les végétaux peut fortement varier jusqu'à atteindre un niveau élevé de déshydratation : c'est la reviviscence. Chez les lichens, cette teneur est généralement de l'ordre de 65% à 90%, toutefois, certaines espèces peuvent vivre avec une teneur de 2%. Il est à signaler que le taux de la photosynthèse dépend largement du niveau d'hydratation des lichens (Pech, 2013).

2. LES DOSAGES

2.1. Teneur en polyphénols totaux

Les résultats de teneur en polyphénols sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/g E), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (Annexe 01).

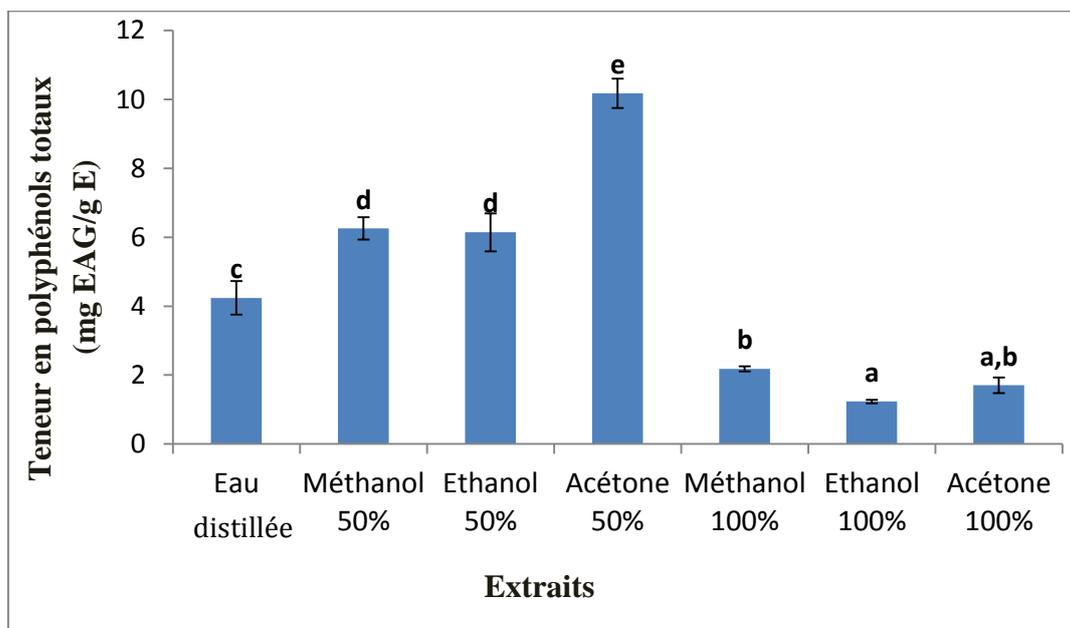


Figure 19: Teneur en polyphénols totaux des extraits de *C. cristatum*

NB : Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($a < b < c < d < e$).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Comme le montre l'histogramme de la figure 19, la teneur la plus élevée en polyphénols totaux a été observée dans l'extrait acétonique aqueux 50% avec une valeur de 10,18 mg EAG/g d'extrait, suivi de l'extrait méthanolique aqueux 50% et de l'extrait éthanolique aqueux 50% de teneurs presque comparables avec des valeurs égales à 6,25 ; 6,14 mg EAG/g d'extrait respectivement. Tandis que, la teneur la plus faible a été obtenue avec l'extrait de l'éthanol pur 100% qui est de 1.23 mg EAG/ g d'extrait, pour les autres extraits, leurs teneurs varient entre 1.70 et 4.24 mg EAG/g d'extrait.

L'étude statistique indique que dans les extraits aqueux 50% nous avons obtenu des teneurs élevées en phénols totaux par rapport aux extraits purs 100% : Ac 50% > MeOH 50% > EtOH 50% > Eau > MeOH 100% > Ac 100% > EtOH 100%. Ceci pourra être expliqué par le fait que le mélange (solvant/Eau) a créé un milieu modérément polaire, ce qui nous a permis non seulement d'extraire les phénols totaux (moins polaires) mais aussi les composés très polaires tels que les phénols totaux glycosylés et les impuretés (comme les glucides et les protéines solubles) qui peuvent interférer dans le dosage.

Par ailleurs, le réactif de folin-ciocalteu utilisé dans ce dosage n'est pas spécifique des polyphénols, car il réagit également avec les protéines, les sucres réducteurs, l'acide ascorbique...ect. De telles interférences peuvent être négligées car ces composés sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (Boizot et Charpentier, 2006).

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

D'après Kumar & al. (2014), le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques de l'espèce *X. mexicana* parmi les autres espèces de lichens (54,39 mg/g). Cette teneur est largement supérieure à celle obtenue dans la présente étude en utilisant le même solvant, dont la teneur est de 2,18 mg/g. En 2014, Grujić & al. ont également reporté des teneurs en polyphénols totaux plus élevées (38.08 mg/g) lors d'une étude sur les extraits méthanoliques de l'espèce *Cetraria islandica*.

Il est possible de constater que les solvants jouent un rôle très important dans plusieurs méthodes d'extraction (Metrouh & al., 2015). En effet, les acides phénoliques très polaires (acide benzoïque et l'acide cinnamique) ne peuvent pas être extraits complètement avec des solvants organiques purs 100%, mais en combinaison avec l'eau. Les substances moins polaires (dérivés d'acide phénolique) ne sont pas isolées quantitativement en utilisant l'eau pure comme solvant d'extraction, par contre c'est le solvant organique pure 100% ou le mélange (solvant organique/eau) qui nous permet d'extraire les composés moins polaires.

L'étude statistique révèle que l'extrait acétonique aqueux 50%, est le plus riche en polyphénols que les autres extraits ce qui réfère le plus probable à la solubilité relative des polyphénols présents dans nos échantillons dans l'acétone aqueux. En fait, la solubilité des polyphénols est gouvernée par le type de solvant utilisé.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium et l'étalon a été la quercétine. Les résultats de teneur sont exprimés en milligramme équivalent de la quercétine par gramme de l'extrait (mg EQ/g E), la courbe d'étalonnage de la quercétine est représentée dans l'annexe 2, elle suit une équation de type : $Abs=15,57C$ sachant que $R^2 = 0,992$

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

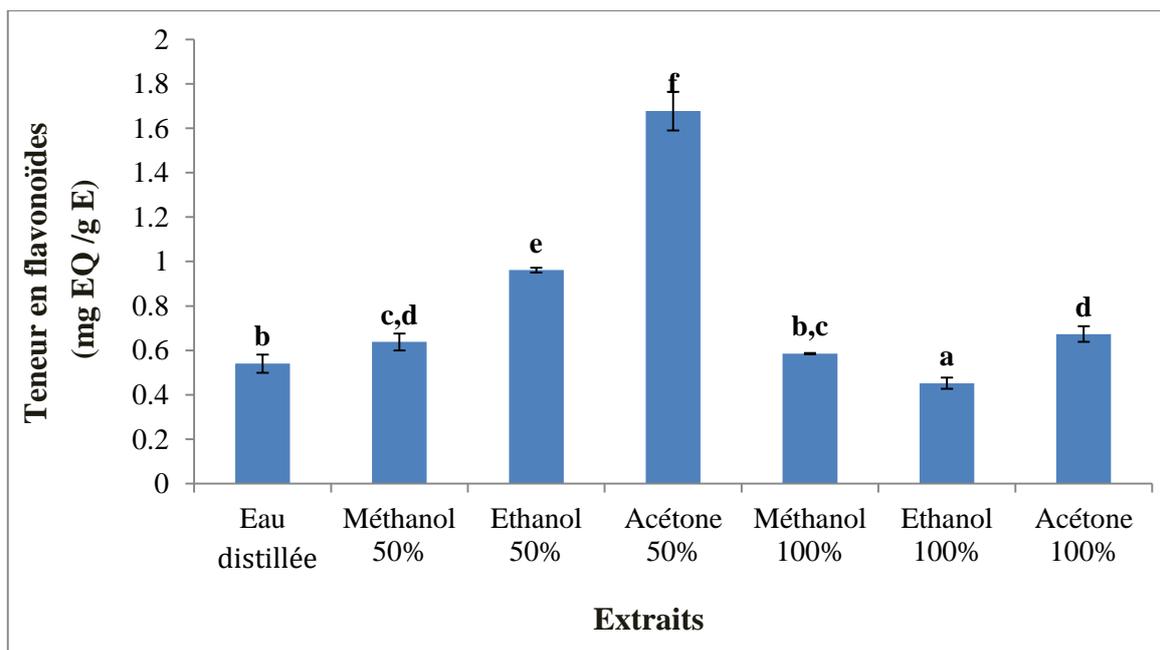


Figure 20 : Teneur en flavonoïdes totaux des extraits de *C. cristatum*

NB : Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($a < b < c < d < e < f$).

Les teneurs en flavonoïdes des extraits purs et aqueux de *C. cristatum* varient selon le solvant d'extraction d'une manière significative ($p < 0,05$) (Figure 20).

Les résultats représentés sur l'histogramme de la figure 20, révèlent que la concentration des flavonoïdes est importante dans l'extrait acétonique aqueux 50% qui est de 1,68 mg EQ/g d'extrait, suivi de l'extrait éthanolique aqueux 50% et de l'extrait acétonique pur 100% avec des valeurs égales à 0,96 ; 0,67 mg EQ/g d'extrait respectivement. Tandis que, la teneur la plus faible a été obtenue avec l'extrait éthanolique pur 100% de valeur 0,45 mg EQ/g d'extrait.

D'après l'étude statistique, ce sont les extraits aqueux 50% qui ont des teneurs élevées en flavonoïdes totaux par rapport aux extraits purs 100%.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Le solvant acétone pur 100% ayant un caractère apolaire permet d'extraire les flavonoïdes apolaires de type aglycone, et le mélange acétone/eau qui est modérément polaire permet d'extraire deux types de flavonoïdes aglycones et glycosylés. Tandis que l'eau qui est polaire, et les solvants méthanol et éthanol purs 100%, les mélanges : méthanol/eau, éthanol/eau permettent d'extraire uniquement les flavonoïdes polaires (flavonoïdes glycosylés). On déduit d'après ces observations que nos échantillons sont riches en flavonoïdes glycosylés (hétérosides) et pauvres en flavonoïdes aglycones.

Suite à une étude menée par Kumar & al. (2014), sur quelques espèces de lichens saxicoles, des teneurs en flavonoïdes égalent à 3,60mg/g et 0,14mg/g ont été trouvés dans l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux respectivement, de l'espèce *X. mexicana*. Ces extraits présentent des teneurs un peu proches en les comparant à celles retrouvées par les mêmes extraits de la *C. cristatum*, dont les teneurs en flavonoïdes étaient de 0,59mg/g et 0,45 mg/g. Par contre les mêmes auteurs rapportent une valeur de 25,81 mg/g obtenue par l'extrait méthanolique lors d'une étude sur une espèce de lichen *Cetraria islandica*. Cette valeur est largement supérieure à celle révélée pour la *C. cristatum* (0,59mg/g).

2.2. Teneur en tanins condensés

Les résultats de teneur sont exprimés en milligramme équivalent de la catéchine par gramme de l'extrait (mg EC/g d'extrait), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de la catéchine (Annexe 3).

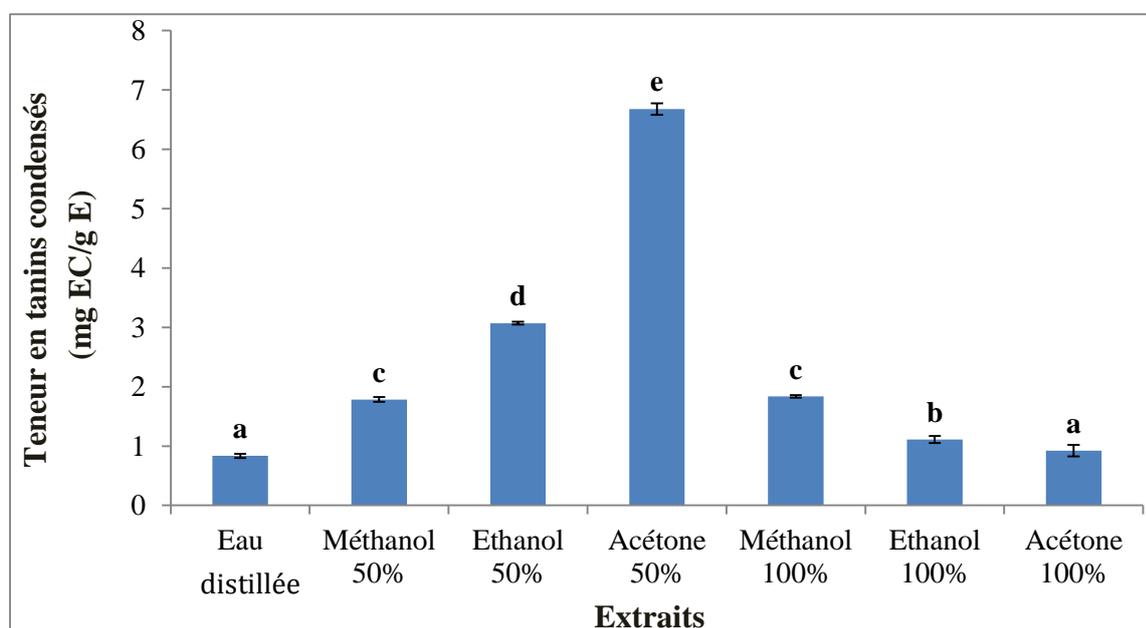


Figure 21: Teneur en tanins condensés des extraits de *C. cristatum*

NB : Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($a < b < c < d < e$).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude statistique montre que les teneurs en tanins condensés des extraits purs et aqueux de *C. cristatum* présentent des différences significatives selon le solvant utilisé ($p < 0,05$) (Figure 21).

Les résultats représentés sur l'histogramme en figure 21, révèlent que l'extrait acétonique aqueux 50% enregistre la teneur la plus élevée en tanins condensés d'une valeur égale 6,68 mg EC /g d'extrait, suivi de l'extrait éthanolique aqueux 50% et de l'extrait méthanolique pur 100% avec des valeurs égales à 3,07 ; 1,84 mg EC /g d'extrait respectivement. En revanche, la teneur la plus faible a été obtenue avec l'extrait aqueux avec une valeur de 0,83 mg EC /g d'extrait.

La grande teneur en tanins condensés observée dans l'extrait acétonique aqueux pourra être expliquée par le fait que le solvant acétone nous a permis d'extraire des tanins de poids moléculaires élevés, et qui sont très solubles dans les solvants moins polaires.

Selon Bruneton (2008), l'extraction des tanins condensés est, en règle générale, réalisée par un mélange d'eau et l'acétone ce qui explique nos résultats.

Les solvants apolaires (tel que l'acétone) sont recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire, tels que les proanthocyanidines Collin et crouzet, (2011).

Une acidification à température plus élevée est parfois utilisée pour libérer certaines formes phénoliques liées : acides hydroxybenzoïque ou hydroxycinnamique, flavonols (Collin et crouzet, 2011).

Pour les proanthocyanidines, l'acidification du mélange acétone/ l'eau augmente l'extractibilité (Collin et crouzet, 2011). Mais l'inconvénient est que l'eau et l'acétone extraient des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors du dosage des tanins. Ainsi, l'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (Chavan & al., 2001).

Kumar & al. (2014), ont étudié les tanins sur différentes espèces de lichens, ils ont trouvé pour l'extrait méthanolique de l'espèce *X. mexicana* une valeur un peu élevée de 4,21 mg/g par rapport à celle de notre étude 1,84 mg/g.

L'étude statistique a montré que les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés présentent des différences significatives ($p < 0,05$) selon le solvant d'extraction utilisé. Cette variabilité de teneurs en composés phénoliques entre les différents extraits est due à la différence de polarité des solvants utilisés et aussi au degré de polarité des composés phénoliques contenus dans nos échantillons de lichens.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3. ACTIVITES ANTIOXYDANTES

3.1. Activité scavenger du DPPH

Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage d'inhibition et sont illustrés dans l'histogramme de la figure 22.

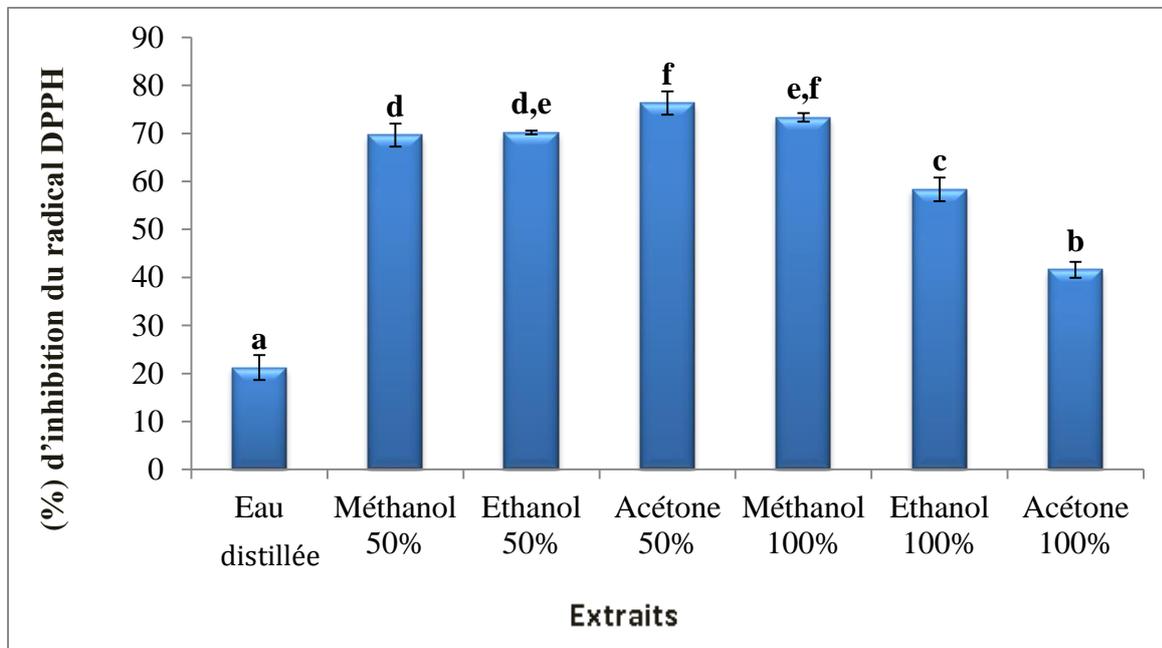


Figure 22: Effet du solvant d'extraction sur l'activité scavenger du radical DPPH des extraits de *C. cristatum*

NB : Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($a < b < c < d < e < f$).

L'étude statistique a révélé une différence significative ($p < 0,05$) de l'activité antiradicalaire contre le DPPH de tous les extraits purs et aqueux de *C. cristatum*. Ce qui signifie qu'ils ont un effet antioxydant.

L'extrait acétonique aqueux montre la meilleure activité antiradicalaire avec une valeur de 76,32 %, suivi de l'extrait méthanolique pur et de l'extrait éthanolique aqueux avec des pourcentages de 73,33% et 70,18% respectivement, ce qui explique la forte activité antiradicalaire. Tandis que l'extrait aqueux (eau) présente la plus faible activité antiradicalaire. La différence de l'activité antiradicalaire entre les différents extraits revient à la différence des constituants solubles contenus dans les extraits.

Kosanić & al. (2011), ont étudié l'activité scavenger du radical DPPH des extraits méthanoliques de cinq espèces de lichens, parmi elles *Lasallia pustulata* qui a révélé un pourcentage de (69.87%), qui reste proche de celui retrouvé pour *C. cristatum* (73,33%), ceci mène à conclure que les deux espèces représentent équitablement une meilleure activité contre le DPPH.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.2. Le Pouvoir réducteur

Les résultats du pouvoir réducteur des différents extraits sont exprimés en densité optique (DO) illustrés dans l'histogramme de la figure 23.

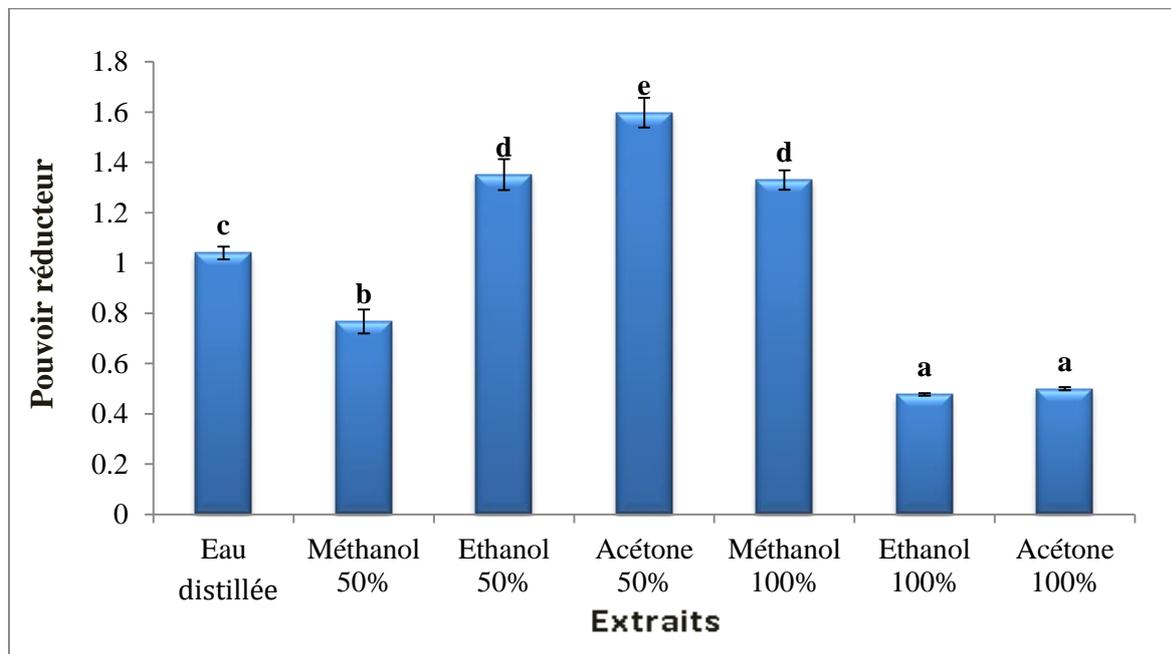


Figure 23: Effet du solvant d'extraction sur le pouvoir réducteur des extraits de *C. cristatum*
NB : Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($a < b < c < d < e$).

Les extraits obtenus ont des pouvoirs réducteurs significativement différents selon le solvant d'extraction ($p < 0,05$) (Figure 23). Les résultats montrent que tous les extraits possèdent la capacité pour réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}).

L'analyse statistique montre que les plus forts pouvoirs réducteurs pour tous les extraits sont obtenus en utilisant l'extrait acétonique aqueux qui est de densité optique maximale 1,598 ; suivi des extraits : Ethanol 50% et méthanol 100% avec des valeurs de densité optique presque comparables de 1,352 ; 1,330 respectivement. Les autres extraits ont présenté des valeurs faibles qui ne dépassent pas une densité optique de 0,7.

Dans l'étude effectuée sur une espèce de lichens *Cetraria islandica* par Grujić & al. (2014), les extraits méthanoliques ont montré le meilleur pouvoir réducteur avec une absorbance de 0,45 ; comparant à celle de *C. cristatum* 1,33 Abs, Ceci pourrait être expliqué par le fait que nos extraits contiennent des quantités supérieures en composés antioxydants. Par ailleurs, les résultats obtenus par Kosanić & al. (2011), sur le pouvoir réducteur des espèces de lichens : *Cladonia furcata*, *Hypogymnia physodes*, *Lasallia pustulata*, *Parmelia caperata* et *Parmelia sulcata*, avec l'extrait méthanolique varient de 0,012 à 0,086 Abs; comparant à notre espèce *C. cristatum* avec le même solvant d'extraction de densité optique 1,33. Donc cela confirme que *C. cristatum* représente le meilleur pouvoir réducteur.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.3. Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

Les résultats de blanchiment de β -carotène sont exprimés en tant que pourcentage d'inhibition et ils sont illustrés dans l'histogramme de la figure 24.

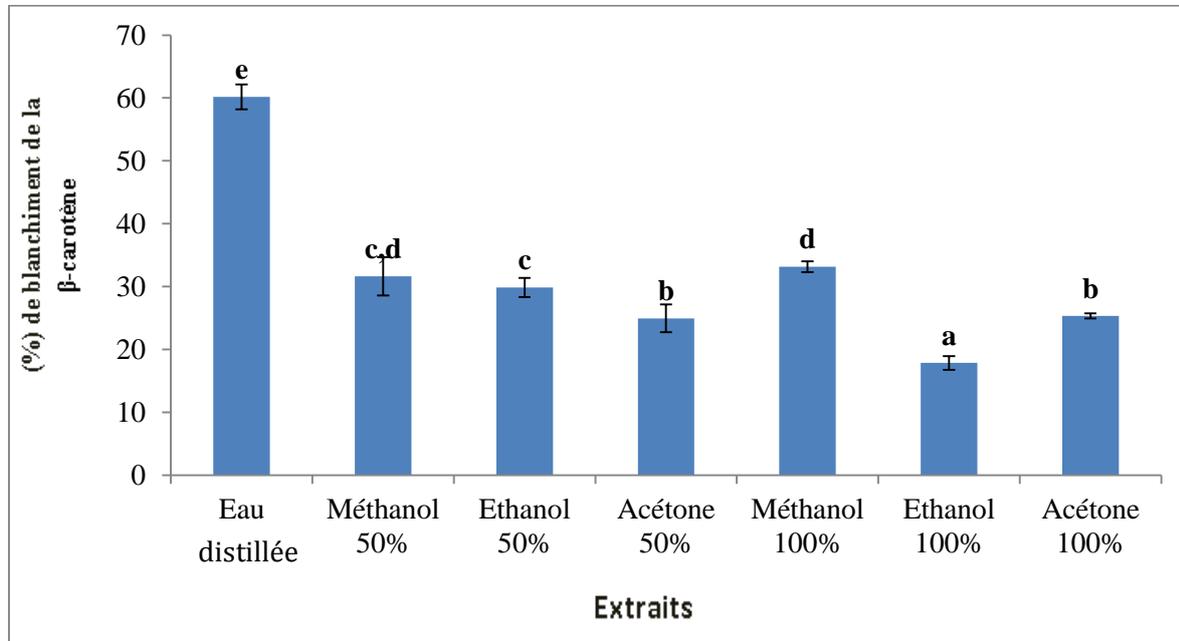


Figure 24 : Effet du solvant d'extraction sur l'activité de blanchiment de β -carotène des extraits de *C. cristatum*

NB : Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($a < b < c < d < e$).

Les résultats de l'inhibition de blanchiment de la β -carotène par les extraits de *C. cristatum* présentent des différences significatives selon le solvant d'extraction utilisé ($p < 0,05$) (Figure 24).

Tous les extraits testés inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. L'effet inhibiteur maximal est observé dans l'extrait aqueux (eau) de valeur 60,15%. Ce qui indique que c'est l'extrait aqueux qui présente la plus forte activité de blanchiment par rapport aux autres extraits donc il est plus riche en antioxydants polaires, suivi des extraits méthanoliques purs et aqueux de pourcentages presque comparables 33,16% ; 31,64%. En revanche, l'activité la plus faible est obtenue avec l'éthanol pur de valeur 17,86%.

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchiment du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006).

D'après les résultats obtenus par l'étude effectuée par Belyagoubi, (2011) sur le test de blanchiment de β -carotène, de dix (10) plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien (*Pistacia atlantica*, *Thymelaea microphylla*, *Marrubium deserti*, *Atriplex halimus*,

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Anabasis articulata, *Helianthemum lippii*, *Zygophyllum album*, *Cotula cinerea*, *Pentzia monodiana* et *Inula montana*, *H. lippii*), se révèle une puissante activité de l'ordre de 97.647% qui est fortement élevée par rapport celle noté pour notre espèce *C. cristatum* (60,15%).

3.4. Activité de scavenger du radical hydroxyle OH

Les résultats sont exprimés également en termes de pourcentage dans l'histogramme de la figure25.

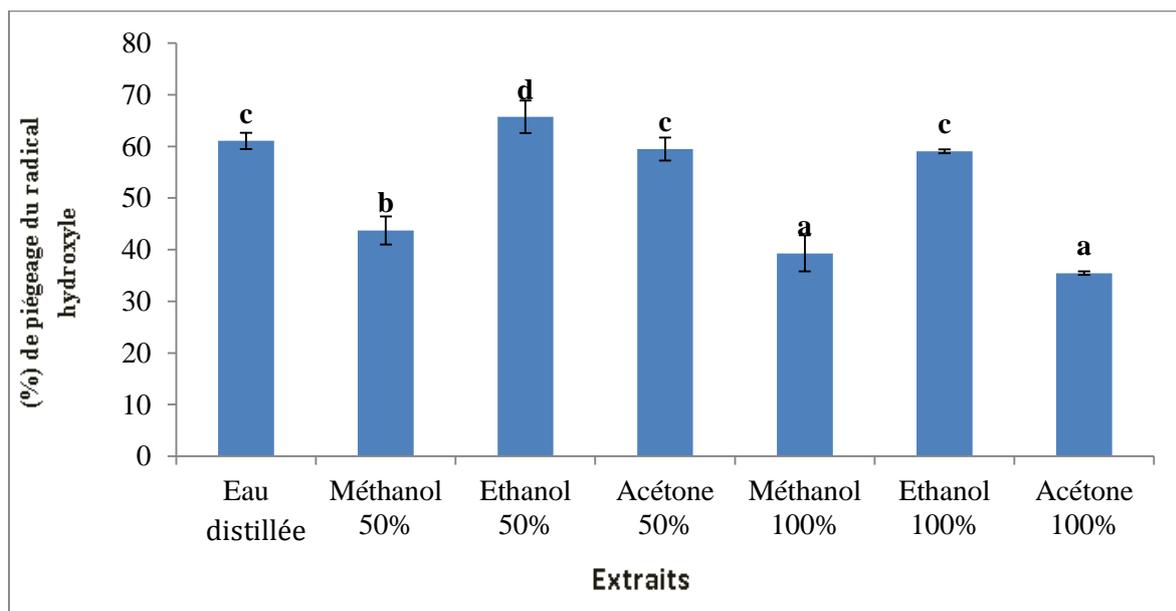


Figure 25: Effet du solvant d'extraction sur l'activité de piégeage du radical hydroxyle (OH) des extraits de *C. cristatum*

NB : Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($a < b < c < d$).

Les résultats obtenus révèlent que tous les extraits ont la capacité de piéger le radical hydroxyle avec des différences significatives ($p < 0,05$) (Figure25). C'est l'extrait éthanolique aqueux qui présente la meilleure activité parmi les autres extraits de valeur 65,72%, suivi de l'extrait aqueux qui enregistre un pourcentage de 60,07%. Tandis que l'extrait acétonique pur présente une faible activité de valeur 35,43%.

Les autres extraits à savoir l'acétone 50% et l'éthanol 100% possèdent presque une même activité représentant des pourcentages presque comparables de 59,47% ; 59,04 respectivement.

Dans l'étude effectuée sur dix (10) plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien par Belyagoubi. (2011), il a été révélé que tous les extraits présentent une activité à piéger le radical hydroxyle supérieure à 35.60% dont la meilleure activité est d'un pourcentage égal à 82.41 %, qui est plus important que celui de notre espèce (65,72%).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.5. Activité antioxydante totale (CAT)

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de l'extrait (mg EAA/ g extrait), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide ascorbique (Annexe 4).

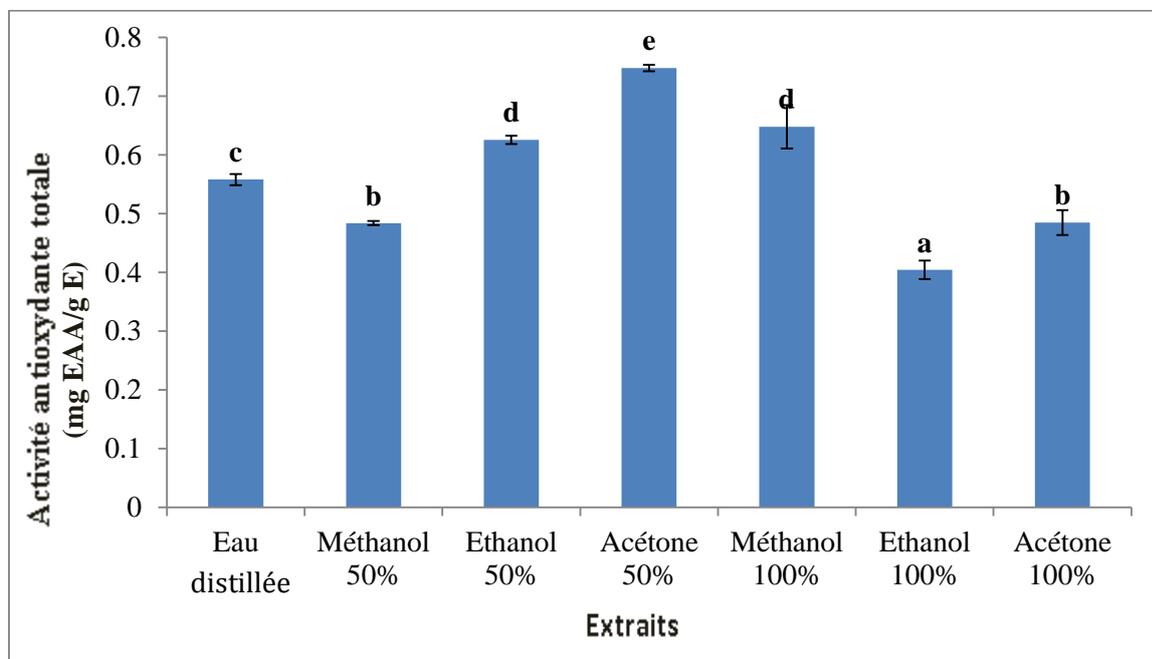


Figure 26: Effet du solvant d'extraction sur l'activité antioxydante totale (CAT) des extraits de *C. cristatum*

NB : Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($a < b < c < d < e$).

La Figure 26 montre que tous les extraits présentent des activités antioxydantes significativement différentes ($p < 0,05$). D'après l'analyse statistique l'extrait acétonique aqueux possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de 9,11 (mg EAA / g d'extrait), suivi de l'extrait méthanolique pur et de l'extrait éthanolique aqueux de l'ordre de 7,81 ; 7,52 (mg EAA / g d'extrait). En revanche, l'extrait qui montre la plus faible activité antioxydante totale est l'extrait éthanolique pur avec une valeur égale à 4,63 (mg EAA / g d'extrait).

D'après les résultats obtenus par l'étude effectuée par Belyagoubi, (2011) sur l'activité antioxydante totale (CAT) de dix (10) plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, l'extrait méthanolique des fruits de *P. atlantica* (PAF) possède la meilleure capacité antioxydante totale de l'ordre de 45.516 mg EAA/g. En la comparant à celle obtenue par notre étude 7,81 mg EAA/g ; cette activité est restée à juger très faible.

L'activité antioxydante de certains lichens a été étudiée par d'autres chercheurs, par exemple, Rankovic & al. (2011), qui ont démontré que les extraits de lichen de *Lecanora atra*, *Cladonia furcata* et *Lecanora muralis* ont une forte activité antioxydante.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Les capacités antioxydantes des extraits de lichen sont dépendantes du type de l'espèce et de la polarité du solvant d'extraction (Kumar & *al.*, 2014).

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée par d'autres auteurs sur les activités antioxydantes des extraits de l'espèce *C. cristatum*.

4. CORRELATIONS ENTRE LES DOSAGES ET LES ACTIVITES

L'analyse des résultats révèle l'existence d'une très bonne corrélation entre le pouvoir réducteur et les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes, et en tanins condensés de *C. cristatum*, dont les coefficients sont : 0,68 ; 0,69 et 0,75 respectivement. En outre, une très bonne corrélation (0,95) a été constatée entre le pouvoir réducteur et l'activité antioxydante totale (CAT) (Annexe 5).

Aucune corrélation n'a été révélée entre le pouvoir antiradicalaire (DPPH) et la teneur en composés phénoliques, alors qu'une corrélation (0,47) existe entre la teneur en flavonoïdes et le pouvoir antiradicalaire (DPPH), de même qu'entre le test du pouvoir réducteur et le pouvoir antiradicalaire (DPPH) (0,45). Quant aux tanins condensés, Ils présentent une bonne corrélation significative avec le pouvoir antiradicalaire (DPPH) dont le coefficient de corrélation est égal à 0,60 (Annexe 5).

Les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes, et en tanins condensés présentent une très bonne corrélation significative avec l'activité antioxydante totale (CAT) ; les coefficients de corrélation sont de 0,68 ; 0,77 et 0,79 respectivement. Tandis que, la corrélation est absente entre l'activité antioxydante totale (CAT) et les autres activités antioxydantes (DPPH ; OH ; β -carotène) (Annexe 5).

L'analyse des corrélations entre les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes, et en tanins condensés et l'inhibition de blanchiment de la β -carotène ; n'a révélé aucune corrélation significative. Cependant, une très bonne corrélation, d'un coefficient égale à 0,73, est constatée entre β -carotène et les extraits, et il ya également une bonne corrélation (0,64) entre le pouvoir antiradicalaire et β -carotène (DPPH) (Annexe 5).

Les résultats de piégeage du radical hydroxyle ne montrent pas de corrélation avec les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes, et en tanins et même avec les autres activités antioxydantes. Tandis qu'il présente une corrélation moyenne avec les extraits, dont le coefficient est de 0,46 (Annexe 5).

L'effet antioxydant des différents extraits de *C. cristatum* peut être dû aux composés phénoliques, notamment les flavonoïdes qui ont une grande capacité à piéger les radicaux libres (Ghedira & *al.*, 2005).

La très bonne corrélation entre l'activité antioxydante totale (CAT) et le pouvoir réducteur pourra être expliqué par le fait que les mêmes composés antioxydants à savoir : les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins condensés présents dans les extraits de *C. cristatum*, qui ont abouti à ces activités.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

5. COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Les acides gras de la *C. cristatum* ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention à ceux du témoin. D'après l'analyse du chromatogramme obtenu (Figure 27), on constate qu'il existe six acides gras, qui sont :

- ✓ L'acide palmitique (C16:0) ;
- ✓ L'acide linoléique (C18:2) ;
- ✓ L'acide linoléique (C18:3) ;
- ✓ L'acide arachidique (C20:0) ;
- ✓ L'acide laurique (C12:0) ;
- ✓ L'acide myristique (C14:0).

Les résultats concordent avec ceux obtenus par les études précédentes réalisées par Temina et ces collaborateurs (2010), qui ont trouvés que *C. cristatum* contient plusieurs classes d'acides gras dont les plus abondants ;

- ✓ L'acide linoléique (C18:3) ;
- ✓ L'acide oléique (C18:1) ;
- ✓ L'acide palmitique (C16:0).

De plus, des études ont été réalisées sur d'autres espèces de lichens du genre *Collema* telles que : *C. flaccidum*, *C. fuscovirens*, *C. cristatum* et *C. callopismum*. Les résultats ont révélé que ces espèces contiennent presque les mêmes acides gras parmi eux ceux qui sont saturés : C12:0, C13, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, et ceux qui sont insaturés : C15:1, C16:1, C20:1, C18:1, C16:2, C18:2, C20:2, C16:3, C18:3 (Vu, 2014).

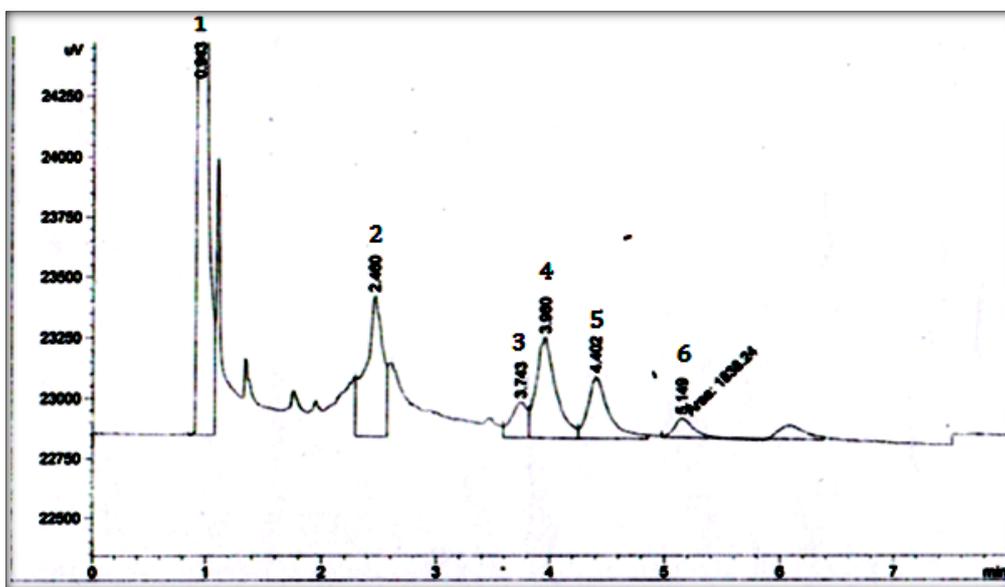


Figure 27 : Chromatogramme de la composition en acides gras de la *C. cristatum* obtenu par une CPG.

1/ C20:0 ; 2/ C18:2 ; 3/ C18:3 ; 4/ C16:0 ; 5/ C14:0 ; 6/ C12:0

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a été consacrée aux dosages de quelques antioxydants à savoir : les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins condensés, de l'espèce du lichen *Collema cristatum* récoltée dans la région de Bejaïa, après leur extraction en utilisant plusieurs solvants de différentes polarités, ainsi qu'à l'évaluation des activités antioxydantes et caractérisation préliminaire des acides gras des extraits obtenus.

L'étude statistique a montré que l'acétone aqueux 50% est le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques, les flavonoïdes, et les tanins condensés (10,18 mg/g ; 1,68 mg/g ; 6,68 mg /g) respectivement.

L'extrait à l'acétone 50% a présenté le plus fort pouvoir réducteur (1,598 Abs), et un important potentiel antioxydant vis-à-vis du DPPH (76,32%), et également la meilleure activité antioxydante totale (9,11 mg/g) pour l'échantillon de l'espèce étudiée.

Le blanchiment de β -carotène par les extraits de *C. cristatum* a révélé que l'extrait aqueux a présenté la meilleure capacité (60,15% d'inhibition).

Les résultats de piégeage du radical hydroxyle indiquent que l'extrait éthanolique aqueux 50% de l'espèce étudiée a la plus forte activité inhibitrice du OH (65,72%).

Les résultats indiquent que l'extraction au moyen de différents solvants affecte la teneur en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes, et en tanins condensés, et l'activité antioxydante.

L'étude réalisée sur les corrélations entre les teneurs en composés et les différents tests de l'activité antioxydante testés, nous a permis d'aboutir aux résultats suivants :

- ✓ L'existence d'une très bonne corrélation entre les trois activités : pouvoir réducteur, l'activité antiradicalaire DPPH et l'activité antioxydante totale CAT, avec les teneurs en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes, et en tanins condensés ;
- ✓ Ces mêmes teneurs présentent une très bonne corrélation avec l'activité antioxydante totale et le pouvoir réducteur ;
- ✓ Présence d'une corrélation linéaire entre les teneurs en flavonoïdes, et en tanins condensés et l'activité antiradicalaire DPPH ;
- ✓ Aucune corrélation linéaire n'a été établie entre les deux activités : l'activité inhibitrice du blanchiment de β -carotène et le test du piégeage du radical hydroxyle avec les teneurs en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

L'identification chromatographique menée sur l'espèce étudiée a permis de caractériser six acides gras à savoir : l'acide palmitique (C16:0) ; l'acide linoléique (C18:2) ; l'acide linolénique (C18:3) ; l'acide arachidique (C20:0) ; l'acide laurique (C12:0) ; l'acide myristique (C14:0).

Les résultats de la présente étude montrent que l'espèce *Collema cristatum* pourrait être considérée comme une source d'antioxydants naturels pour des fins médicinales.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En perspectives, ces résultats restent partiels, donc il serait intéressant de caractériser et d'identifier les antioxydants à savoir : les composés phénolique contenus dans les extraits et également d'étudier les possibles activités biologiques des extraits de *Collema cristatum* afin de mettre en évidence d'éventuelles activités : anti-inflammatoire, antimicrobienne et cytotoxique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Akowauh, G.A., Zhari, I., Norgyati, I., Sadikun, A., Khamsah, S.M. (2004). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, 87: 559-566.

Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. (2007). Antioxydant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. *Food chemistry*. 102:1233-1240.

B

Bahorun, T. (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiass*, Edition Mauritiuss, 133. 83- 94.

Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A., Aruoma, O.I. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science and Food and Agriculture*, 84:1553–1561.

Bates, S.T., Cropsey, G.W., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N. (2011). "Bacterial communities associated with the lichen symbiosis". *Appl Environ Microbiol*, 77:1309-1314.

Belyagoubi, N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat en biologie. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 166 p.

Benbrook, M. (2005). Accroître la teneur antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. *Ed. The organic center* : 6-8.

Berger, M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 48-53.

Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006). *Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier*. Le Cahier des Techniques de l'Inra. 79-82 p.

Bougatef, A. Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and Nasri, M. (2009). Antioxydant and free radical-scavenger activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114 :1198-1205.

Boullard, B. (1990). *Guerre et paix dans le règne végétal*. Broché. 336 p.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2^{ème} édition, Lavoisier, Paris. 915 p.

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

Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., Swinnen, J.V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *The journal of biological chemistry*, 280: 5636-5645.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Büdel, B., Scheidegger, C. (2008). Thallus morphology and anatomy. In: *Nash III TH*, editor. *Lichen biology*. Cambridge University Press. 40–68 p.

C

Carolyn, W., Harris. (1904). The Bryologist . *American Bryological and Lichenological Society* Vol. 7, No. 3. 45-48.

Castro, L., Freeman, B.A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*. 170: 161-165.

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

Chew, Y-L., Goh, J-K., and Lim, Y-Y. (2009). Assessment of in vitro antioxydant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem*. 116: 13-18.

Chira, K., Suh, J.H., Teissedre, P.I. (2008). Les polyphénols du raisin : *Phytothérapie*. 6 :75-82.

Collin, S., Crouzet, J. (2011). *Polyphenols et procedes : Transformation des polyphenols au travers des procedes appliques a l'agro- alimentation*. Ed.Tec&Doc Lavoisier. 337 p.

Conti, M.E., Cecchetti, G. (2001). Biological monitoring: lichens as bio-indicators of air pollution assensment- a review. *Environmental Polluion*, 114: 471-492.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence Structure and Role in the Human Diet*. Ed. Blackwell Publishing Ltd. 384 p.

D

Defraigne, J.O., Pincemail, J. (2007) : Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liege*, 62 (4) : 1-10.

Delattre, J. Beaudoux, J.L. Bonnefont-Rousselot, D. (2007). *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques*. Éditions Médicales internationals. 587 p.

Dembitsky, V.M. (1992). *Lipids of lichens*. *Prog Lipid Res*. 31: 373–397 p.

Dertien, B.K., De Kok, L.J., Kuiper, P.J.C. (1977). *Lipid and Fatty acid composition of Tree-growing and Terrestrial lichens*. *Physiol Plant*. 40: 175–180 p.

E

Edenharder, R., and Grünhage, D. (2003). *Free radical scavenging abilities of flavonoïds as mechanism of protection against mutagenecity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide typhimurium TA102*. *Mutation Research*. 540, 1-18 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

F

- Favier, A.** (2003). Le stress oxydant : Intéret conceptuel et expérimental dans la des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Favier, A.** (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.*, 64: 390-396.
- Friedl, T., Brüdel, B.** (2008). Photobiont. In: *Nash III TH*, editor. Lichen biology. Cambridge University Press. 10–26 p.
- Fortin, J.** (2007). *Les plantes : Comprendre la diversité du monde végétal*. Editions Québec inc. Montréal, Canada. 128 p.
- Garrett, R.H., Grisham, C.M.** (2000). *Biochimie*. 3eme édition. De Boeck (ed), 1292 p.
- Ghedira, K.** (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother.* 3: 162-169.
- Gravot, A.** (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 –L2.
- Guignard, J.L.** (2000). *Biochimie végétale*, 2éme édition. Ed Dunod, Paris, 169p.
- Grujić, D., Stosić, I., Kosanic, M., Stanojkovic, T., Rankovic, B., Milosević-Djordjevic, O.** (2014). Evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. *Cytotechnology*, 66:803–813.

H

- Hagerman, A.E.** (2002). *Tannin Chemistry: Condensed Tannin Structural Chemistry*. Tannin Handbook. Miami University. 116 p.
- Hagerman, A.E.** (2002). *Tannin Chemistry: Hydrolyzable Tannin Structural Chemistry*. Tannin Handbook. Miami University. 116 p.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Aruoma, O.I.** (1987). The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical biochemistry*, 165: 215-219.
- Halliwell, B.** (1994). Free radicals and antioxidants. *Nutr.Rev.*, 52:253-265.
- Hanus, L.O., Temina, M., Dembitsky, V.** (2008). Biodiversity of the chemical constituents in the epiphytic lichenized ascomycete *Ramalina lacera* grown on difference substrates *Crataegus sunaicus*, *Pinus halepensis*, and *Quercus calliprios* . *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 152: 203–208.
- Haug, D., OuB, Prior, R.L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J.Agric.Chem.* 53:1841-1856.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Havsteen, B., H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 96(2-3):67-202.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, Sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1 : 3-6.

Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale*. Ed De boeck. 532 p.

Hua Li, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, Hua Wang. (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6): 67-73.

Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86:559–570.

J

Jacques, B., André, R. (2004). *Biochimie métabolique*. Ed ellipses .Paris. 217-219-220-223-225 p.

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

K

Karthikai Devi, G., Anantharaman, P., Kathiresan, K., Balasubramanian, T. (2011). Antimicrobial activities of the lichen *Roccella belangeriana* (Awasthi) from mangroves of Gulf of Mannar. *Indian J. Geo-Marine Sci*, 40: 449–453.

Kosanić, M., Ranković, B., Vukojevi, J. (2011). Antioxidant properties of some lichen species. *J Food Sci Technol*, 48(5):584–590.

Kroyer, G., Hegedus, N. (2001). *Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement*. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 2, 171-174 p.

Kumar, J., Dhar, P., Tayade, A.B., Gupta, D., Chaurasia, O.P., Upreti, D.K., Arora, R., Srivastava, R.B. (2014). Antioxidant capacities, phenolic profile and cytotoxic effects of saxicolous lichens from trans-Himalayan cold Desert of Ladakh. *PLOS One*, 9(6): e98696.

L

Lange, O.L., Green, T.G.A., Heber, U. (2001). Hydration-Dependent Photosynthetic Production of lichens. *Journal of Experimental Botany*, 52 (363): 2033-2042.

Le cren, F. (2012). *Les antioxydants*. 3^{ème} édition. Editions Quebecor. 223 p.

Leclerc, V., Floch, J., V. (2010). *Les secrets des algues*. Editions Quae. 167 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liang, N., Kitts, D.D. (2014). Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19(11):19180-19208.

Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006). Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 477-485.

Lutzoni, F., Miadlikowska, J. (2009). Lichens. *Current Biology*, 19: 502–503.

M

Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S. (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1): 3-8.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphénols: Food sources and bioavailability. *American journal of clinical nutrition*, 79: 727-747.

Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P. and Stanojković, T. (2012). Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*.19, 1166–1172.

Martins, S., Mercado, D., Mata-Gómez, M., Rodriguez, L., Aguilera-Carbo, A., Rodriguez, R., Aguilar, C.N. (2010). Microbial Production of Potent Phenolic-Antioxidants Through Solid State Fermentation. In: **Singh, M.V., .Steven, H** *Sustainable Biotechnology: Sources of Renewable Energy*. USA, 229-246 p.

Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*.77: 147-161.

Metrouh-Amir, H., Catarina, M.M., Duarteb,C., Maiza,F. (2015). Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, andantibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Industrial Crops and Products*, (67): 249–256.

Mitrovic, T., Stamenkovic, S., Cveykovic, V., Tosic, S., Stankovic, M., Radojevic, I., Stefanovic, O., Comic, L., Dacic, D., Curcic, M., Markovic, S. (2011). Antioxydant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of five lichen Species. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 5428-5448.

Molnári, K., Farkas, E. (2010). Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites. *Z Naturforsch C.*, 65(3-4):157-173.

Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimation antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, 26(2): 211-219.

Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., et Surbled, M. (1998). *Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle*. Ed. INRA, paris (les colloques, N°87).

Monica, A.G., Otalora, Per, M. Jorgensen. Mats, W. (2014). A revised generic classification of the jelly lichens, collemataceae. *Fungal Diversity*. 64 : 275-293.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Moussard, C. (2006). *Biochimie structurale et métabolique*. 3^{ème} éd. De boeck & Larcier s.a. Belgique. 352 p.

N

Nacz, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr.A* 1054: 95-111.

Nash III, T.H. (2008). Lichen Biology. In: *Nash III TH*. 2nd ed. editor Cambridge University Press.

Nash III, T.H. (1996). Nutrients influences elemental accumulation of minerais cycling. In: *lichen bio/ogy, Nasch III T.H* (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 136-153 p.

O

Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* 44 : 307-315.

P

Pastre, J., Priymenko, N. (2007). Intérêt des antioxydants de l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Med. Vet.* 158(4): 180-189.

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

Pietta, P.G. (2000). Flavonoïds as antioxydants. *Journal of Naturals products*, 63: 1035-1042 p.

Pincemail, J. (2014). "Stress oxydant et Antioxydants : Revue critique des processus d'action des antioxydants" .Editions Marco Pietteur. 286 p.

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

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001). Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. *ISBN*, 18: 5573-463.

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

Prieto, P., Pineda, M., Anguilar, 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

R

Ranković, B., Kosanić, M.M., Stanojković, T.P. (2011). Antioxidant antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11:97.

Ranković B. (2015). *Lichen Secondary Metabolites Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Springer International Publishing. 180 p.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2000). *Biologie végétale*. 1re Ed. Deboeck. Paris. 944 p.

Rebbas, K., Boutabia, L., Touazi, Y., Gharzouli, R., Djellouli, Y., Alatou D. (2011). Inventaire des lichens du parc national de Gouraya (Béjaïa, Algérie). *Phytothérapie*, 9,4 : 225-233.

Reboreau-Gayon, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod Editeur, Paris. (English translation, 1972. Hafner Publishing Co., New York. 254 p.

Reis, R.A., Iacomini, M., Gorin, P.A.J., Mera-Souza, L., Grube, M. (2005). Fatty acid composition of the tropical lichen *Teloschistes flavicans* and its cultivated symbionts. *FEMS Microbiol Lett.* 247: 1–6.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure -Antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956.

S

Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sciences and Technology International*, 8(3): 121-137.

Shankar, S., Srivastava, R.K. (2012). *Nutrition: Diet and cancer*. 626 p.

Shimizu, H. (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population the Hisayama study. *Stroke*, 35 (9): 2072-2077.

Shukla, V., Pant Joshi, G., Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry*, 9:303-314.

Siddhuraju P., Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L.) see extracts. *Food Chem.* 101: 10-19.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 16: 144-158.

Solberg, Y. (1987). Chemical constituents of the lichens *Cetraria delisei*, *Lobaria pulmonaria*, *Stereocaulon tomentosum* and *Usnea hirta*. *Journ Hattorio Bot Lab.* 63: 357–366.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Stocker-Wörgötter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat Prod Rep*, 25:188–200.

Sun, T., Ho, C.T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food chemistry*, 90:743–749.

Suty, L. (2015). *Les végétaux: Des symbioses pour mieux vivre*. Ed Quae. Paris. 56p.

Swain, T., Hillis, W.E. (1959). The phenolics constituents of prunus domestica I. The quantitative analysis of phenolics constituents. *J. sci. Food AGRIC*, 10: 63-68.

T

Tanguy, M. Begué-Simon, A.M. (2009). Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation. *Médecine*, 5 (6):256-260.

Temina, M., Levitsky, D.O., Dembitsky, V.M. (2010). Chemical Constituents of the Epiphytic and Lithophilic Lichens of the Genus Collema. *Rec Nat Prod*. 1: 79–86.

Torres, A., Dor, I., Rotem, J., Srebnik, M., Dembitsky, V.M. (2003). Characterization of surface n-alkanes and fatty acids of the epiphytic lichen Xanthoria parietina, its photobiont a green alga Trebouxia sp. and its mycobiont, from the Jerusalem hills. *Eur J Biochem*. 2125: 2120–2125.

Tsimogiannis, D.I. and V. Oreopoulou. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3'4'-hydroxyl substituted members. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 7: 140-146.

U

Unten, L., Koketsu, M., Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on beta-carotene. *J Agric Food Chem.*, 45: 2009-2012.

V

Van Haluwyn, C., Asta, J., Boissière, J-C., Clerc, P., Gavériaux, J-P. (2012). *Guide des lichens de France: lichens des sols*. Paris : Ed Belin. 240 p.

Van Haluwyn, C., Asta, J., Gavériaux, J.P. (2009). *Guide des lichens de France : lichens des arbres*. Paris : Ed Belin. 231p.

Vu, T.H. (2014). Etude des acides gras du genre *Stereocaulon* Etude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe. Thèse de doctorat en chimie. Université de Rennes. 325 p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Y

Yamamoto, Y., Hara, K., Kawakami, H., Komine, M. (2015). Lichen Substances and Their Biological Activities. In: Upreti D.K. & al. *Recent Advances in Lichenology*. 181-199 p.

Yamamoto, Y., Watanabe, A. (1974). Fatty acid composition of lichens and their phyco- and mycobionts. *J. Gen Appl Microbiol*, 86: 83–86.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59: 113-122.

Sites Internet :

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Lichen>

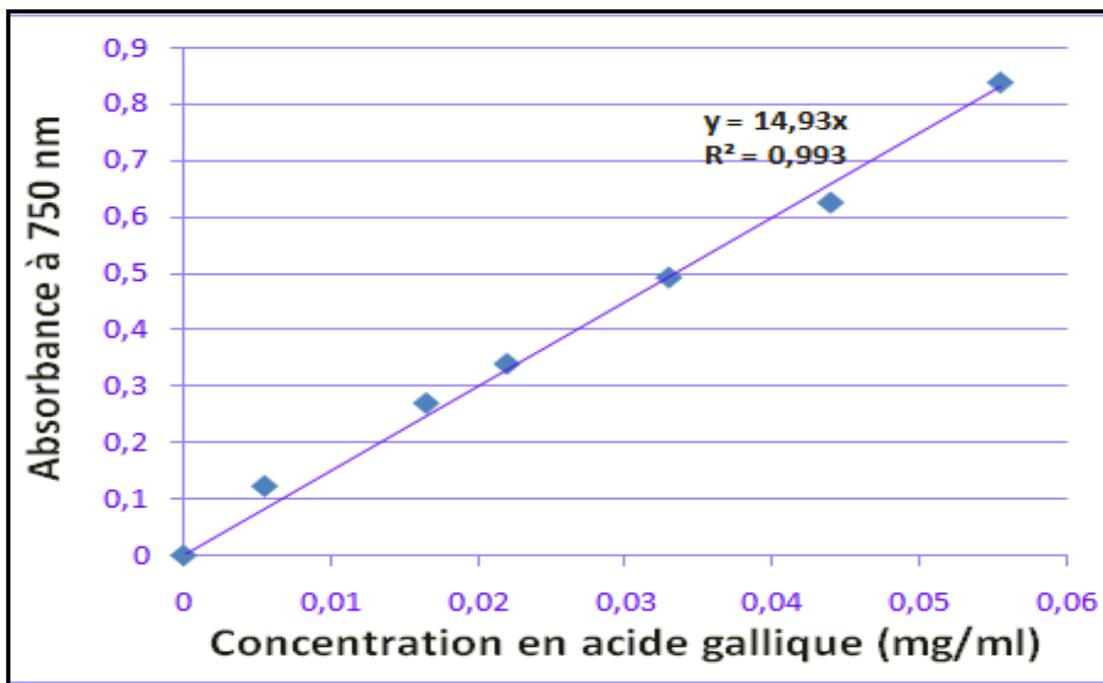
<http://www.discoverlife.org/20/q?search=Collema+cristatum>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Collema>

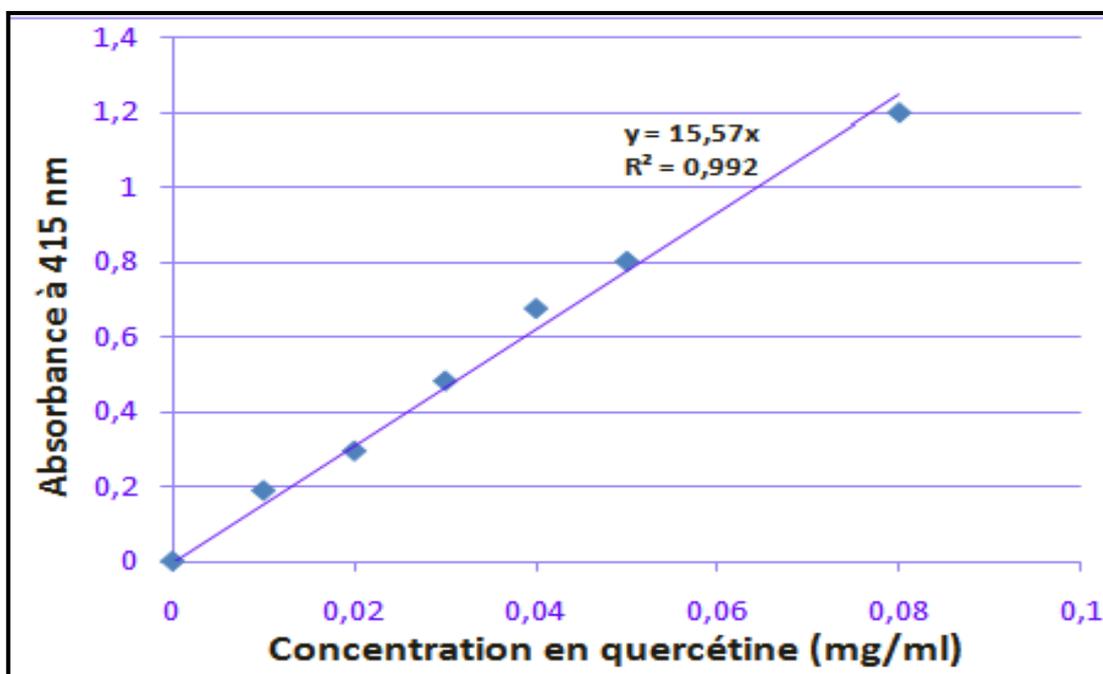
<http://www.afl-lichenologie.fr/>

ANNEXES

ANNEXES

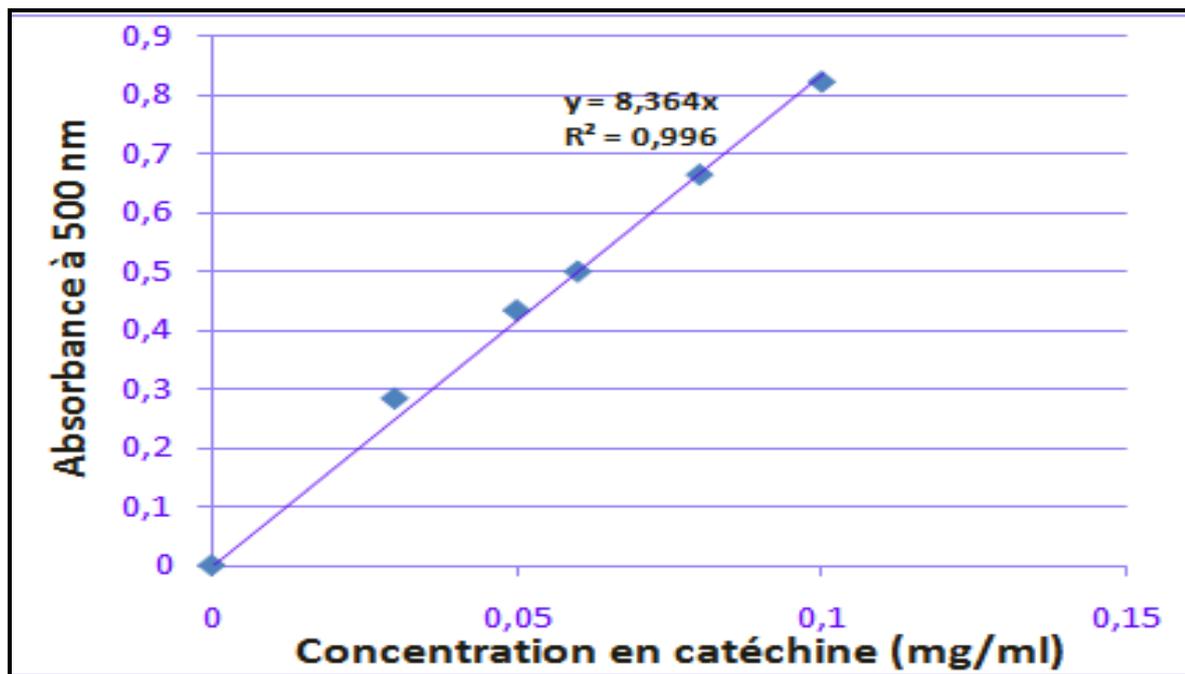


Annexe I : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

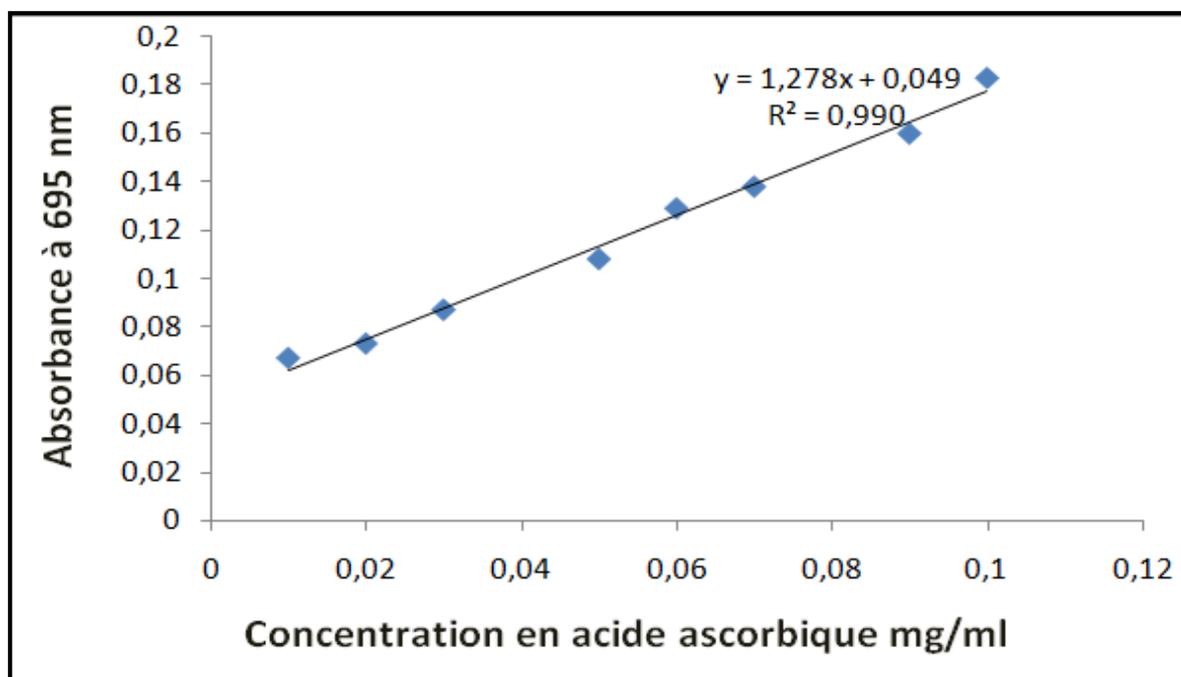


Annexe II: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

ANNEXES



Annexe III : Courbe d'étalonnage de la Catéchine pour le dosage des tanins condensés.



Annexe IV: Courbe d'étalonnage de l'activité antioxydante totale

ANNEXES

	EXTRAITS	CP	FLA	TC	CAT	PR	AAR DPPH	AAR OH	B_CARO
EXTRAIT	1								
CP	-0,52**	1							
FLA	-0,06	0,85***	1						
TC	-0,09	0,86***	0,97***	1					
CAT	-0,23	0,68***	0,77***	0,79***	1				
PR	-0,39	0,68***	0,69***	0,75***	0,95***	1			
DPPH	0,16	0,41	0,47*	0,6**	0,41	0,45*	1		
OH	-0,46*	0,43	0,32	0,36	0,21	0,36	-0,03	1	
B_CARO	0,73***	0,05	-0,24	-0,29	0,14	0,21	-0,64**	0,17	1

Annexe V: Tableau de corrélation ; * : une corrélation significative ** : une corrélation moyennement significative *** : une corrélation hautement significative

Résumé : Nous nous sommes intéressées dans cette présente étude aux dosages des composés phénoliques totaux (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés), après leur extraction en utilisant sept solvants de polarités différentes. Ainsi qu'à l'évaluation des propriétés antioxydants des extraits de l'espèce de lichen *Collema cristatum* récoltée dans la région de Béjaïa, au moyen de cinq techniques : piégeage du radical DPPH•, le pouvoir réducteur, inhibition de l'oxydation du β -carotène, piégeage de l'hydroxyle (OH•), et la quantification de la capacité antioxydante totale. Les résultats obtenus montrent que l'extrait acétonique aqueux 50% est le plus riche en polyphénols totaux (10,18 mg/g), en flavonoïdes (1,68 mg/g), et en tanins condensés (6,68 mg/g) par rapport aux autres extraits. Le même extrait a montré également une forte activité antiradicalaire contre DPPH (76,32%) ; et une meilleure capacité réductrice (1,598) ; et une forte capacité antioxydante totale (9,11 mg/g). L'extrait éthanolique aqueux possède le meilleur piègeur du radical hydroxyle OH (65,72%). Quant à l'extrait aqueux il présente la meilleure capacité de blanchiment de β -carotène (60,15% d'inhibition). Des corrélations significatives ont été établies entre la teneur en polyphénols, en flavonoïde, et en tanins condensés avec l'activité antioxydante totale, blanchiment de β -carotène, le pouvoir réducteur et les activités antiradicalaires (DPPH, OH). Par conséquent cette espèce pourra être considérée comme une source d'antioxydants naturels pour la prévention de diverses maladies.

Mots clés : *Collema cristatum* ; Composés phénoliques totaux ; Activités antioxydants ; Extraits.

Abstract: We are interested in the present study at the dosages of phenolic compounds (total polyphenols, flavonoids and condensed tannins), after their extraction by using seven different polarity solvents, and the evaluation of the antioxidant properties of the extracts of the species of lichen *Collema cristatum* collected in Bejaia region, with five techniques: DPPH radical scavenging, hydroxyl radical scavenging (OH•), iron reducing power, β -carotene bleaching method and quantification of total antioxidant capacity. The results obtained showed that the aqueous acetone extract 50% is the richest in total polyphenols (10.18 mg / g), flavonoids (1.68 mg / g), and condensed tannins (6.68 mg/g) compared to other extracts. The same extract also showed strong activity against DPPH radical-scavenging (76.32%), the best reductive capacity (1,598), and the high total antioxidant capacity (9.11 mg / g). The aqueous ethanol extract has the best scavenger of the hydroxyl radical OH (65.72%), As for the aqueous extract it has the best ability of β -carotene bleaching (60.15% inhibition). Significant correlations were established between the polyphenol content, flavonoids content, and condensed tannins content with total antioxidant activity, β -carotene bleaching, reducing power and radical scavenging activity (DPPH, OH). Therefore this species can be considered a source of natural antioxidants for disease prevention and health promotion.

Keywords: *Collema cristatum*; phenolic compounds; antioxidant activity; extracts.

ملخص

إهتمنا في هذا العمل بدراسة المركبات الفينولية (الفينولات الكلية، الفلافونويدات والتانات) بعد عملية الاستخلاص باستخدام سبع محاليل مختلفة الأقطاب وتقييم خصائص مضادة للأكسدة لمستخلصات نوع من الأشنة *Collema cristatum* منزوعة في منطقة بجاية باستخدام خمسة طرق : محاصرة الجذر DPPH• , محاصرة الهيدروكسيل (OH•) ، إرجاع الحديد ، تثبيط الأكسدة ل- β كاروتين وتقدير القدرة المضادة للأكسدة الإجمالية. النتائج التي تم الحصول عليها تظهر أن المستخلص أسيتون 50% اظهر أعلى نسبة مقارنة مع المستخلصات الأخرى بقيمة (18, 10 مغ/غ) للفينولات الكلية و (1,68 مغ/غ) عند الفلافونويدات و (6,68 مغ/غ) للتانات , نفس المستخلص اظهر قوة كبيرة لمحاصرة جذور DPPH بنسبة (32, 76) و أفضل قدرة إرجاعية بقيمة (1, 598) ; لديه أيضا قدرة مضادة للأكسدة كلية (9,11 مغ/غ). بينما المستخلص ايثانول 50% استطاع محاصرة الهيدروكسيل OH ب (65,72%) ; بالنسبة للمستخلص المائي بين قدرة تثبيط التبييض ل- β كاروتين (60,15%) ; سجلنا وجود علاقة ايجابية بين التجارب الخمسة مع المركبات الفينولية لهذه الأشنة *Collema cristatum* , يمكن اعتبارها مصدر المضادات الأكسدة الطبيعية للوقاية من الأمراض المختلفة.

الكلمات المفتاحية : *Collema cristatum* ; المركبات الفينولية ; النشاط المضاد للأكسدة ; مستخلصات .