

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

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



كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم: البيولوجيا الجزيئية والخلوية

## *Mémoire de fin d'étude*

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Sciences de  
la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Option : Toxicologie Fondamentale et Appliquée**

## **Thème**

**Identification de l'acide usnique chez trois lichens de la  
région de Jijel et évaluation de l'activité anti-oxydante  
de leurs extraits phénoliques.**

### **Membres de Jury**

**Président (e) : Dr Lekroun Z**

**Examineur : Dr Boulassel A**

**Encadrant : Dr Salem S**

### **Présenté par**

**Krara Soumia**

**Medjitna Meriem**

**Année Universitaire 2022-2023**

**Numéro d'ordre (bibliothèque) : .....**

---

## *Remerciements*

---

*Avant toute, nous remercions Dieu, le tout-puissant, de nous avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.*

*Nous remercions en particulier notre encadreur Dr Salem S de nous avoir aidé par ces conseils, ces remarques pertinentes et par sa collaboration effective Pour l'élaboration et la réalisation de ce travail.*

*Nos vifs remerciements vont à Dr LAKROUN Z, qui nous a honoré en acceptant de présider le jury.*

*Nous tenons également à remercier Dr BOULASSEL A, d'avoir bien voulu examiner notre travail.*

*Nous remercions tout particulièrement, directeur de Parc National de Taza-Jijel, pour son aide précieuse, sa disponibilité et ses conseils.*

*Enfin, nous remercions tous le personnel du laboratoire de biologie, et les employés de bibliothèque de biologie Me. Leïla et M. Ibrahim, pour leur Encouragement, gentillesse, conseils précieux et leur disponibilité.*

*A tout ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce Modeste travail.*

## *Dédicace*

*Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé La patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A Mon très chère père « Ahmed » le premier homme de ma vie la première source de ma force et de mon courage qui a été toujours présent dans mon esprit que Dieu ait son âme, je te dédie aujourd'hui ma réussite, et je sais que si tu étais présent parmi nous, tu seras si fier de moi. Je t'aime papa. Qu'Allah t'accueille dans son éternel paradis*

*A ma chère mère Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tous ce que je peux offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.*

*A mes chers frères : Oussama, Brahim, Chouaib et Yahia*

*Aux épouses de mes frères : Nawal et Noussaïba*

*Aux petits anges : Anes, Yasser, Akram et la petite princesse Ayla.*

*A Mon Binôme: Soumia Krara.*

*A ma adorable amie : Noussaïba (noussa), Rania, Halima, Zineb et Zahra.*

*A toute mes collègues de master 2 toxicologie promotion 2023.*

*A toute personne qui m'a aidé de près ou de loin, directement ou indirectement durant ce passage.*

*Meriem*

## Dédicace

*Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé La patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce travail que je dédie :*

*À la meilleur et la plus belle femme du monde, à celle qui m'a donné la vie ma chère mère « **Menouba** » que Dieu ait pitié d'elle. Je sais que si tu étais présent parmi nous, tu seras si fière de moi. Je t'aime maman, Qu'Allah t'accueille dans son éternel paradis.*

*Au premier homme de ma vie, que dieu le gardes et le protège mon cher père « **Abdelouahed** », aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous, Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*À mes chers frères (Khaled, Bilel, Mohammed et Hakim), et mes chers sœurs (Ibtissam, Ahlem, Nahla, Selma) qui étaient toujours avec moi*

*À tous les membres de ma famille (Wafia, Linda, Nada, Ibtihadje et Rachida), et sans oublier Raouf, Ahmed, Rahma, Radjaa, Raghed, Malak, Amani, Takwa, Abdellah, Loukman, Salssabil, Soulayman et Nour Elyakin.*

*À mon binôme, et ma chère amie : Meriem Medjitna.*

*À mes chères amies et mes chères amours chacun a son nom, surtout Rania, Zineb et Nadjat.*

*À tous ceux qui m'aiment, et à tous ceux que j'aime.*

*À tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.*

*À tous les collègues de ma promotion 2023.*

*Soumia*

## Liste des abréviations

[ $\mu\text{g Eq AG /mg EB}$ ] : Microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait brut

[ $\mu\text{g Eq Q /mg EB}$ ] : Microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait brut

$\pm$  : Plus ou moins

$^{\circ}\text{C}$  : Degré Celsius

$\mu\text{g}$  : Microgramme

$\mu\text{l}$  : Microlitre

Abs : Absorbance

AC as : Acide ascorbique

$\text{AlCl}_3$  : Trichlorure d'aluminium

AU : Acide usnique.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CI50 : Concentration inhibitrice 50 %.

DO : Densité optique.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EAG: Equivalent en acide gallique.

EB : Extrait brut

Ecart : Ecart-type

EQ : Equivalent en quercétine.

$\text{Fe}^{2+}$  : Fer ferreux

$\text{Fe}^{3+}$  : Fer ferrique

$\text{FeCl}_3$  : trichlorure de fer.

FRAP : Pouvoir antioxydant réducteur ferrique.

g : gramme

h : heure

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Acide sulfurique.

H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> : Phosphotungestique

H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub> : Acide phosphotungstique

I% : Pourcentage d'inhibition

K<sub>3</sub>Fe (CN) 6: Ferricyanure de potassium

Km : kilomètre

M : Molaire

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Carbonate de sodium

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Phosphate de sodium

NS : Pas de différences significatives

OH·: Radical hydroxyle

PH : Potentiel hydrogène

PNT : Parc National de Taza

Rf : Rapport frontale

TCA : Acide trichloracétique

UV : Ultraviolet

c-à-d : c'est-à-dire

## Liste des figures

Figures	Titres	Pages
1	Schéma de la symbiose lichénique.	04
2	Illustration des principaux types morphologiques de lichens.	05
3	Mécanismes de la reproduction sexuée.	06
4	Reproduction asexuée par sorédies.	07
5	Reproduction asexuée par isidies.	07
6	Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques.	09
7	Structure des deux énantiomères de l'acide usnique.	11
8	Localisation du Parc National de Taza.	17
9	Les espèces qui nous ont utilisés pour cette étude.	19
10	Les étapes de la Chromatographie sur couche mince.	26
11	Teneur en phénols totaux et flavonoïdes dans les 3 échantillons	27
12	Pourcentage d'inhibition du DPPH pour les trois extraits et l'acide ascorbique	28
13	Valeur d'IC50 de l'extrait testé et de l'acide ascorbique.	29
14	Pouvoir réducteur des extraits lichéniques.	30
15	Capacité anti-oxydante totale des extraits lichéniques.	31
16	Chromatogrammes des extraits acétoniques des lichens sous la lumière visible (LV).	32
17	Chromatogrammes des extraits acétoniques des lichens étudiés sous UV.	32

## Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
1	Rendement d'extraction.	<b>27</b>
2	Résultats des rapports frontaux des spots obtenus par CCM des extraits acétoniques.	<b>33</b>

## Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>I</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>IV</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>III</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>IV</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>01</b>

### **Partie 1 : Synthèse bibliographique.**

#### **Chapitre I : Généralités sur les lichens.**

I.1. Définition .....	<b>03</b>
I.2. Partenaires de la symbiose lichénieuse.....	<b>03</b>
I.2.1. Partenaire chlorophyllien (Photobionte).....	<b>03</b>
I.2.2. Partenaire fongique (mycobionte) .....	<b>03</b>
I.3. Ecologie et répartition.....	<b>04</b>
I.4. Morphologies des lichens.....	<b>04</b>
I.4.1. Anatomie des lichens.....	<b>05</b>
I.5. La reproduction des lichens.....	<b>06</b>
I.5.1. Reproduction sexuée.....	<b>06</b>
I.5.2. Reproduction asexuée ou végétative.....	<b>06</b>
I.6. Métabolites des lichens.....	<b>07</b>
I.6.1. Métabolites primaires.....	<b>07</b>
I.7. Métabolites secondaires.....	<b>08</b>
I.7.1. Voies de biosynthèse des substance lichéniques.....	<b>08</b>
I.7.1.1. Voie de l'acétate polymalonate.....	<b>08</b>
I.7.1.2. Voie de l'acide mévalonique.....	<b>08</b>
I.7.1.3. Voie d'acide shikimique.....	<b>09</b>
I.8. Rôle des métabolites secondaires.....	<b>09</b>

#### **Chapitre II : Acide usnique.**

II.1. Définition.....	<b>11</b>
II.2. Chimie et biosynthèse d'acide usnique.....	<b>11</b>
II.3. Localisation de l'acide usnique chez les lichens.....	<b>11</b>
II.4. Concentration De l'acide usnique dans le thalle lichénique.....	<b>12</b>
II.5. Toxicité de l'acide usnique.....	<b>12</b>

II.6. Rôle biologique de l'acide usnique dans les lichens.....	13
II.7. Effets biologiques de l'acide usnique.....	13
II.7.1. Activité antibactérienne.....	13
II.7.2. Activité anti-inflammatoire.....	14
II.7.3. Activité antivirale.....	14
II.7.4. Activité analgésique et antipyrétique.....	14
II.7.5. Activité antioxydante.....	14
II.7.6. Activité anti-tumorale et anti-cancer.....	15
II.7.7. Filtre UV.....	15
II.8. Disponibilité et utilisation commerciale de l'acide usnique.....	15

## **Partie 2 : partie expérimentale.**

### **Chapitre III : Matériel et méthodes.**

III.1. Présentation du site d'échantillonnage.....	17
III.1.1. Présentation de Parc National de Taza.....	17
III.1.2. Biodiversité lichénique du Parc National de Taza.....	17
III.2. Matériel végétal.....	18
III.2.1. Récolte et choix des espèces.....	18
III.2.2. Présentation des espèces lichéniques .....	18
III.2.1. Préparation du matériel végétal.....	19
III.3. Préparation de l'extrait lichénique.....	19
III.3.1. Macération.....	19
III.3.2. Détermination du rendement d'extraction.....	20
III.4. Dosage des polyphénols totaux .....	20
III.5. Dosage des flavonoïdes.....	21
III.6. Evaluation de l'activité antioxydante.....	21
III.6.1. Test de piégeage du radical libre DPPH'.....	22
III.6.2. Pouvoir réducteur (Test de la réduction du fer (FRAP)) .....	23
III.6.3. Capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate » ou « CAT » .....	24
III.7. Analyse des extraits par Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	24
III.7.1. Paramètres mesurés.....	26
III.8. Analyse statistique.....	26

### **Chapitre IV : Résultats et discussions**

IV.1. Rendement d'extraction.....	27
-----------------------------------	----

IV.2. Détermination de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes chez les trois lichens.....	27
IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	28
IV.3.1. Test de piégeage du radical libre DPPH'.....	28
IV.3.2. Pouvoir réducteur (FRAP) .....	29
IV.3.3. Capacité antioxydante totale (CAT) .....	30
IV.4. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	31
VI.5. Discussions.....	34
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>
<b>Références.....</b>	<b>39</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>XI</b>
<b>Résumé</b>	

# **Introduction**

Les lichens remontent à des temps très anciens, ce sont des organismes mixtes résultant de la symbiose entre un partenaire fongique et un organisme photosynthétique, soit une algue appelée photobionte (et/ou cyanobactéries) ou champignon appelé aussi mycobionte (**Kosanic et al., 2014 ; Ranković, 2015**). Cette vie en symbiose constitue un succès évolutif dans l'histoire des organismes vivants, car ils s'adaptent aux conditions environnementales les plus hostiles. Les lichens peuvent coloniser tous les substrats (écorces, tiges, feuilles, etc), et milieux même ceux qui sont défavorables pour les autres plantes (**Grube, 2015**).

Ils sont utilisés depuis plusieurs décennies pour évaluer la qualité de l'air. Tentons de comprendre pour quelles raisons ces organismes vivants sont de bons témoins de la pollution atmosphérique (**Boustie et Grube, 2005 ; Honegger, 2012**).

Les lichens disposent d'un large spectre de composés bioactifs appelés métabolites secondaires caractéristiques qui sont uniques dans la nature. La plupart des acides lichéniques sont de nature phénolique, tels que les anthraquinones, les dépsides, les dépsidones et l'acide usnique (**Diniz et al., 2015**), ces composés représentent parfois jusqu'à 40% aux moins du poids sec du lichen. Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de substances biologiquement actives vu leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales, et cytotoxiques (**Verma et al., 2015 ; Goga et al., 2020 ; Salem et al., 2021**).

Depuis sa première isolation et identification en 1844, l'acide usnique est devenu le métabolite lichénique le plus étudié (**Ingolfssdottir K, 2002**), ce dérivé dibenzofurannique est identifié uniquement chez les lichens, notamment chez certaines espèces du genre *Usnea* (**Cansaran et al., 2006 ; Lukáč, 2010**), *Cladonia* (**Ingolfssdottir K, 2002**), *Ramalina* (**Tay et al., 2004**) ou *Alectoria* (**Einarsdóttir et al., 2010**). Ce composé phénolique présente un large spectre d'activités biologiques. Il possède des propriétés antibactériennes, antifongique, activités antiparasitaires, antioxydante et pro-oxydante (**Bazin et al., 2008 ; Einarsdóttir et al., 2010 ; Bačkorová et al., 2011**).

L'étude de la flore lichénique, encore marginalisée et mal connue, présente non seulement un intérêt théorique, mais aussi un intérêt pratique, principalement tant d'un point de vue écologique que phytochimique. Actuellement, la diversité lichénique en Algérie est estimée par 934 espèces, la flore lichénique du Parc National de Taza (Jijel) compte 60 espèces (**Salem, 2013**).

Cette étude aurait pour but la valorisation de la flore lichénique de la région de Jijel, plus particulièrement celle du Parc National de Taza, pour cela trois espèces lichéniques à savoir

## **Introduction**

*Ramalina farinacea*, *Evernia prunastri*, et *Usnea sp* sont choisies, dont les objectifs de notre travail sont :

- Extraction de l'acide usnique et quantification des polyphénols et flavonoïdes de trois lichens (*Ramalina farinacea*, *Evernia prunastri*, et *Usnea sp*).
- Evaluation de l'activité antioxydante de leurs extraits acétoniques via trois tests à savoir, le test antiradicalaire (DPPH), le pouvoir réducteur de fer ou (FRAP), et la capacité antioxydante totale (CAT).
- Identification de l'acide usnique chez les trois espèces lichéniques en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM).

# **Partie 1 : Synthèse bibliographique.**

**Chapitre 01 :**  
**Généralités sur les**  
**lichens**

**I-Généralités sur les lichens****I.1.Définition**

Les lichens résultent de la symbiose entre une algue verte et / ou une cyanobactérie (photobionte) et un champignon (mycobionte) (**Engler, 2013**). Environ 85% des photobiontes sont des algues vertes (Chlorophycées) et 10% sont des cyanobactéries ou (cyanophycées) (**Shrestha et Clair, 2013**). Cette symbiose confère aux lichens une structure et une reproduction spécifiques par rapport à chaque constituant seul.

La découverte de fossiles suggère qu'ils seraient apparus il y a quelques 600 millions d'années (**Yuan et al., 2005**). La morphologie, la physiologie et la biochimie des lichens sont très différentes de celles du champignon isolé et de l'algue en culture (**Zambare et Christopher, 2012**).

**I.2.Partenaires de la symbiose lichénique****I.2.1. Partenaire chlorophyllien (Photobionte)**

Les algues appelées aussi phycosymbiotes, sont des organismes autotrophes, par le biais de la photosynthèse elles synthétisent la matière organique à partir du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) de l'air et du rayonnement solaire. Dans 90% des cas le photobionte est une algue verte appartient aux chlorophycées, cette classe regroupe le genre *Trebouxia* et le genre *Trentepohlia*. Alors qu'il s'agit d'une cyanobactérie (cyanophytes) ou algue bleue dans les 10 % restants. Dans cette classe le genre *Nostoc* est le plus commun (**Tiévant, 2001 ; Engler, 2013**).

**I.2.2. Partenaire fongique (mycobionte)**

Appelé aussi mycobionte ou mycosymbiotes, environ 99% des mycobiontes impliqués dans la symbiose lichénique sont des Ascomycètes, les quelques 1% restants appartiennent aux Basidiomycètes et aux Deutromycètes. L'élément fongique assure la fixation au substrat (**Belleenfant et al., 2010**), protège les cellules algales et le thalle des rayonnements solaires et leur fournissent de l'eau, des minéraux et des vitamines (notamment C) (**Engler, 2013**), il assure également la structure et la reproduction sexuée par la production de spores (**Van et al., 2009**).

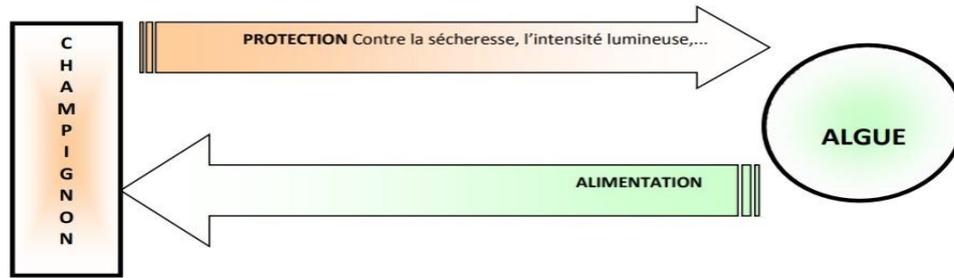


Figure 01 : Schéma de la symbiose lichénique (Mohammed, 2015).

### I.3.Écologie et répartition

Les lichens sont répartis à travers presque toutes les régions du monde : ils sont largement répartis dans différents habitats et zones climatiques (Aubert *et al.*, 2007), Ils peuvent également pousser sur une grande variété de substrats, parfois dans des conditions écologiques extrêmes (Cardinale *et al.*, 2006).

Ils se trouvent également dans des peuplements où les conditions sont défavorables pour de nombreux autres organismes (Zarabska *et al.*, 2015), et représentent environ 8 % de la couverture terrestre (Lange *et al.*, 2001). Ils colonisent la roche la plus dure, le sol le plus désert et peuvent supporter de très grosses variations de température (Aubert *et al.*, 2007), ou très froides (jusqu'à -400C) et des taux d'humidité ou de sécheresse très élevées (Tiévant, 2001). Différents facteurs influencent la répartition des lichens : l'eau, la lumière, la température et le substrat (Goujon, 2004). Selon la nature du substrat les lichens sont classés en trois (03) catégories :

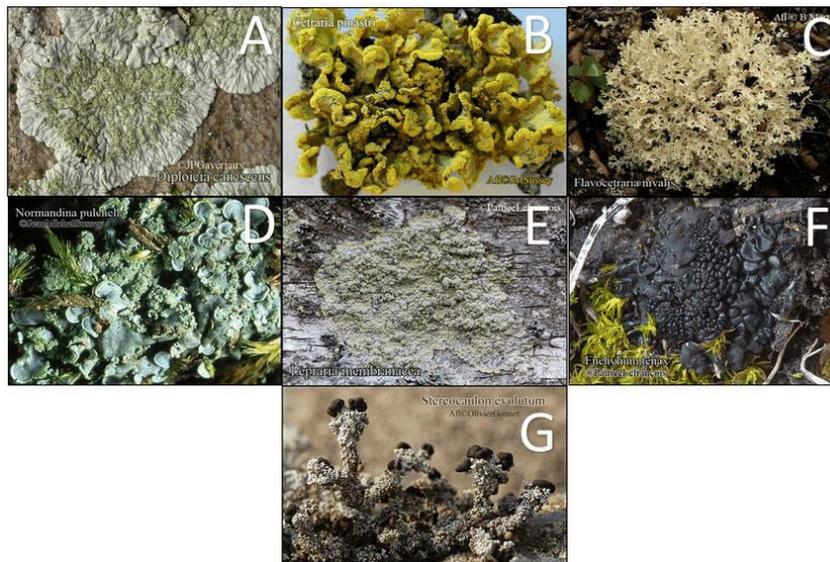
- Lichens épiphytes (corticole) : sont développés sur les arbres ou branches des arbres et les écorces des troncs. Ils sont les plus abondants et complexes (Bauvet, 2020).
- Lichens saxicoles : Se trouvent sur les rochers siliceux ou calcaires, les murs et les toits (Epard *et al.*, 2020).
- Lichens terricoles : poussent sur les sols de terre, de sable, d'humus, ainsi que sur les mousses et la tourbe (Vust, 2022).

### I.4.Morphologie des lichens

À la différence des plantes supérieures, les lichens ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille mais un appareil végétatif rudimentaire appelé, thalle (Van *et al.*, 2009). Un thalle ou corps d'un lichen est l'appareil végétatif du lichen constitué essentiellement d'hyphes fongiques, chez certains lichens, les cellules du photobionte sont dispersées dans le thalle (Nabors, 2008)

Selon la morphologie du thalle on distingue 7 groupes (Rémy, 2012) :

- 1-Les thalles crustacés : (les plus répandu) forment une croûte incrustée dans leur substrat.
- 2-Les thalles foliacés : en forme de feuilles plus ou moins lobées, facilement détachables du substrat.
- 3-Les thalles fruticuleux : assez ramifiés, n'adhérant à leur support qu'en un point unique.
- 4-Les thalles complexes ou composites : possèdent un thalle primaire foliacé et un thalle secondaire dressé.
- 5- Les thalles squamuleux : constitués de petites écailles plus ou moins serrées les unes contre les autres.
- 6-Les thalles gélatineux : noirs et cassants à l'état sec, mous et gélatineux à l'état humide.
- 7/ Les thalles lépreux : dont le thalle est formé de minuscules.



**Figure 02 :** Illustration des principaux types morphologiques de lichens. **A :** thalle crustacé, **B :** thalle foliacé, **C :** thalle fruticuleux, **D :** thalle squamuleux, **E :** thalle lépreux, **F :** thalle gélatineux, **G :** thalle complexe (Le Pogam-Alluard, 2016).

#### I.4.2. Anatomie des lichens

Il existe essentiellement deux types de structures anatomiques des thalles : homéomère et hétéromère. La distinction est fondée sur la répartition des cellules algales à l'intérieur du thalle (Aprile *et al.*, 2011).

- Structure homéomère : les deux partenaires sont répartis uniformément au sein de la structure. C'est le cas par exemple des lichens du genre *Collema*. L'espace interne du thalle constitué d'une stratification interne avec une couche supérieure fongique et une couche algale sous-jacente (Morillas *et al.*, 2022).

- Structure hétéromère : Les partenaires algaux et fongiques ne sont pas uniformément répartis. La structure générale d'un lichen hétéromère est principalement composée de couches de champignons et d'algues, la plupart des lichens sont de ce type (Singh et Sinha, 1997 ; Morillas *et al.*, 2022).

Les différentes zones des thalles sont le cortex supérieur, la zone algale, la moelle et le cortex inférieur (Singh et Sinha, 1997).

### I.5.Reproduction des lichens

Les lichens se reproduisent selon deux modes de reproduction : asexuée ou végétative et sexuée.

#### I.5.1. Reproduction sexuée

Se déroule en deux phases (figure 03) :

- Dans le même thalle, des « hyphes + » et des « hyphes - » fusionnent et forment des boutons appelés apothécies qui vont produire des spores (Bellenfant *et al.*, 2010).
- Ces spores facilement transportées par le vent vont constituer de nouveaux des hyphes asexués qui devront capturer et emballer une algue présente dans le milieu de façon à pouvoir donner naissance à un nouveau lichen (Bellenfant *et al.*, 2010).

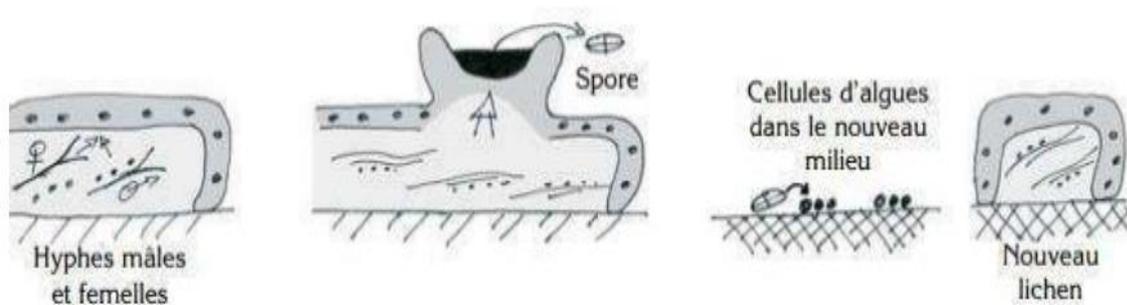
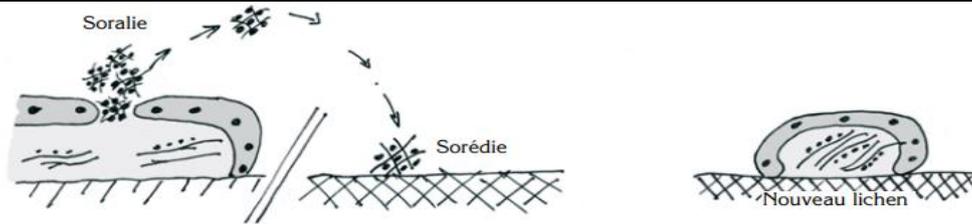


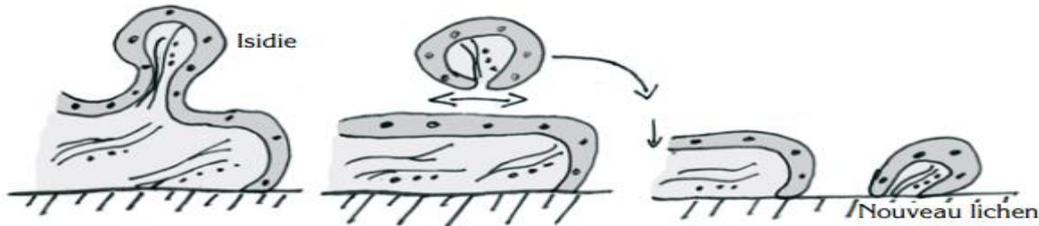
Figure 03 : Mécanismes de la reproduction sexuée (Bellenfant *et al.*, 2010).

#### I.5.2. Reproduction asexuée ou végétative

Les lichens se reproduisent habituellement par simple fragmentation, par la production de propagules pulvérulentes particulières, les sorédies ou par de petites excroissances, les isidies. Les fragments, sorédies et isidies, qui contiennent en même temps des hyphes fongiques et des algues ou des cyanobactéries fonctionnent comme de petites unités de dissémination permettant l'installation du lichen de nouvelles stations (Raven *et al.*, 2007) (figure 04).



**Figure 04 :** Reproduction asexuée par sorédies (Bellenfant *et al.*, 2010).



**Figure 05 :** Reproduction asexuée par isidies (Bellenfant *et al.*, 2010).

### I.6.Métabolites des lichens.

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

Chez les lichens, l'algue induit la synthèse de métabolites secondaires par le champignon (les substances lichéniques), qui ont un rôle protecteur contre les forts éclaircissements et contre les herbivores (Shrestha et Clair, 2013). Le nombre de métabolites lichéniques isolés dépasse les 800 dans l'ouvrage de référence réalisé par Huneck et Yoshimura en 1996 et actuellement le nombre de substances lichéniques identifiées dépasserait les 1050 (Stocker-Wörgötter, 2008).

Les lichens élaborent deux groupes de composés différents ; métabolites primaires qui sont « intracellulaires » et les métabolites secondaires qui sont « extracellulaires » (Nash, 2008).

#### I.6.1. Métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des protéines, acides aminés, polyols, caroténoïdes, polysaccharides, ribitol, sorbitol, glucose, et des vitamines. Ces substances sont tenues dans les parois cellulaires et les protoplastes et souvent solubles dans l'eau, et peuvent même être extraire avec l'ébullition de l'eau. Certains de ces métabolites primaires sont produites par des champignons et certains par les algues, ou les deux (Shukla *et al.*, 2014 ; Ranković et Kosanić, 2015).

**I.7. Métabolites secondaires**

La majorité des composés organiques présents dans les lichens sont des métabolites secondaires (**Ranković et Kosanić, 2015**), ils sont connus comme les acides du lichen ou de substances de lichen (**Shukla et al., 2014**).

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

Les métabolites secondaires des lichens 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 (jusqu'à 20 %) (**Shukla et al., 2010**). Les lichens produisent des métabolites secondaires très particuliers. Ces métabolites sont nécessaires pour la pigmentation, la croissance, la reproduction, la résistance aux microbes pathogènes et pour beaucoup d'autres fonctions des lichens (**Fahselt, 1994 ; Naczek et Shahidi, 2004**).

**I.7.1. Voies de biosynthèse des substances lichéniques**

Les métabolites secondaires lichéniques peuvent être obtenus via trois voies de biogenèse, la majorité de ces composés est dérivée de la voie de l'acétate polymalonate ou polycétide synthase les autres métabolites secondaires sont issus des voies de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique (**Stocker-Wörgötter et al., 2013**) (figure06).

**I.7.1.1 Voies d'Acétate-polymalonate**

Comprend les composés les plus courants de lichen tel que :

Les acides aliphatiques secondaires, les esters et les dérivés relatifs, Les composés phénoliques mononucléaires, Depsides, tridepsides et esters benzyliques, Depsidones et esters diphenyliques, Depsones, Dibenzofuranes, les acides usniques et leurs dérivés, Anthraquinones et xanthones, Naphtoquinones et Xanthones.

**I.7.1.2. Voie d'acide mévalonique**

La voie d'acide mévalonique comprend les Stéroïdes et les Di-, sester-et triterpènes.

**I.7.1.3. Voie de l'acide shikimique**

Cette voie de biosynthèse comprend les Terphénylquinones et dérivés d'acides pulviniques.

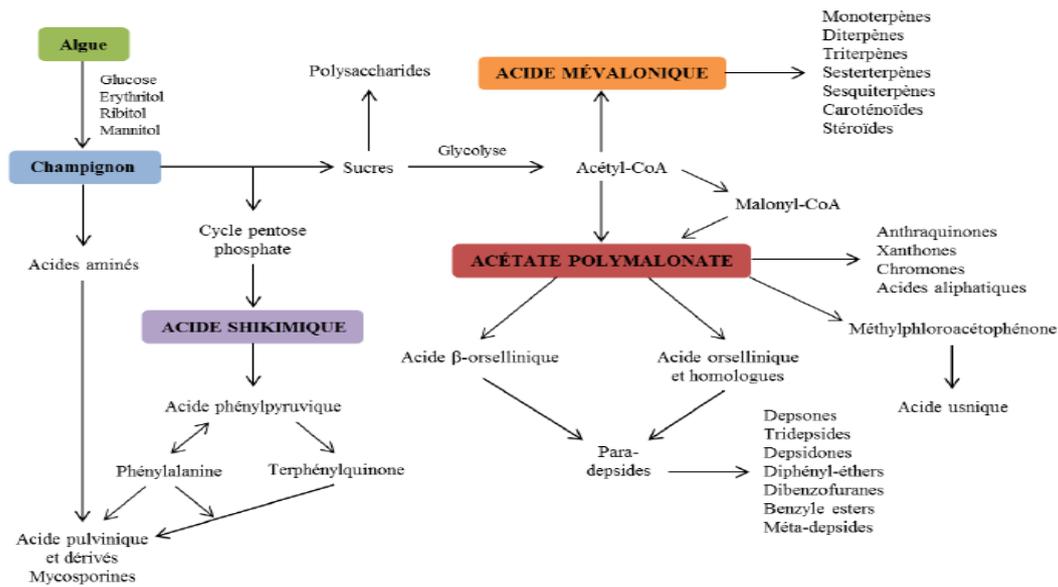


Figure 06 : Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques (Elix et Stocker-wörgötter, 2008).

### I.8. Rôle des métabolites secondaires

- Les métabolites secondaires jouent un rôle dans l'interaction de la cellule avec son environnement et peuvent être utilisés comme outil de défense contre les facteurs biotiques et abiotiques externes, y compris les fortes concentrations de polluants (Shukla, 2014).
- Les métabolites secondaires jouent un rôle dans la résistance des lichens à la pollution Afin d'éviter les effets toxiques notamment des métaux, certains composés sont capables d'inhiber ou de favoriser l'absorption de différents ions métalliques, mais aussi de les chélater en formant des complexes (Purvis, 2014).
- La Protection contre diverses influences physiques et biologiques négatives. (Ranković et Kosanić, 2019).
- Protéger les cellules contre le stress oxydatif (Sahin et al., 2021).
- Défense de la plante contre toutes sortes de prédateurs vertébrés, invertébrés ou de maladies virales ou fongiques. Elles permettent la communication entre les plantes de la même espèce (Pierre et Chin, 2016).
- Protéger les lichens contre les stress environnementaux croissants tels que l'exposition à la lumière, les changements du potentiel hydrique, les interactions microbiennes et herbivores et d'autres changements associés aux changements des conditions environnementales (Shukla, 2014).

- La protection contre les dégâts des animaux ; car certains lichens sont fortement toxiques comme *Letharia vulpina* et d'autres sont amères, l'augmentation de l'absorption de l'eau par le thalle (**Ozenda et Clauzade, 1970**).

Le rôle des métabolites lichéniques au sein de la symbiose reste encore peu connu. Le potentiel thérapeutique des lichens est depuis longtemps exploité par la médecine traditionnelle, différentes préparations provenant de lichens ont montré des effets analgésiques, antipyrétiques (**Huneck, 1996 ; Moreira et al., 2015 ; Behera et al., 2016**). En effet, les lichens constituent actuellement une source importante de molécules biologiquement actives (**Martins et al., 2018 ; Lee et al., 2020 ; Nguyen et al., 2021**).

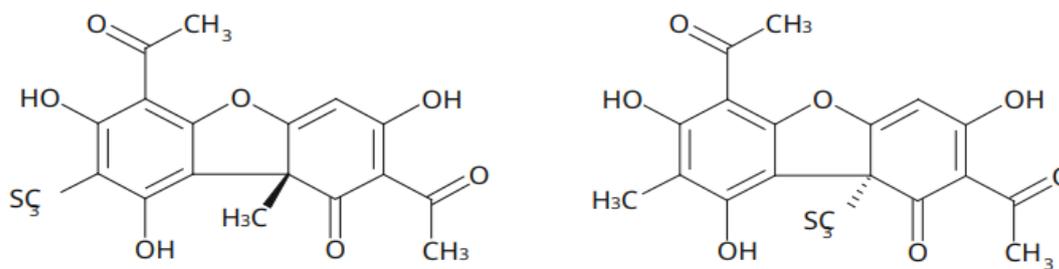
# **Chapitre II : Acide usnique**

## II-Acide usnique

## II.1. Définition

L'acide usnique est un dibenzofurane polycyclique naturel de formule  $C_{18}H_{16}O_7$ . Il a été isolé la première fois par Knop en 1844 (**Vasilios et Frankos, 2005 ; Gunawan *et al.*, 2023**). Il s'agit d'un pigment jaunâtre de saveur amère. L'acide usnique est un métabolite secondaire des lichens il a été identifié dans de nombreux genres, notamment les *Usnées*, *Ramalina*, *Parmelia*, *Cladonia*, *Evernia*, *Lenanora* et *Alectoria*. Il présente parfois un rendement de 6% du poids sec du thalle (**Ingolfssdottir, 2002 ; LUKÁČ *et al.*, 2012**).

Il existe deux formes d'énantiomères : acide (+)-usnique et acide (-)-usnique, qui diffèrent dans l'orientation du groupe méthyle situé en position 9b (**Cocchietto, 2002 ; Galanty *et al.*, 2019**).



**Figure 07** : structure des deux énantiomères de l'acide usnique (**Galanty *et al.*, 2019**).

## II.2. Chimie et biosynthèse de l'acide usnique

L'acide usnique peut être synthétisé chimiquement à partir de la méthylphloroacétophénone par couplage oxydatif suivi d'une hydrolyse dans l'acide sulfurique (**Guo *et al.*, 2008**).

La biosynthèse de l'acide usnique passe via l'acétate au polykétide en méthylphloroacétophénone, avec incorporation du C1 fragment survenant avant l'aromatisation. Les étapes suivantes impliquent un couplage phénolique oxydatif stéréospécifique de deux unités de méthylphloroacétophénone pour donner de l'acide usnique hydraté et enfin une déshydratation conduisant à la formation d'une liaison éther (**Ingolfssdottir, 2002**).

## II.3. Localisation de l'acide usnique chez les lichens

Castle et Kubsch ont été les premiers à signaler que l'AU est produit dans la partie fongique du lichen (mycobionte), puis forme une couche à la surface du photobionte (**Alahmadi, 2017**).

Certains composés tels que les dibenzofuranes (acide usnique), depsides, depsidones, ou dérivés de shikimate sont trouvés dans les lichens, la plupart de ces composés secondaires sont accumulés comme cristaux sur les surfaces externes des hyphes dans le cortex supérieur ou dans la médulle interne du thalle (**Boustie, 2011**). Il s'accumule en grande quantité, représente de 1 à 9% du poids sec total du lichen (**Bjerke et al., 2004**).

#### **II.4. Concentration de l'acide usnique dans le thalle lichénique**

La concentration de l'acide usnique varie à l'intérieur et entre les thalles individuels, selon les facteurs suivants :

- **Espèce**

La concentration de L'acide usnique dans le thalle lichénique varie d'une espèce à l'autre et même entre les populations de la même espèce (**Bjerke et al., 2004**).

- **Age du thalle**

L'acide usnique est généralement trouvé avec des concentrations plus élevées dans les plus jeunes zones du thalle (**Bjerke et al., 2004**), une corrélation négative entre l'âge de thalle et la concentration de l'acide usnique a été également trouvée, probablement dû à l'activité métabolique plus élevée du jeune thalle (**Coccheitto et al., 2002**).

Dans certains cas, la concentration en acide usnique dans les jeunes zones du thalle montre une variation élevée dans la même population uniforme, tandis que dans d'autres cas, la variabilité intra-population est basse en comparaison avec la variabilité entre populations qui grandissent sous différentes conditions climatiques (**Bjerke et al., 2004**).

#### **II.5. Toxicité de l'acide usnique**

La communauté scientifique s'efforce de comprendre les mécanismes biochimiques et moléculaires impliqués à la fois dans l'activité biologique inhérente de l'acide usnique appauvri et dans sa toxicité, qui ne sont pas encore totalement élucidés (**Macedo et al., 2021**).

- **Sur l'homme**

Les données concernant la toxicité de l'acide usnique chez l'homme sont rares. Les seuls effets indésirables rapportés sont des irritations locales et des dermatites allergiques de contact, parfois accompagnées de conjonctivite (**Ingolfssdottir, 2002**), de plus, il peut également provoquer des graves lésions du foie (hépatotoxicité) lorsqu'il est pris comme complément alimentaire pour la perte de poids (**Araújo et al., 2015**), et peut faire des effets tératogènes (**Silva et al., 2018**).

- **Sur les animaux**

L'acide usnique est toxique sur les herbivores, principalement les invertébrés (**Caviglia et al., 2001**), des expériences d'alimentation chez d'autres animaux ont montré que l'acide usnique était toxique à fortes doses (**Ingolfssdottir, 2002**).

## **II.6. Rôle biologique de l'acide usnique dans les lichens**

Au cours de la longue période d'évolution, les lichens ont développé une grande capacité de survivre dans les conditions environnementales extrêmes et dures, cette capacité est obtenue pour atteindre un état de dormance à travers un métabolisme lent, et surtout par la production de métabolites bioactifs excréteurs telle que l'acide usnique, qui offre la protection chimique contre les parasites bactériens et les protozoaires, et contre les animaux prédateurs tels que les insectes et les nématodes, et contre les plantes concurrentes, et joue également un rôle de défense contre la sécheresse excessive. (**Vasilios et Frankos, 2005**). Les énantiomères de l'acide (+)-usniques ont des herbicides naturels sélectifs en raison de leur action bloquante sur certaines enzymes clés spécifiques des plantes. Des autres propriétés reconnues de l'acide usnique sont l'absorption des UV et antiseptique (**Cocchietto et al., 2002**).

## **II.7. Effets biologiques de l'acide usnique**

L'acide usnique est l'un des métabolites secondaires des lichens le plus connus qui possède plusieurs activités et propriétés biologiques comme :

### **II.7.1. Activité antibactérienne**

L'acide usnique a une bonne activité biologique antibiotique, et le spectre antimicrobien de l'acide usnique est principalement composé de bactéries gram-positives et de *bacilles tuberculeux* (**Luzina et Salakhutdinov, 2018**).

Des études sur les effets de différentes concentrations d'acide usnique sur la croissance des cultures de quelques espèces bactériennes, les bactéries gram positives, c-à-d, *bacille subtilis* et *Staphylococcus aureus*, sont sensibles, et leur croissance est empêchée par l'acide usnique, d'autre part, les bactéries gram négatives tels que *E. coli* en général, sont considérés comme insensible à l'acide usnique (**Maciag-Dorszyńska et al., 2014**).

**II.7.2. Activité anti-inflammatoire**

L'inflammation est la réponse de l'organisme à des antigènes étrangers ou à des lésions tissulaires pouvant entraîner une perte de la structure et de la fonction des tissus (**Wang et al., 2022**).

L'activité anti-inflammatoire de l'acide usnique est mise en évidence sur l'œdème de patte induite par la *carrageenan* sur un rat de laboratoire, les résultats obtenus dépendent de la concentration de l'acide usnique et son efficacité est comparable à celle de l'ibuprofène (médicament très utilisé pour le traitement de cette maladie) (**Vijayakumar et al., 2000**).

**II.7.3. Activité antivirale**

Shtro AA *et al.*, (2015) ont démontré une activité anti-grippale potentielle (virus de la grippe A) des dérivés de l'acide usnique, dont l'un était le composé valine énamine. Ce composé ne stimule pas la sélection de souches résistantes et son hépatotoxicité a été réduite comparativement à UA. Ces résultats ont été confirmés par des études *in vitro* et *in vivo*. La première est basée sur la capacité des dérivés de l'acide usnique à diminuer le titre viral des cellules Madin – Darby Canine Kidney, la seconde est basée sur une réduction de la mortalité et un indice de protection (activité modérée de 60%) (**Shtro et al 2015**).

**II.7.4. Activité analgésique et antipyrétique**

Des études sur les effets analgésiques et antipyrétiques de l'acide usnique ont été évalués : à une dose orale de 100 mg/kg, l'acide usnique a présenté un effet analgésique significatif, à des doses orales allant jusqu'à 300 mg/kg, l'acide usnique a également exprimé une activité antipyrétique significative déterminée par l'hyperthermie induite par les lipopolysaccharides (**Guo et al., 2008**).

**II.7.5. Activité antioxydante**

Odabasoglu *et al.*, (2006), ont rapporté que l'acide usnique possède un effet antioxydant lorsqu'il est utilisé contre les ulcères induits par l'indométacine dans l'estomac du rat. L'effet antioxydant de l'acide usnique est sans aucun doute lié à la capacité d'effectuer le piégeage des radicaux peroxydes, de réduire les radicaux hydroxyles et de diminuer la synthèse de nitrite (**Odabasoglu et al., 2006**). Rabelo *et al.*, (2012), ont ajouté que cet effet est lié à la capacité de l'acide usnique à augmenter la synthèse intracellulaire de ROS dans ces cellules (**Rabelo et al., 2012**).

**II.7.6. Activité anti-tumorale et anti-cancer**

Les mécanismes antitumoraux de l'acide usnique peuvent être résumés comme l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales, l'induction de l'apoptose et l'inhibition de l'angiogenèse tumorale (Wang *et al.*, 2022).

L'acide usnique peut être associé à la diminution de la viabilité, de l'apoptose et de l'inhibition du cycle cellulaire des cellules tumorales et peut induire un arrêt de G1 dans les lignées cellulaires de carcinome gastrique humain BGC823 (Geng *et al.*, 2018), la cellule de carcinome pulmonaire humain A549 (Singh *et al.*, 2013), lignée cellulaire de cancer du sein humain MCF7 et lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine LNCaP (Eryilmaz *et al.*, 2018), et arrêt G2 dans les lignées cellulaires de carcinome gastrique humain SGC7901 (Geng *et al.*, 2018).

**II.7.7. Filtre UV**

Au cours des dernières années, les produits naturels à base de plantes et de lichens ont montré un effet solaire potentiel car ils peuvent absorber la lumière UV et avoir un pouvoir antioxydant. Lorsque la capacité de l'acide usnique à filtrer la lumière UV et à en protéger a été évaluée dans des études *in vivo* et *in vitro*, il a été constaté que l'UA est l'un des meilleurs filtres UVB par rapport à un écran solaire (Alahmadi, 2017).

Le facteur de protection, ainsi que la bonne absorption de la lumière UV, suggèrent que l'acide usnique peut être utile comme nouveaux filtres dans les préparations de protection solaire (Rancan *et al.*, 2002).

**II.8. Disponibilité et utilisation commerciale de l'acide usnique**

Une forme fortement purifiée d'acide usnique isolé à partir du genre *Usnea* est disponible dans le commerce. Sous sa forme purifiée, l'acide usnique a été formulé dans des crèmes, dentifrice, collutoire, désodorisants et des produits solaires (Vasilios et Frankos, 2005).

En Allemagne, les extraits des lichens utilisés dans des produits pharmaceutiques et de beauté ils sont lancés sur le marché sous les marques Omnigran A, Granobil, et Usnagren A et T. En Italie, l'acide usnique a été employé dans les crèmes vaginales, crèmes pour les pieds, les poudres, et les shampoings des cheveux. En Argentine, *Usnea densirostraa* été vendu pour traiter beaucoup de maux. Dans les années récentes, l'acide usnique est utilisé comme suppléments alimentaires pour la réduction du poids (Vasilios et Frankos, 2005).

Même avec de bonnes informations scientifiques, il est difficile de confirmer l'utilisation et l'innocuité de l'AU, en raison de la limitation des études pharmacologiques précliniques. De plus, la recherche toxicologique pour soutenir la sécurité n'est pas suffisante. Par conséquent, d'autres études sont nécessaires pour déterminer l'efficacité et l'innocuité de l'AU (**Alahmadi, 2017**).

# **Partie 2 : partie expérimentale.**

# **Chapitre III**

## **Matériel et méthodes**

## III.1. Présentation du site d'échantillonnage

## III.1.1. Présentation de Parc National de Taza

Le Parc National de Taza, situé dans la partie Nord-est de l'Algérie, faisant partie de la petite Kabylie des Babors, s'ouvre sur la Méditerranée dans le golf de Bejaia sur 9 km de côte. Situé entièrement dans la Wilaya de Jijel et s'étend sur deux daïras (El-Aouana et Ziama Mansouriah) incluant trois communes (celle d'El-Aouana, celle de Selma Benziada qui couvre plus de 50 % du territoire du Parc National de Taza et celle de Ziama Mansouriah) (Figure 08). Il est localisé à 30 km à l'Ouest du chef-lieu de la wilaya, à 60 km à l'Est de Bejaia et à 100 km au Nord-est de Sétif. Le Parc National de Taza a été créé en 1984 sur une superficie totale de 3807 ha, il s'étend entre les coordonnées géographiques 36° 35' et 36° 48' latitude Nord et entre 5° 29' et 5° 40' longitude Ouest.



Figure 08. Localisation du Parc National de Taza (PNT, 2016).

## II.1.2. Biodiversité lichénique du Parc National de Taza.

Outre sa diversité floristique (872 espèces), et faunistique (953 espèces), le PNT constitue un milieu favorable à la propagation et le développement d'une flore lichénique exceptionnelle estimée par 60 espèces répartissent en 26 genres et 18 familles dont la dominance de la famille des Parmeliacées avec un seul Genre *Parmelia* (Salem, 2013). La présence d'une forêt ancienne en haute altitude offre les meilleures phorophytes (*Quercus suber*, *Quercus faginea*, *Quercus afares*) pour le développement de cette flore.

### III.2. Matériel végétal.

#### III.2.1. Récolte et choix des espèces.

Une sortie sur le site a été réalisée au mois de juin 2023, dans la forêt de Guerrouche, située dans le Parc National de Taza, ce dernier situé dans la partie Nord-est de l'Algérie, faisant partie de la petite Kabylie des Babors.

Les prélèvements ont été effectués au niveau d'une station, située sur une altitude de 860m. Le choix des espèces se justifie par ses abondances dans la station sélectionnée dont nous avons récolté des échantillons aléatoires, et en quantités suffisantes, pour réaliser notre étude, et sans menacer leur biodiversité.

#### III.2.2. Présentation des espèces lichéniques

- *Evernia prunastri*

C'est un lichen arbustif qui affectionne les écorces d'arbres et parfois les murs. Il est très commun en zones humides et peu polluées. Il reste rare mais la facilité de sa reconnaissance nous incite à le décrire (**Boullard, 2006**).

Son thalle fruticuleux, de la famille des Usnéacées, est bien reconnaissable par son thalle gris-vert (teint liée à l'appartenance de son photobionte au genre *Trebouxia*) (**Boullard, 1997**).

- *Ramalina farinacea*

Le lichen *Ramalina farinacea*, de la famille de Ramalinacea, compte 9 genres qui se caractérisent par un thalle fruticuleux et presque ramifiée en plusieurs fourches. Peuvent être en lanières, fixé au substrat par un crampon ou des rhizines.

Le genre *Ramalina* est vert jaunâtre. Ou vert blanchâtre, généralement aplatie. Il comprend presque 200 espèces presque toutes calcifuges, ou généralement corticole ou saxicoles (**Van Haluwyn et al., 2009**).

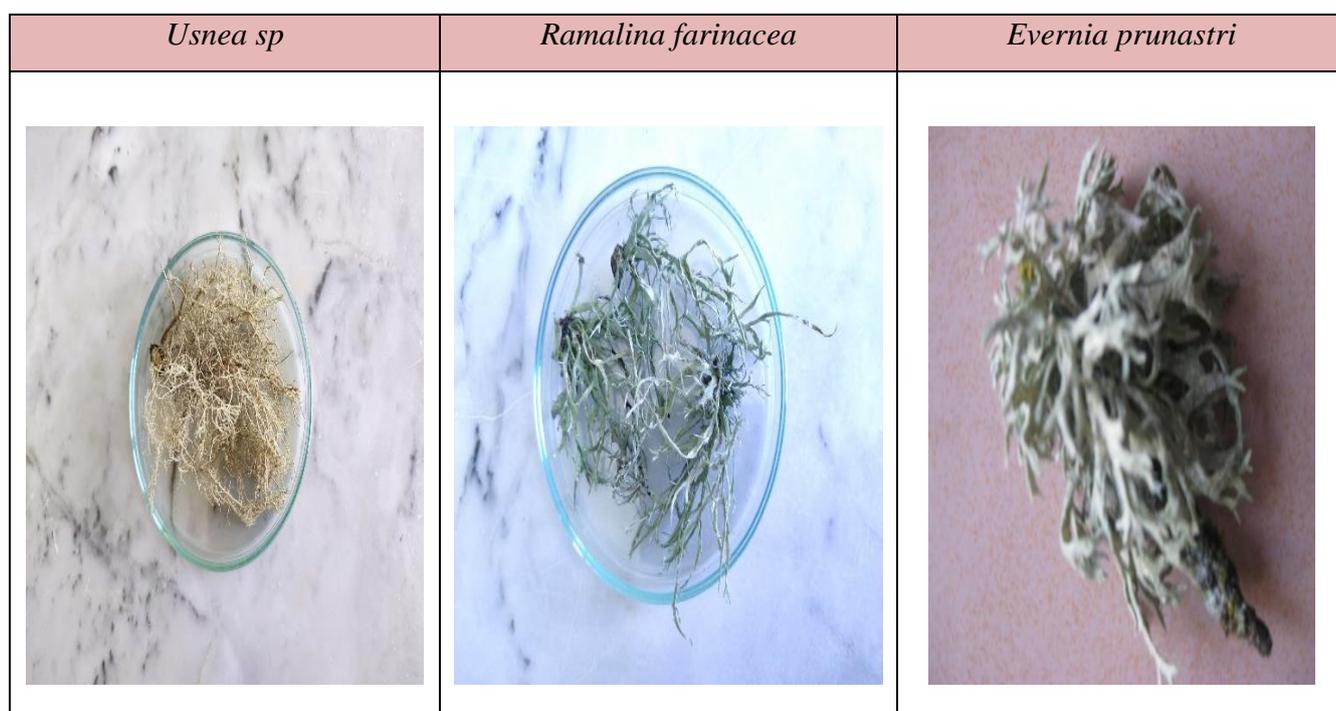
- *Usnea sp*

Les espèces de ce genre sont des lichens fruticuleux, présentant des ramifications filamenteuses, le plus souvent de couleur verte. Les filaments varient en fonction de la pureté de l'air: courts dans les zones polluées et longs quand l'air est pur, notamment en montagne (**Kolly-Ray et Mangin-Gonze, 2016**).

### III.2.1. Préparation du matériel végétal.

Les lichens récoltés (*Usnea sp*, *Ramalina farinacea* et *Evernia prunastri* qui sont présente dans la figure 09) ont été soigneusement nettoyés, débarrassés de tout artefacts, puis séchés dans un endroit sec à l'air libre à température ambiante.

A l'aide d'un moulin électrique les thalles séchés sont broyés en poudre fine, cette étape facilite et augmente la surface de contact de la matière végétale avec le solvant.



**Figure 09.** Les espèces utilisées dans cette étude.

### III.3. Préparation de l'extrait lichénique.

#### III.3.1. Macération.

Le principe consiste à faire imprégner 1 g de poudre de lichens de l'espèce dans un volume de 10 ml du solvant (acétone), sous agitation magnétique pendant 24h, l'extraction a été répétée jusqu'à épuisement des thalles lichéniques (afin d'extraire un maximum) à température ambiante.

Les extraits obtenus sont ensuite réunis et filtrés en utilisant du papier filtre, puis concentrés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à 40°C. les extraits obtenus sont pesés et gardés au frais jusqu'à analyse.

### III.3.2. Détermination du rendement d'extraction.

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

$$R\% = (Pr/Pi).100$$

→

R : rendement d'extraction en %  
Pr : poids du résidu  
Pi : poids initial de la prise d'essai

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

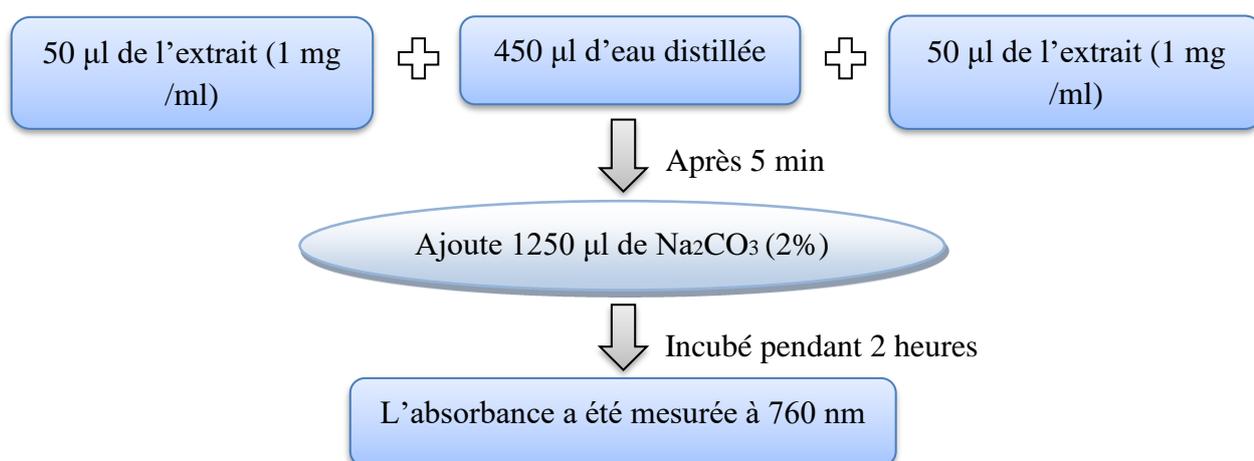
### III.4. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux de nos extraits a été déterminée par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Lamien-Meda et al., (2008)**.

- **Principe de la méthode**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Slinkard et Singleton, 1977**).

- **Mode opératoire**



La concentration des phénols totaux de nos extraits a été déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire d'acide gallique qui a été utilisé comme standard. Les résultats ont été exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de matière végétale sèche (**annexe 1**).

$$Y = 1,0019x + 0,0233$$

$$R^2 = 0,987$$

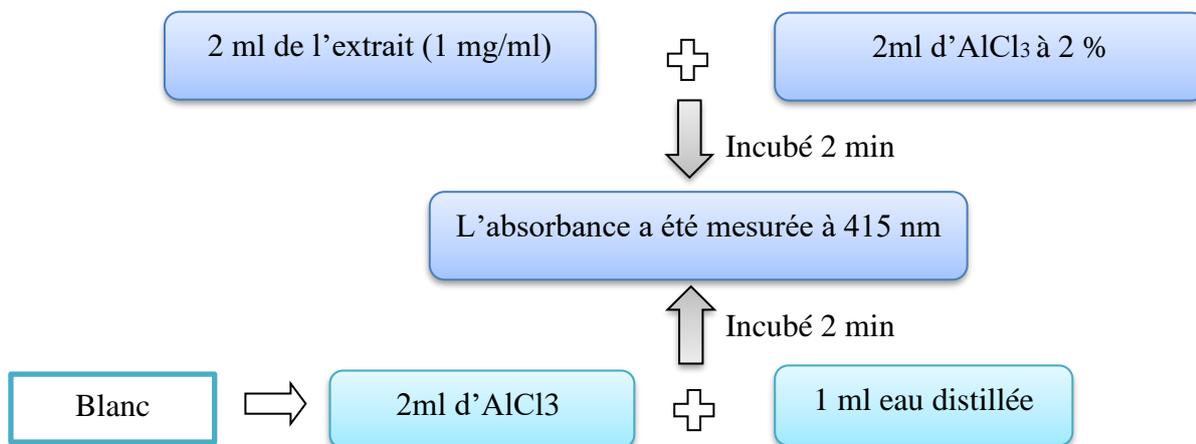
### III.5. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des fractions obtenues a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) décrite par **Oyaizu., (1986)**.

- **Principe de la méthode**

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

- **Mode opératoire**



La détermination des teneurs en flavonoïdes dans nos extraits a été faite en utilisant l'équation de la régression linéaire du flavonoïde standard, la quercétine. Les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalent de quercétine par milligramme de matière végétale sèche (**annexe 2**).

$$Y = 0,1755x + 0,0889$$

$$R^2 = 0,9933$$

### III.6. Evaluation de l'activité antioxydante

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

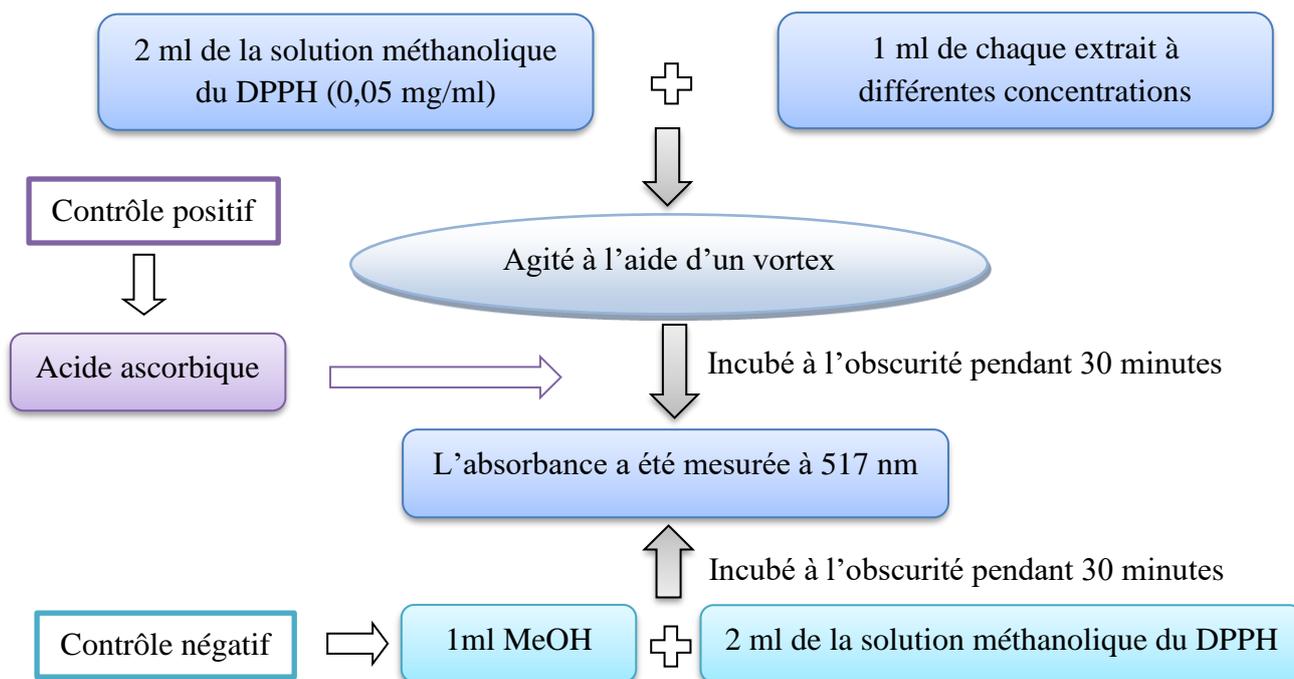
III.6.1. Test de piégeage du radical libre DPPH<sup>\*</sup>

Le test antioxydant a été réalisé avec la méthode au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH) décrite par **Dorman *et al.*, (2004)**.

- **Principe**

Le test DPPH est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. Il se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH<sup>\*</sup> donne lieu à une coloration violet foncé de la solution. La réduction des radicaux DPPH<sup>\*</sup> par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution. Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou d'un extrait de plante peut être déterminé (**Molyneux, 2004**).

- **Mode opératoire**



Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

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

Où :

**I %** : Pourcentage d'inhibition,

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

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

- Calcule le concentrations inhibitrice 50 (IC50)

IC50 est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et le standard utilisé (Acide ascorbique).

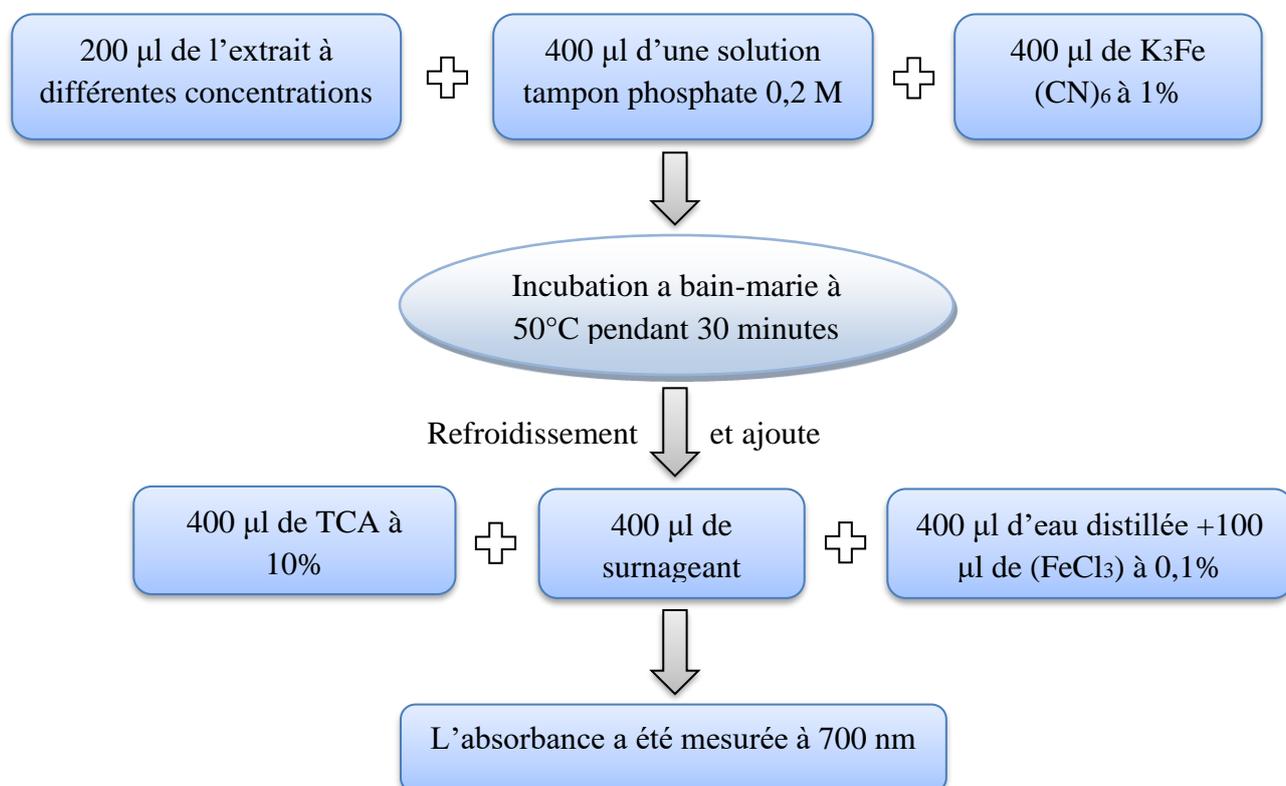
### III.6.2. Pouvoir réducteur (Test de la réduction du fer (FRAP))

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

- Principe

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de  $\text{Fe}^{3+}$  complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, le  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (Diaz *et al.*, 2011).

- Mode opératoire



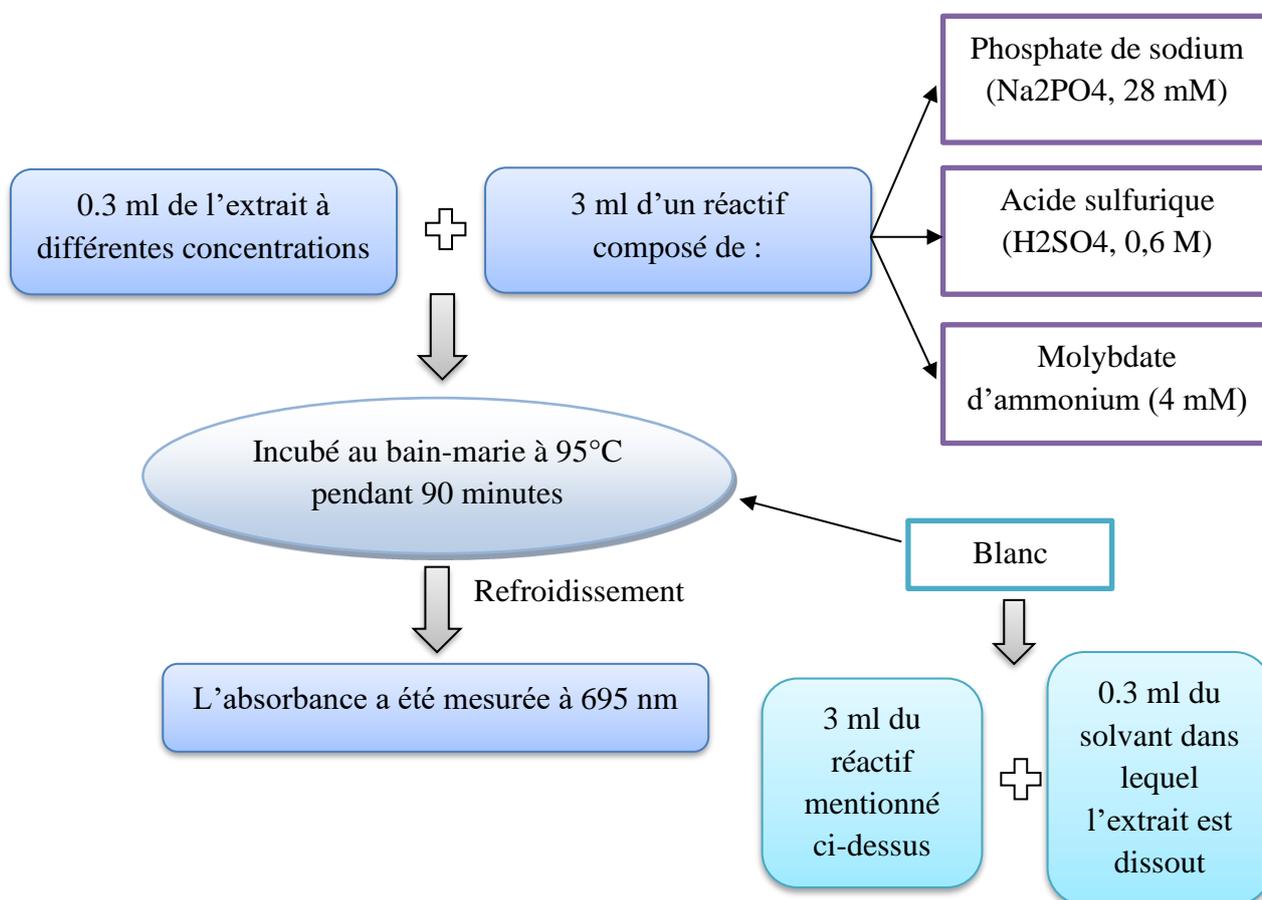
Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

### III.6.3. Capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate » ou « CAT »

#### • Principe

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate  $\text{MoO}_4^{2-}$  à molybdène Mo (V)  $\text{MoO}_2^+$  en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/Mo (V)) à un PH acide. On mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant (Prieto *et al.*, 1999).

#### • Mode opératoire



### III.7. Analyse des extraits par Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses par chromatographie sur couche mince visent à confirmer l'identification des espèces à l'aide de la mise en évidence des différents molécules caractéristiques des espèces ciblées. Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium contenant le gel de silice. Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées

avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants.

- **Principe**

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium (Mechernene, 2014).

- **Mode opératoire**

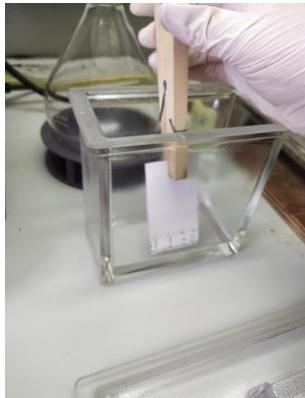
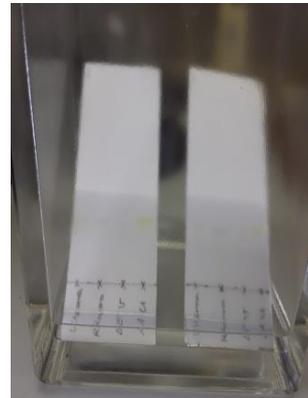
1- Préparation de la phase mobile (l'éluant) : le système des solvants est constitué de toluène 100ml et acide acétique 30ml. On a rempli la cuve avec l'éluant à environ 0.5 cm d' hauteur d'éluant et on a fermé la cuve.

2- Préparation de la phase stationnaire : On a utilisé la plaque en aluminium recouvertes de gel de silice sur celle-ci on a tracé au crayon un trait à 1,5 cm du bas de la plaque (ligne de dépôt), Sur ce trait on a tracé 4 petits points où seront déposés une goutte de chaque extraits acétonique (extraits acétonique de *Usnea sp*, *Ramalina farinacea*, *Evernia prunastri* et le standard acide usnique) des lichens récoltés, sur chaque point à l'aide d'une pipette pasteur.

3- La plaque est ensuite déposée verticalement dans la cuve et refermée puis on laisse l'éluant diffuser.

4- Lorsque le solvant a atteint les  $\frac{3}{4}$  environ de la hauteur de la plaque (1,5 cm du bord supérieur), on a enlevé cette dernière de la cuve, laissé sécher. Les spots de séparations n'est pas observé à la lumière visible. Les chromatogrammes sont ensuite examinés sous UV (à 254 et à 365nm) et les spots observés ont été entourés l'aide d'un crayon. La couleur des bandes sous UV a été notée et le front servira pour calculer le rapport frontal (Rf).

5- Le résultat de chromatogrammes sont ensuite révélés par vaporisation d'une solution révélateur anhydride acétique (1%), Ce réactif est vaporisé sur la plaque CCM qui est ensuite chauffée.

Extraies acétoniques.	Dépôt d'une goutte de chaque extrait acétonique.	Dépôt de la plaque verticalement dans la cuve.	Le solvant a atteint les $\frac{3}{4}$ environ de la hauteur de la plaque.
			

**Figure 10** : les étapes de la Chromatographie sur couche mince (CCM).

### III.7.1. Paramètres mesurés

Les spots sont repérés et les distances parcourues sont mesurées, les rapports frontaux (Rf) sont calculés par l'équation suivante :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par l'eluan}}$$

### III.8. Analyse statistique

Tous les tests sont répétés trois fois, les résultats sont donnés sous forme de moyennes  $\pm$  écart type. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant SPSS 21.0 (SPSS. Armonk, NY : IBM Corp.) et le test ANOVA à un facteur, ce dernier nous donne le degré de signification P où on dit la différence :

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

# **Chapitre IV**

## **Résultats et discussions**

## IV-Résultats et discussion

## IV.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction acétonique est exprimé en pourcentage (%), il est calculé à partir du poids du résidu sec obtenu après évaporation sous vide et la prise d'essai initiale, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous.

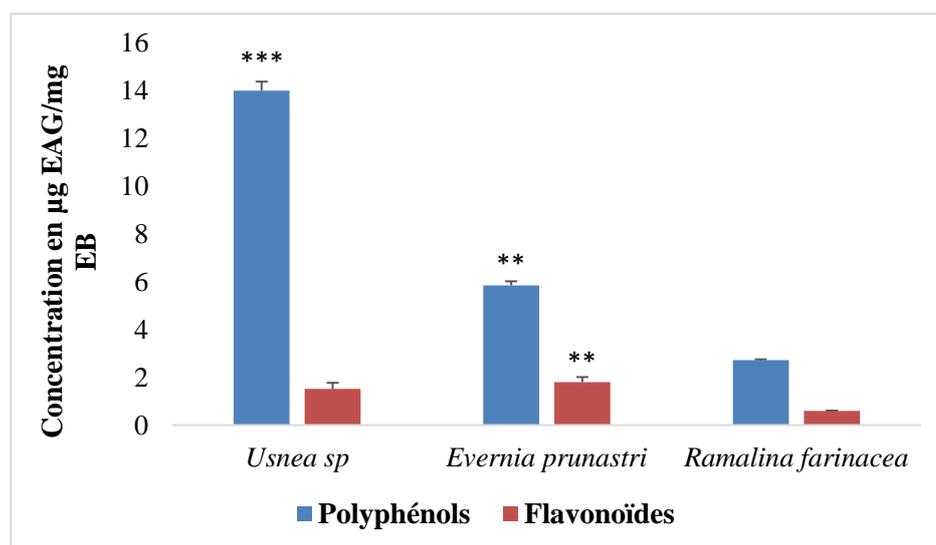
**Tableau 01** : Rendement d'extraction.

Espèces	Poids initial des thalles(g)	Masses des extraits obtenus (g)	Rendement d'extraction (%)
<i>Usnea sp</i>	2,45	0,127	5,18 %
<i>Evernia prunastri</i>	1,7	0,105	6,18 %
<i>Ramalina farinacea</i>	1,54	0,037	2,40 %

Le rendement d'extraction le plus élevé est noté chez *Evernia prunastri* (5,18 %), alors que celui le plus faible est noté chez *Ramalina farinacea* (2,40 %).

## IV.2. Détermination de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes chez les trois lichens

La teneur en polyphénols totaux de nos extraits est exprimée en ( $\mu\text{g}$ ) équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait brut ( $\mu\text{g Eq AG/mg EB}$ ), tandis que la concentration des flavonoïdes est déterminée en ( $\mu\text{g}$ ) équivalent de la quercétine par milligramme de l'extrait brut ( $\mu\text{g Eq Q/mg EB}$ ), les résultats obtenus sont représentés dans la figure 11.



**Figure 11** : Teneur en phénols totaux et flavonoïdes dans les 3 échantillons.

D'après les résultats mentionnés dans la Figure 11 on constate que :

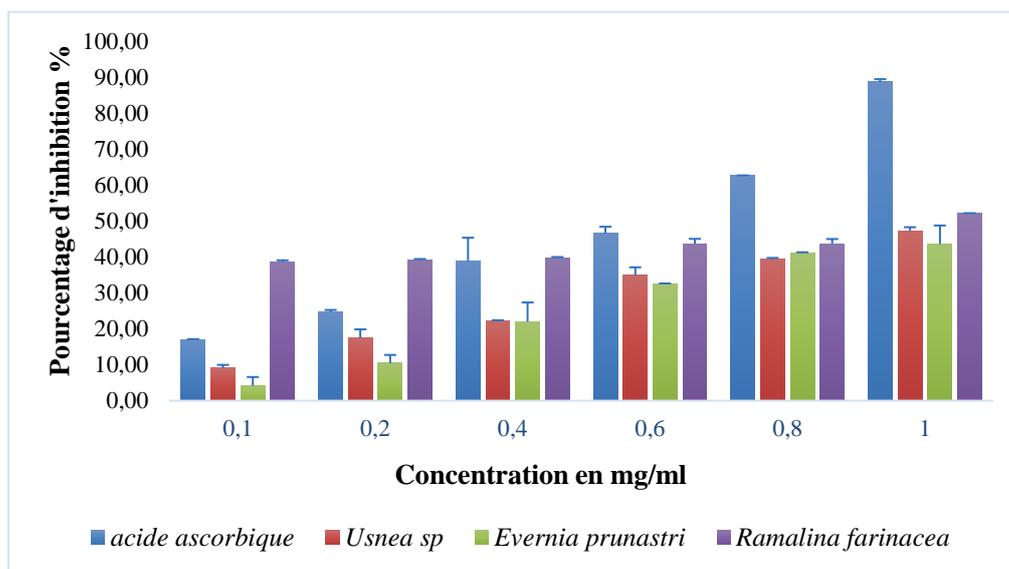
- le lichen *Usnea sp* a la concentration en polyphénols totaux la plus élevée (14,003  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) alors que *Ramalina farinacea* enregistre la quantité la plus faible (2,723  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

- *Evernia prunastri* présente la quantité la plus élevée en flavonoïdes avec 1,799  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , suivi du lichen *Usnea sp* avec 1,799  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , tandis que la plus faible concentration est notée chez le lichen *Ramalina farinacea* (0,59  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

- Statistiquement il y a une différence hautement significative entre les trois extraits lichéniques.

### IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante

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



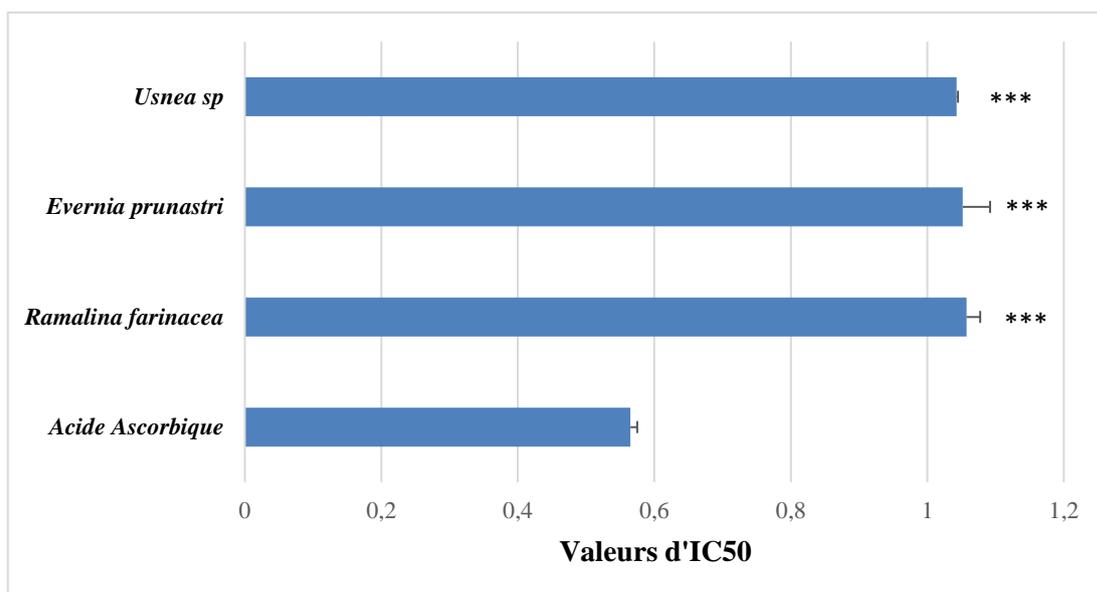
**Figure 12 :** Pourcentage d'inhibition du DPPH pour les trois extraits et l'acide ascorbique.

D'après la figure (12), les pourcentages d'inhibition du radical DPPH varient entre 9,07% et 47,23% pour l'extrait acétonique de *Usnea sp*, entre 4,17% et 43,60% pour l'extrait de *Evernia prunastri*, et entre 38,49% et 52,04% pour l'extrait de *Ramalina farinacea*. Ces valeurs sont inférieures à celles du standard. L'acide ascorbique enregistre un taux d'inhibition maximal de l'ordre de 88,67% à la concentration 1mg/ml. Nos extraits présentent un pouvoir antiradicalaire modéré par rapport à l'acide ascorbique, l'analyse statistique montre une variation hautement significative entre les taux d'inhibitions du standard et ceux des extraits lichéniques.

À partir des résultats obtenus nous constatons que les extraits piègent d'une manière différente les radicaux libres DPPH le pouvoir scavenger est variable d'un échantillon à l'autre et d'une concentration à l'autre.

- Calcul des IC50

Pour comparer le pouvoir anti-radicalaire des extraits lichéniques, nous avons calculé l'IC50 ce paramètre exprime la concentration requise pour inhiber ou piéger 50% du radical DPPH dans le milieu, Il est déterminé graphiquement par la régression linéaire établie entre les pourcentages d'inhibition et les différentes concentrations de l'échantillon et du standard (acide ascorbique) (Annexe 2). La concentration inhibitrice 50% est exprimée en (mg/ml).



**Figure 13 :** Valeur d'IC50 de l'extrait testé et de l'acide ascorbique.

\* : Comparaison du contrôle (AcAs) avec les trois espèces.

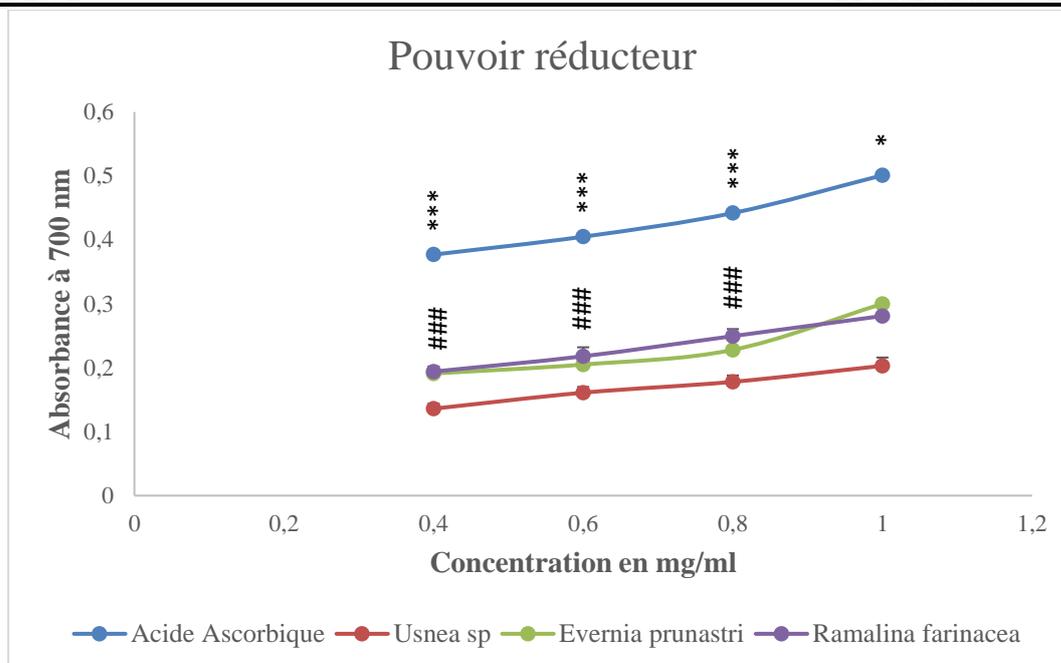
Selon les résultats mentionnés dans la figure (13), l'acide ascorbique utilisé comme molécule de référence, enregistre la plus faible IC50, qui nécessite une concentration de l'ordre de 0,565 mg/ml pour piéger 50 % des radicaux libres DPPH dans le milieu.

Statistiquement, il existe une différence significative dans l'inhibition du radical DPPH entre l'acide ascorbique et les 3 échantillons (\* $p < 0,001$ ).

Les trois extraits lichéniques nécessitent presque la même concentration (1,05 mg/ml) pour piéger 50% du radical DPPH, l'analyse statistique confirme qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois lichens dans l'inhibition du radical.

#### IV.3.2. Pouvoir réducteur (FRAP)

Les pouvoirs réducteurs des extraits et du standard (Acide ascorbique) sont testés aux différentes concentrations, allant de 0,4 à 1mg/ml. Les valeurs des absorbances obtenues sont illustrées dans la figure 14, l'acide ascorbique est utilisé comme standard.



**Figure 14 :** Pouvoir réducteur des extraits lichéniques.

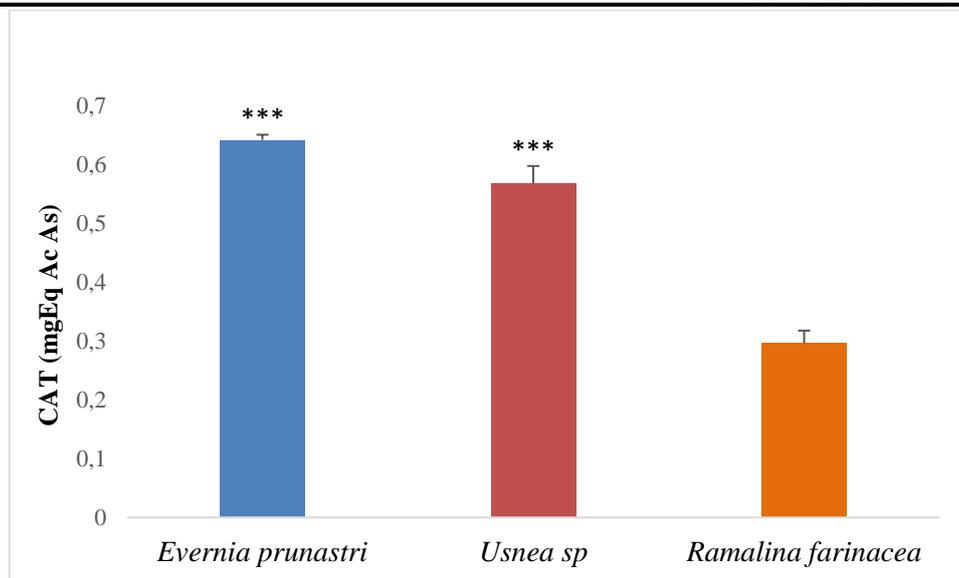
\* : Comparaison entre le contrôle (AcAs) et les trois espèces. # : Comparaison entre les trois extraits.

Les résultats illustrés dans la figure ci-dessus indiquent que la capacité réductrice de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits et de l'acide ascorbique. Cependant l'augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé (**Kosanić et Ranković, 2011**).

L'analyse statistique montre qu'il y a une différence significative entre les trois espèces vis-à-vis leur capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux, l'extrait acétonique de *Ramalina farinacea* et celui d'*Evernia prunastri* exercent une bonne activité réductrice par rapport à celle de l'extrait acétonique du lichen *Usnea sp*. Leur capacité à réduire le  $Fe^{+3}$  est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique cela est confirmé par l'analyse statistique (\*\*\*) $p < 0,001$ .

#### IV.3.3. Capacité antioxydante totale (CAT)

La Capacité Anti oxydante Totale permet la détermination de la quantité des espèces anti-oxydantes existantes dans les extraits lichéniques. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de l'extrait brut (mg Eq Ac As).

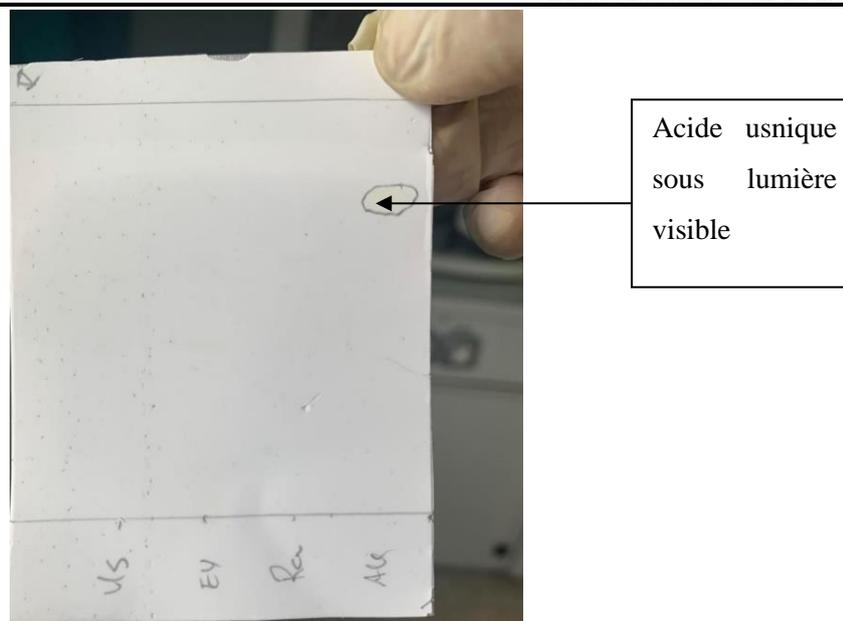


**Figure 15 :** Capacité anti-oxydante totale des extraits lichéniques.

Les résultats indiquent que pour 1mg/ml d'extrait, le lichen *Evernia prunastri* a la capacité antioxydante la plus élevée avec une valeur de 0,642 mg/Eq AC As suivi du lichen *Usnea sp* avec 0,568 mg/Eq AC As, tandis que *Ramanila farinacea* a montré la capacité antioxydante la plus faible avec une valeur de 0,297 mg/Eq AC As. Statistiquement il existe une différence significative (\*\*\*) entre les trois extraits lichéniques.

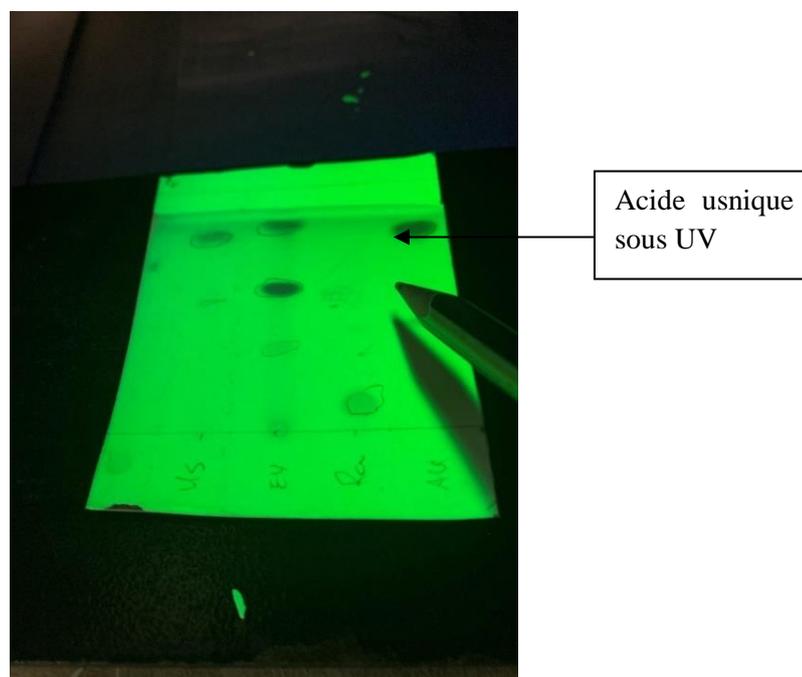
#### IV.4. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince des extraits acétonique des trois lichens (*Ramalina farinacea*, *Usnea sp*, *Evernia prunastri*) sous la lumière visible et sous UV avant et après révélations par l'anhydride acétique, sont illustrés dans les figures (16), et (17). Pour détecter l'acide usnique au sein des trois lichens, nous avons utilisé la molécule pure de l'acide usnique comme standard, en comparant les rapports frontaux.



**Figure 16 :** Chromatogrammes des extraits acétoniques des lichens sous la lumière visible (LV).

Le standard utilisé dans cette analyse présente une seule migration (un seul spot) avec un ( $R_f = 0,758$ ), ce rapport frontal est caractéristique de l'acide usnique, qui apparait sous forme d'une tache jaune sous la lumière visible chez les deux lichens à savoir *Evernia prunastri* et *Usnea sp.*



**Figure 17 :** Chromatogrammes des extraits acétoniques des lichens étudiés sous UV.

Tableau 02 : Résultats des rapports frontaux des spots obtenus par CCM des extraits acétoniques.

Espèces	Les rapports frontaux
Acide usnique	<b>0,758</b>
<i>Ramalina farinacea</i>	0,097
<i>Evernia prunastri</i>	0,290
	0,532
	<b>0,770</b>
<i>Usnea sp</i>	0,516
	<b>0,758</b>

L'analyse par chromatographie sur couche mince des extraits acétoniques sous l'UV (figure 17) donne trois profils chimique distincts, cette variabilité est présentée par le nombre de spots ou de migration au sein de chaque extrait, aussi bien par la nature des molécules détectées (rapports frontaux différents).

L'acide usnique apparait sous forme d'un seul spot, détecté à 254 nm et 365 nm sous UV avec un rapport frontale égale à 0,758.

L'extrait lichénique de *Ramalina farinacea* comporte un seul spot avec un rapport frontal égal à 0,097, nous constatons que *Ramalina farinacea* comporte un seul composé qui est apparu sous UV sous forme d'une tache pourpre. On suggère l'absence de l'acide usnique chez ce lichen.

Tandis que l'extrait acétonique d'*Evernia prunastri* comporte trois substances distinctes avec des Rf différents, deux composé non identifiées, spot (Rf=0,290) et spot (Rf=0,532), l'acide usnique est facilement détecté en comparant son Rf (0,770) à celui du standard (Rf=0,758).

Ensuite l'analyse chimique par CCM de l'extrait acétonique du lichen d'*Usnea sp* révèle la présence de deux substances dans sa composition avec des Rf différents. L'acide usnique est facilement identifié chez *Usnea sp*, son Rf est égal à celui de la molécule de référence (Rf=0,758).

## VI.5. Discussions

Les extraits naturels des lichens contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées à diverses activités biologiques (Illana-Esteban, 2012). Dans ce travail on a étudié le teneur en phénols totaux et en flavonoïdes totaux des trois extraits acétoniques des trois lichens à savoir : *Usnea sp*, *Evernia prunastria*, *Ramalina farinacea*.

D'après les résultats obtenus l'extrait acétonique d'*Usnea sp* est le plus riche en polyphénols totaux avec concentration de 14,003 µg EAG/mg EB, cette valeur est inférieure à celle mentionnée chez *Evernia prunastri* dans les travaux de Kosanić *et al.*, (2013) qui est de l'ordre de 34,05 µg EAG/mg EB. Nous constatons ainsi l'extrait acétonique le plus riche par les flavonoïdes est l'extrait d'*Evernia prunastria* avec concentration de 1,799 µg EAG/mg EB, qu'il est inférieurs à celle trouvée par Mitrovic *et al.*, (2011), qui est de l'ordre 27.46µg EQ/mg EB pour la même espèce. Le contenu phénolique d'un extrait lichénique dépend de la nature de l'espèce, les conditions dans lesquelles l'extraction est faite, le solvant utilisé, ainsi que la méthode d'extraction Behera *et al.*, (2009).

Selon Yamamoto *et al.*, (2015), Ganesan *et al.*, (2015) et Plaza *et al.*, (2014), les composés phénoliques sont l'une des plus grandes classes de biomolécules, qui peuvent être exploré dans diverses activités, notamment les activités antioxydantes.

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus lors du test DPPH, révèlent que les extraits acétoniques testés sont capable de piéger les radicaux libres de DPPH et de réduire de fer d'une manière concentration dépendante.

Le pouvoir anti-radicalaire de nos échantillons est ainsi traduit par les IC50, les valeurs obtenues sont supérieures à celle de l'antioxydant de référence (acide ascorbique). La concentration inhibitrice 50 du lichen *Evernia prunastri* est de l'ordre de 1,052 mg/ml cette valeur est supérieure à celle mentionné dans les travaux de Boudjellal *et al.*, (2017) qui est de l'ordre de 0,041 mg/ml pour la même espèce, et l'étude réalisée par Kosanović *et al.*, (2013), a mis en évidence le fort pouvoir scavenger du lichen *Evernia prunastri*, dont il a été enregistré une IC50 égale à 0,66 mg/ml. L'IC50 de *Usnea sp* égal 1,058 mg/ml cette valeur est supérieure à celle mentionné dans les travaux de Maulidiyah *et al.*, (2023) qui est de l'ordre de 0,018 mg /ml pour l'extrait méthanolique de même espèce.

*Ramalina farinacea* enregistré IC50 à l'ordre de 1,043 mg/ml qui est supérieure à celle mentionné dans les travaux de **Aoussar et al., (2020)**.

La présence des réducteurs notamment les polyphénols dans les extraits de plante provoque la réduction de fer ferrique Fe<sup>+3</sup> en fer ferreux Fe<sup>+2</sup>. Par conséquent, la puissance de réduction est un des mécanismes antioxydants (**Karagozler et al., 2008**), qui est mesurée par l'intensité de la bleu-vert résultante solution qui absorbe à 700 nm par spectrophotométrie (**Gordan, 1990**).

A partir des résultats obtenus, l'acide ascorbique possède une activité réductrice plus importante que celle notée pour les extraits lichéniques, l'extrait de *Usnea sp* possède l'activité réductrice la plus faible par rapport aux deux autres extraits.

Selon **Kosanic et al., (2012)** la forte activité antioxydante des extraits de lichen testés est corrélée à la teneur élevée en phénols totaux, mais certains auteurs pensent que l'activité antioxydante des extraits n'est pas nécessairement corrélée à la quantité des polyphénols (**Odabasoglu et al., 2004**), suggérant que l'activité antioxydante de différents lichens peut également dépendre d'autres composants non phénoliques. Cela est en accord avec nos résultats car le lichen *Usnea sp* qui a la quantité la plus élevée en composés phénolique possède le pouvoir réducteur le plus faible.

D'une manière générale, la capacité antioxydante est connue pour être associée à l'espèce, au solvant d'extraction, à la méthode d'extraction, à la température, aux conditions des systèmes testés, à la composition de l'extrait et à la nature hydrophobe ou hydrophile des antioxydants (**Kumar et al., 2014**).

Les valeurs de la capacité antioxydante totale (CAT) de nos échantillons (*Usnea sp* = 0,568 mg/g, *Evernia prunastri* = 0,642 mg/g et *Ramalina farinacea* = 0,297 mg/g), sont supérieures à celle trouvée par **Stojanović et al., (2010)** qui est de l'ordre 0,0355 mg/g chez l'espèce d'*Evernia prunastri*. On suppose que le potentiel antioxydant des extraits phénoliques peut être lié essentiellement à la richesse des extraits en polyphénols, mais et aussi à la nature chimique des molécules bioactives.

La méthode de chromatographie sur couche mince a été pour identifier l'acide usnique au sein de nos échantillons. Nous l'avons pu le mettre en évidence chez *Evernia prunastri* et *Usnea sp*, et son absence à *Ramalina farinacea*, la détection de l'acide usnique a été effectuée en comparant son rapport frontal avec celui de la molécule pure de l'acide usnique.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Hamzaoui et al. (2016)** qui ont confirmé la présence de l'acide usnique chez *Evernia prunastri*, par la même méthode chromatographique (CCM).

L'étude réalisée par **Cansaran et al., (2006)**, indique la présence de l'acide usnique dans la composition chimique de plusieurs espèces du genre *Usnea*, ce qui est en accord avec les résultats obtenus. Tandis que **Stocker-Wörgötter et al., (2004)** **Hamzaoui et al., (2016)** ont pu identifier l'acide usnique chez *Ramalina farinacea* par deux méthodes chromatographiques distinctes, la CCM et l'HPLC.

# **Conclusion**

Les lichens de la provenance algérienne sont moins étudiés mais suscitent un grand intérêt en raison des composés bioactifs qu'ils synthétisent, permettant ainsi de mettre au point de nouvelles voies d'application dans les domaines de la pharmacie, de la cosmétique et de l'agroalimentaire.

L'analyse phytochimique nous a permis de constater la richesse des trois lichens en composés phénoliques, une méthodologie de travail a été mis en place afin de réaliser :

- Une extraction classique menée sur les thalles lichéniques broyés et séchés permettait la quantification et le dosage du contenu phénolique des lichens sélectionnés
- ii. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits via trois tests différents (test DPPH, et test FRAP et la CAT)
- L'identification de l'acide usnique a été effectuée par chromatographie sur couche mince ou CCM.

La quantification des phénols totaux des trois extraits acétoniques a été effectuée par la méthode spectrophotométrique, en utilisant le réactif du Folin-Ciocalteu, tandis que la teneur en flavonoïdes totaux a été réalisée par la méthode du trichlorure d'aluminium.

Les résultats obtenus montrent que *Usnea sp* possède la teneur la plus élevée [ $14,003 \pm 0.382$ ]  $\mu\text{g EAG/mg EB}$  par rapport aux deux autres espèces (*Evarnia prunastri* [ $5,852 \pm 0.171$ ], *Ramalina farinacea* [ $2,723 \pm 0,032$ ]  $\mu\text{g EAG/mg EB}$ ). Le lichen *Evarnia prunastri* a la quantité la plus élevée en flavonoïdes totaux avec une valeur de l'ordre de [ $1,799 \pm 0,212$ ]  $\mu\text{g EAG/mg EB}$ .

Nos extraits sont actifs contre les radicaux libres DPPH, cette activité varie d'une espèce à l'autre. L'activité antioxydante est exprimée ainsi par les IC50 obtenues graphiquement et qui révèlent d'autre part la puissance anti-radicalaire de nos échantillons, néanmoins ce pouvoir est moins important à celui du standard (acide ascorbique).

Le pouvoir réducteur du fer ferreux  $\text{Fe}^{+3}$  en sel de fer des extraits étudiés est plus élevé chez *Evarnia Prunastri* (0,3 mg/ml).-L'acide ascorbique est utilisé comme standard.

Par ailleurs, l'étude de La capacité antioxydante totale (CAT), de nos extraits montre que l'extrait acétonique d'*Evarnia prunastri* a la capacité antioxydante la plus élevée estimée par acide ascorbique.

## **Conclusion**

L'analyse chromatographique sur couche mince nous a permis d'identifier l'acide usnique chez les deux lichens *Usnea sp* et *Evarnia prunastri* d'une part et de constater son absence chez *Ramalina farinacea* d'autre part.

A partir de ces résultats on peut savoir l'importance des lichens comme source des substances bioactives car ils jouent un rôle important dans la nature, comme la seule source de l'acide usnique.

En perspectives de recherche, il serait intéressant de poursuivre cette étude sur d'autres espèces récoltées dans différentes régions de l'Algérie. En vue d'une étude phytochimique et également d'identifier l'acide usnique dans les autres espèces lichéniques afin de quantifier la teneur de ce composé dans chaque espèce par d'autres méthodes telles que HPLC.

# Référence

- **Alahmadi A. A. (2017)**. Usnic acid biological activity: History, evaluation and usage. *Int. J. Basic Clin. Pharmacol*, 6(12), 2752-2759.
- **Amlan K., Patra A., et Jyotisna S. (2010)**. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71 :1198–1222.
- **Aoussar N., Rhallabi N., Mhand R. A., Manzali R., Bouksaim M., Douira A., et Mellouki F. (2020)**. Seasonal variation of antioxidant activity and phenolic content of *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(1), 1-6.
- **Aprile G. G., Catalano I., Migliozi A., et Mingo A. (2011)**. Monitoring epiphytic lichen biodiversity to detect environmental quality and air pollution: The case study of Roccamonfina Park (Campania Region–Italy). *Air Pollution-New Developments*, 227-244.
- **Araújo A. A. S., De Melo M. G. D., Rabelo T. K., Nunes P. S., Santos S. L., Serafini M. R., ... et Gelain D. P. (2015)**. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Natural product research*, 29(23), 2167-2180.
- **Aubert S., Juge C., Boisson A. M., Gout E., et Bligny R. (2007)**. Metabolic processes sustaining the reviviscence of lichen *Xanthoria elegans* (Link) in high mountain environments. *Planta*, 226, 1287-1297.
- **Bačkorova M., Bačkor M., Mikeš J., Jendželovsky R., Fedoročko P. (2011)**. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol Vitro*. 25 :37-44.
- **Bauvet C. (2020)**. Inventaire des lichens épiphytes de la carrière Joffre à la Combe de Blanc.
- **Bazin MA., Le Lamer AC., Decros JG., et al. (2008)**. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. *Bioorg Med Chem*. 16:6860-6866.
- **Behera B. C., Morey M. V., et Gaikwad, S. B. (2016)**. Anti-lipoxygenase, Radical Scavenging and Antimicrobial Activities of Lichen Species of Genus *Heterodermia* (Physciaceae). *Botanical Pacifica*. 5(1) :79-85.
- **Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U. (2009)**. Optimization of culture conditions for lichen *usneaghattensis* G. awasthi to increase biomass and antioxidant metabolite production. *Food Technol. Biotechnol*. 47, 7-12
- **Bellenfant S., Vallade J., Beguinot J., Sirugue D., et Lemmel G. (2010)**. Les lichens : une symbiose exemplaire. *Rev. sci. Bourgogne-Nature*, 12, 30-45.
- **Bjerke J. W., Joly D., Nilsen L., et Brossard T. (2004)**. Spatial trends in usnic acid concentrations of the lichen *Flavocetraria nivalis* along local climatic gradients in the Arctic (Kongsfjorden, Svalbard). *Polar Biology*, 27, 409-417.

- **Boullard B., (1997)**. Dictionnaire Plantes & Champignons, ESTEM, Paris. 465p.
- **Boullard B., (2006)**. Plantes et Arbres : Remarquable des ruex, squares et jardins de Round.PTC. 119p.
- **Boustie J., et Grube M. (2005)**. Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273-287.
- **Boustie J., Tomasi S., Grube M. (2011)**. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. *Phytochem Rev.* Vol.10, Pp.287-307.
- **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Anackov G., Igc R., (2008)**. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum*L., Alli- aceae). *Food Chemistry*. 111 :925–929.
- **Cansaran D., Kahya D., Yurdakulol E., et Atakol O. (2006)**. Identification and quantitation of usnic acid from the lichen *Usnea* species of Anatolia and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(11-12), 773-776.
- **Cardinale M., Puglia A. M., et Grube M. (2006)**. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(3), 484-495.
- **Caviglia A. M., Nicora P., Giordani P., Brunialti G., et Modenesi P. (2001)**. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (Lichenes). *Il Farmaco*, 56(5-7), 379-382.
- **Cocchietto M., Skert N., Nimis P., Sava G. (2002)**. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*. 89(4), 137-146.
- **Diaz L., De-Montijo S., Medina A., Meléndez P., Laurence V., et Marti-Mestres G. (2011)**. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* Against Acne-Inducing Bacteria, and their cytoprotective and antioxydant effects on fibroblaste. *Rev Peru Biol*, 18: 153-158.
- **Diniz T.C., Silva J.C., Lima-Saraiva S.R.J., Almeida Ribeiro F.P.R., Marques Pacheco A.G., Mendes R.L., (2015)**. The Role of Flavonoids on Oxidative Stress in Epilepsy. *Francisco Javier Romero*. 1 : 324-542.
- **Dorman H.J., Bachmayer O., Kosar M., et Hiltunen R., (2004)**. Antioxydant properties of aqueous exacts from selected lamiaceae spicies grown in Turkey. *J. Agr. Food Chem*, 52: 762-770.
- **Einarsdottir E., Groneweg J., Bjornsdottir GG., et al. (2010)**. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med*. 76:969-974.
- **Elix J. A., et Stocker-Wörgötter E. (2008)**. Biochemistry and secondary metabolites. *Lichen biology*, 104-133.
- **Engler R. (2013)**. LICHENS et AZOTE ATMOSPHERIQUE. *Bull. Ass. fr. Lichénologie*. 38(1).
- **Epard J. L., Gex P., et Vust M. (2020)**. Les blocs erratiques propriété de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles. *Bulletin De La Société Vaudoise Des Sciences Naturelles*, 99, 29-66.

## Référence

- Eryilmaz I. E., Guney Eskiler G., Egeli U., Yurdacan B., Cecener G., et Tunca B. (2018). In vitro cytotoxic and antiproliferative effects of usnic acid on hormone-dependent breast and prostate cancer cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(10), e22208.
- Fahselt D. (1994). Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis*, 16 : 117-165.
- Galanty A., Paško P., et Podolak, I. (2019). Enantioselective activity of usnic acid: A comprehensive review and future perspectives. *Phytochemistry Reviews*, 18, 527-548.
- Ganesan A., Thangapandian M., Ponnusamy P., Sundararaj J.P., Nayaka S., (2015). Antioxidant and antibacterial activity of parmelioid lichens from shevaroy hills of eastern ghats. *International journal of pharm tech research* No.9.Vol, 8. 13-23.
- Geng X., Zhang X., Zhou B., Zhang C., Tu J., Chen X., ... et Pan W. (2018). Usnic acid induces cycle arrest, apoptosis, and autophagy in gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 556.
- Goga M, Elečko J, Marcinčinová M, Ručová D, Bačkorová M, Bačkor M. (2020). Métabolites du lichen : un aperçu de certains métabolites secondaires et de leur potentiel biologique. Co-évolution des métabolites secondaires, 175-209.
- Gordan M.H. (1990). Food antioxydants. *Elsevier*, London, New York, pp. 1-18.
- Goujon M. (2004). Lichens et biosurveillance de la qualité de l'air. *Publication de l'Agence régionale de l'environnement de Haute-Normandie : connaitre pour agir*.
- Grube M., Cernava T., Soh J., Fuchs S., Aschenbrenner I., Lassek C., ... et Berg G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME journals*. 9(2) :412-424.
- Gunawan G. A., Gimla M., Gardiner M. G., Herman-Antosiewicz A., et Reekie T. A. (2023). Divergent reactivity of usnic acid and evaluation of its derivatives for antiproliferative activity against cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 117157.
- Guo L., Shi Q., Fang J. L., Mei N., Ali A. A., Lewis S. M., ... et Frankos V. H. (2008). Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 26(4), 317-338.
- Hamzaoui T., Issaadi L., et Sahmoune F. (2016). Extraction de l'acide usnique à partir de trois espèces lichéniques (*Evernia prunastri*, *Ramalina farinacea* et *Cladonia rangiformis*) et identification de ce composé par deux méthodes: la chromatographie sur couche mince et la microcristallisation (Doctoral dissertation, université de Tizi-Ouzou).
- Harouche S., Boudjellal N., et Salem S. E. (2017). *Evaluation de l'activité biologique de l'extrait brut du lichen Evernia prunastri (L.) Ach* (Doctoral dissertation, université de jijel).

- **Honegger R. (2012)**. 15 - The symbiotic phenotype of lichen-forming Ascomycetes and their endo- and epibionts. In *Fungal Associations*, B. Hock, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 287–339.
- **Huneck S., Yoshimura I., Huneck S., et Yoshimura I. (1996)**. *Identification of lichen substances* (pp. 11-123). Springer Berlin Heidelberg.
- **Illana-Esteban C. (2012)**. Liques usados en medicina tradicional. *Bol. Soc.Micol. Madrid*. 36: 163-174.
- **Ingolfsdottir K. (2002)**. Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7), 729-736.
- **Karagozler A.A., Erdag B., Emek Y.C., et Uygun D.A. (2008)**. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chem*, 111 : 400-407.
- **Kolly-Ray M., Magnin-Gonze J. (2016)**. Mousses, lichens et hépatiques du Bois de Versoix. *Bulletin du Cercle vaudois de botanique* 45 : 7-14.
- **Kosanić M., Manojlović N., Janković S., Stanojković T., Ranković B. (2013)**. Food and Chemical Toxicology. 53:112-118.
- **Kosanic M., Rankovic B., Stanojkovic T., Vasiljevic P., Manojlovic N. (2014)**. Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI Journal*.13 :1226 - 1238.
- **Kosanović D., Potočnik I., Duduk B., Vukojević J., Stajić M., Rekanović E., Milijašević-Marčić S. (2013)**. Trichoderma species on *Agaricus bisporus* farms in Serbia and their biocontrol. *Annals of Applied Biology*, 163, 218-230.
- **Lamien-Meda A., Lamien C., Compaoré M., Meda R., Kiendre-Beogo M., Zeba B., Millogo J Et Nacoulma O., (2008)**. Polyphenol content and antioxidant activity of four-teen wild edible fruits From, Burkina Faso. *Molecules*. 13 : 581-594.
- **Le Pogam-Alluard P. (2016)**. *Analyses de lichens par spectrométrie de masse : déréplication et histolocalisation* (Doctoral dissertation, Université Rennes 1).
- **Lee S., Lee Y., Ha S., Chung H. Y., Kim H., Hur J. S., et Lee, J. (2020)**. Antiinflammatory effects of usnic acid in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1730, 146642.
- **Lukač M. (2010)**. Contribution to the genus *Usnea* (Parmeliaceae) in Slovakia III: apotheciate specimens of *U. filipendula*, *U. florida*, *U. intermedia* and *U. subfloridana*. *Acta Facult Pharm Univ Comeniana*. 57:57-67.
- **Lukác M., Prokipcák I., Lacko I., et Devínsky F. (2012)**. Solubilisation (+)-usnic acid in aqueous micellar solutions of gemini and heterogemini surfactants and their equimolar mixture. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comen*, 59, 36-43.
- **Luzina O. A., et Salakhutdinov N. F. (2018)**. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: A patent review (2000–2017). *Expert opinion on therapeutic patents*, 28(6), 477-491.

- **Macedo D. C. S., Almeida F. J. F., Wanderley M. S. O., Ferraz M. S., Santos N. P. S., López A. M. Q., ... et Lira-Nogueira M. C. B. (2021).** Usnic acid: From an ancient lichen derivative to promising biological and nanotechnology applications. *Phytochemistry Reviews*, 20, 609-630.
- **Macheix J. J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Edition Presses Polytechniques & Universitaires Romandes, Suisse, p Vii, 2, 3.
- **Maciąg-Dorszyńska M., Węgrzyn G., et Guzow-Krzemińska B. (2014).** Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS microbiology letters*, 353(1), 57-62.
- **Martins M. C., Lopes R. S., Barbosa P. S., Santiago R., Rodrigues B. R., de Albuquerque A. C., ... et Pereira E. C. (2018).** Effects of usnic, barbatic and fumarprotocetraric acids on survival of *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). *Sociobiology*, 65(1), 79-87.
- **Maulidiyah M., Rachman F., La O. M. Z. M., Natsir M., Nohong N., Darmawan A., ... et Nurdin M. (2023).** Antioxidant Activity of Usnic Acid Compound from Methanol Extract of Lichen *Usnea* sp. *Journal of Oleo Science*, 72(2), 179-188.
- **Mechernene Bakhta. (2014).** Mémoire Evaluation De L'activité Antioxydante De Quelques Extraits De La Racine De Bryonia Dioica.
- **Mitrović T., Stamenković S., Cvetković V., Tošić S., Stanković M., Radojević I., Stefanović O., Ćomić L., Đaćić D., Ćurčić M., et Marković S. (2011).** Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5428-5448.
- **Mohammed A. H. (2015).** Analyses taxonomique et écologique des lichens de la région de Tiaret. Doctorat de l'université de Tiaret.
- **Molyneux P., (2004).** These of stable free radical diphenyl picrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sei. Technol.*, 26 (2) ; 211-219.
- **Moreira A., Braz-Filho R., Mussi-Dias V., Vieira I. (2015).** Chemistry and biological activity of *Ramalina* lichenized fungi. *Molecules*. 20 :8952.
- **Morillas L., Roales J., Cruz C. et Munzi S. (2022).** Lichen as Multipartner Symbiotic Relationships. *Encyclopedia*, 2(3), 1421-1431.
- **Nabors M., (2008).** Biologie végétale : structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies. Pearson, France, 614p.
- **Naczek M., Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054: 95-111.
- **Nash T. H. (2008).** Lichen Biology; Cambridge, Royaume-uni, p. 498

- **Nguyen H. T., Ketha A., Kukavica B., et Tatipamula V. B. (2021).** Anti-Inflammatory Potential of Lichens and its Substances. *Inflammatory Bowel Disease MedDocs eBooks*, 1- 9.
- **Odabasoglu F., Aslan A., Cakir A., Suleyman H., Karagoz Y., Halici M., Bayir Y. (2004).** Comparaison de l'activité antioxydante et du contenu phénolique de trois espèces de lichens. *Phytother. Rés.* 18, 938–941.
- **Odabasoglu F., Cakir A., Suleyman H., Aslan A., Bayir Y., Halici M., et Kazaz C. (2006).** Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 103(1), 59-65.
- **Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- **Ozenda P., et Clauzade G. (1970).** Les lichens : étude biologique et flore illustrée. *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales*. 2ème : Edition. Lavoisier. France. 895p.
- **Parc National de Taza. (2016).** Plant de Gestion (2014-2019), la phase A. Description et analyse.
- **Pierre J. et Chin Y. (2016).** L'automedication chez les animaux dans la nature. *Connaissance et savoirs*, 226 p.
- **Plaza C., Lorena E., Diaz De T., Robert K., Lükingf. (2014).** Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from venezuelanandes *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy.Research*, 2(5), 138-147.
- **Prieto P., Pineda M., et Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- **Purvis O.W. (2014).** Adaptation and interaction of saxicolous crustose lichens with metals. *Botanical Studies*. 55(1), 1-14.
- **Rabelo T. K., Zeidán-Chuliá F., Vasques L. M., dos Santos J. P. A., da Rocha R. F., de Bittencourt Pasquali M. A., ... et Gelain D. P. (2012).** Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicology in Vitro*, 26(2), 304-314.
- **Rancan F., Rosan S., Boehm K., Fernández E., Hidalgo M. E., Quihot W., ... et Oltmanns U. (2002).** Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 68(2-3), 133-139. doi :10.1016/S1011-1344(02)00362-7.
- **Ranković B. R., Kosanić M. M., et 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(1), 1-8.

- **Rankoviš B., et Kosaniš M. (2015)**. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In: Rankoviš, B. (Ed.), *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1-26.
- **Rankoviš B., et Kosaniš M. (2019)**. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In: Rankoviš, B. (Ed.), *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1-26.
- **Raven B.A.Y., Evert R.F. et Eichhorn S.E. (2007)**. *Biologie végétale 2ème édition*. De Boeck, Paris, 733p.
- **Rémy Humbert. (2012)**. Les lichens : un autre monde. *Isatis* N° 12, 182-189.
- **ŞAHİN N., EMSEN B., ASLAN A. et Gökhan S. A. D. I. (2021)**. Antioxidant potential of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf and its secondary metabolites on hepatocellular carcinoma cells: regulation of antioxidant enzymes. *Anatolian Journal of Botany*, 5(2), 127-133.
- **Salem S, Leghouchi E, Soulimani R, Bouayed J. (2021)**. Reduction of paw edema and liver oxidative stress in carrageenan-induced acute inflammation by *Lobaria pulmonaria* and *Parmelia caperata*, lichen species, in mice. *Int J Vitam Nutr Res*. Jan;91(1-2):143-151. doi: 10.1024/0300-9831/a000620. Epub 2019 Dec 18. PMID : 31847731.
- **Salem S., (2013)**. *Contribution à l'étude de la biodiversité des lichens dans le parc national de taza (jijel)* (Doctoral dissertation, université de jijel).
- **Shrestha G. et St. Clair L. L. (2013)**. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry reviews*, 12, 229-244. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9283-7>.
- **Shtro A. A., Zarubaev V. V., Luzina O. A., Sokolov D. N., et Salakhutdinov N. F. (2015)**. Derivatives of usnic acid inhibit broad range of influenza viruses and protect mice from lethal influenza infection. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 24(3-4), 92-98.
- **Shukla V., Upreti D.K. et Bajpai R. (2014)**. *Lichens to biomonitor the environment*, Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London.
- **Silva L. R., Araújo H. D., Siqueira W. N., Fonseca C. S., Silva N. H., Melo A. M., ... et Lima V. L. (2018)**. Toxicity of usnic acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*. *Acta tropica*, 179, 39-43.
- **Singh N., Nambiar D., Kale R. K., et Singh R. P. (2013)**. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Nutrition and cancer*, 65(sup1), 36-43.
- **Singh R. et Sinha G. P. (1997)**. *Lichens*. Louisiana State University Agricultural Center.
- **Slikard K., et Singleton V.L. (1977)**. Total phenol Analysis: Automation and comparison with Manual Methos. *American Society for Enology and Viticulture*, 28: 49-55.

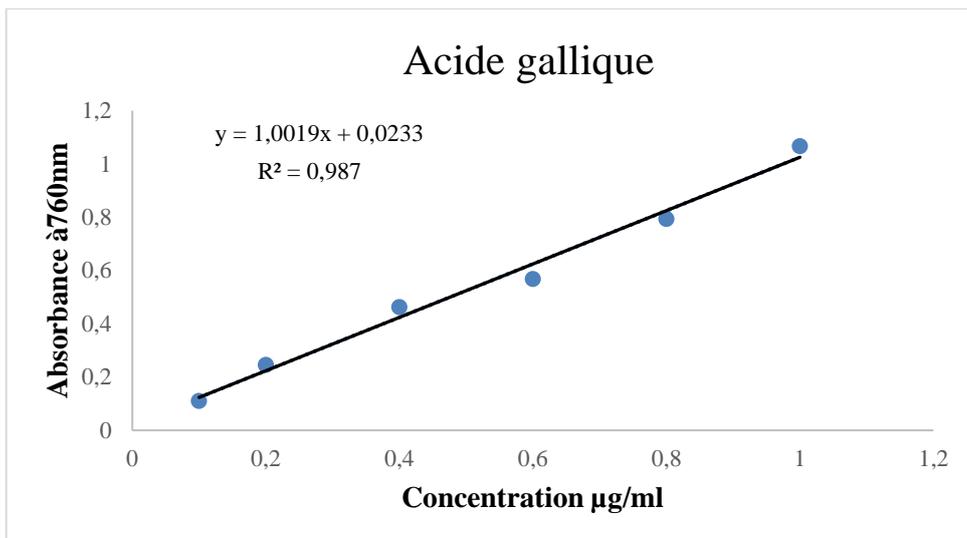
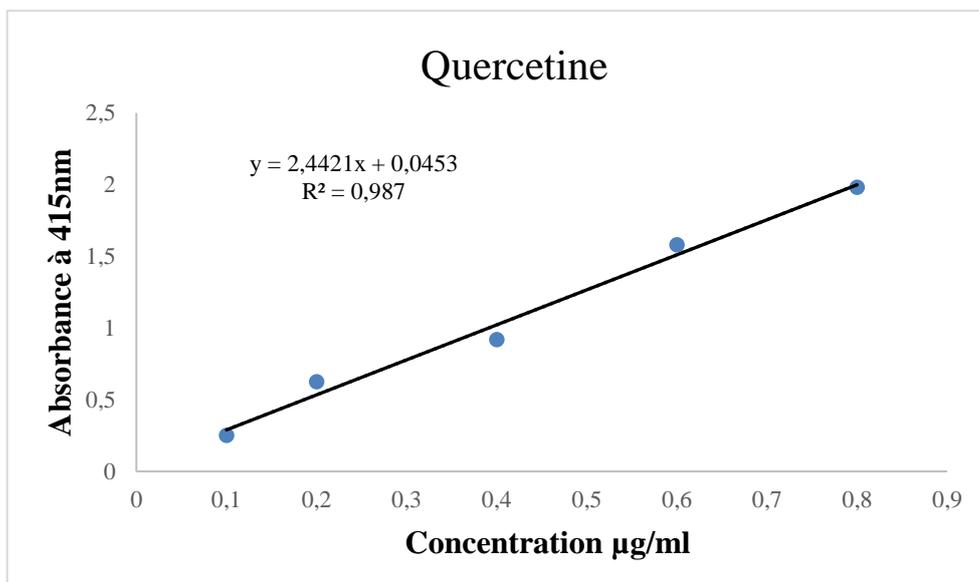
- **Stanojković T., Kosanić M., Manojlović N., Janković S., et Ranković B. (2013).** Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and chemical toxicology*, 53, 112-118.
- **Stocker-Wörgötter E. (2008).** Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural product reports*, 25(1), 188-200 p.
- **Stocker-Wörgötter E., Cordeiro L. M. C., et Iacomini M. (2013).** Accumulation of potential pharmaceutically relevant lichen metabolites in lichens and cultured lichen symbionts. *Studies in natural products chemistry*, 39, 337-380.
- **Stocker-Wörgötter E., Elix J. A., et Grube M. (2004).** Secondary chemistry of lichen-forming fungi: chemosyndromic variation and DNA-analyses of cultures and chemotypes in the Ramalinafarinacea complex. *The Bryologist*, 107(2), 152-162.
- **Tay T. (2004).** Turk AO, Yilmaz M, Turk M, Kivanc M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalinafarinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, protocetraric acid constituent. *Z Naturforsch C*. 59 :384–388.
- **Tiévant P. (2001).** *Guide des lichens : 350 espèces de lichens d'Europe*. Delachaux et Niestlé.
- **Van Haluwyn C., Asta J., et Gavériaux J. P. (2009).** Guide des lichens de France : Lichens des arbres ; Belin, Paris, p. 231.
- **Vasilios H., et Frankos PH.D. (2005).** NTP nomination for usnic acid and *usnea barbata* herb.
- **Verma N., Behera B.C., (2015).** Future directions in the study of pharmaceutical potential of lichens. In: Lichen secondary metabolite bioactive properties and pharmaceutical potential.
- **Vijayakumar C. S., Viswanathan S., Reddy M. K., Parvathavarthini S., Kundu A. B., et Sukumar E. (2000).** Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*, 71(5), 564-566.
- **Vuong Q.V., Hirun S., Roach P.D., Bowyer M.C., Phillips P.A., et Scarlett, C.J., (2013).** *Journal of Herbal Medicine*, 3: 104–111.
- **Vust M., et Mermilliod J. C. (2022).** *Psorotichia allobrogensis* Hue et autres nouveautés lichénologiques dans le canton de Fribourg.
- **Wang H., Xuan M., Huang C., et Wang, C. (2022).** Advances in research on bioactivity, toxicity, metabolism, and pharmacokinetics of usnic acid in vitro and in vivo. *Molecules*, 27(21), 7469.
- **Yamamoto Y., Hara K., Kawakami H., Komine M., Upreti D.K., Pradeep K., Shukla D.V., Bajpai R., (2015).** Lichen substances and their biological activities in: Recent advances in lichenology modern methods and approaches in lichen systematic and culture techniques. 2<sup>e</sup> édition. Springer. India. 232p.

## **Référence**

- 
- **Yuan X., Xiao S. et Taylor T. N. (2005).** Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science*, 308(5724), 1017-1020.
  - **Zambare V. P. et Christopher L. P. (2012).** Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50(6), 778-798.
  - **Zarabska-Bożejewicz D., Studzińska-Sroka E. et Faltynowicz W. (2015).** Transplantation of lichen thalli: A case study on *Cetraria islandica* for conservation and pharmaceutical purposes. *Fungal Ecology*, 16, 34-43.

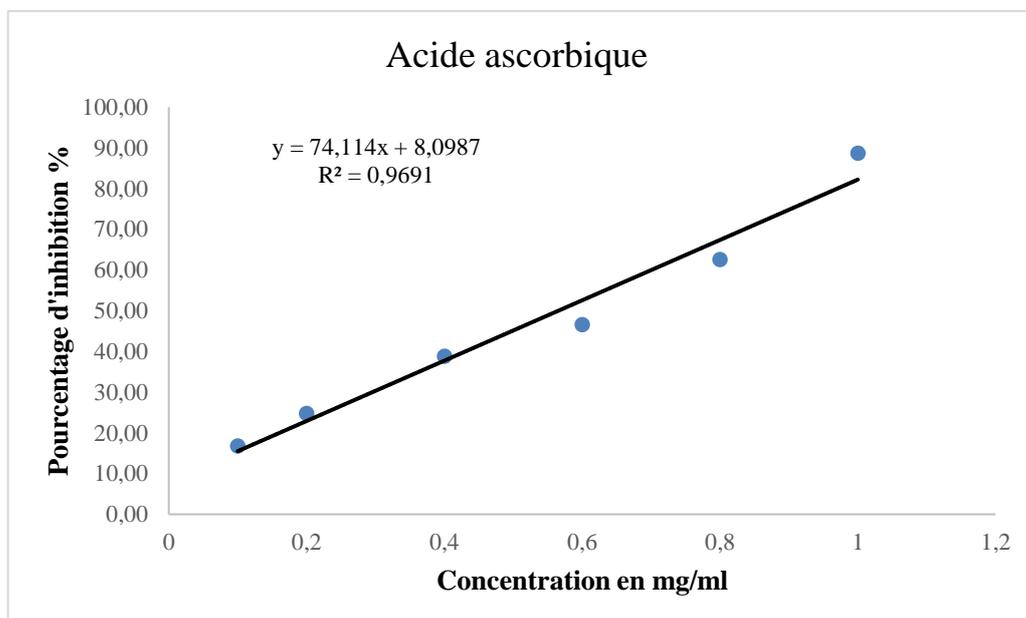
# **Annexe**

## Annexe 01 : Courbes d'étalonnages

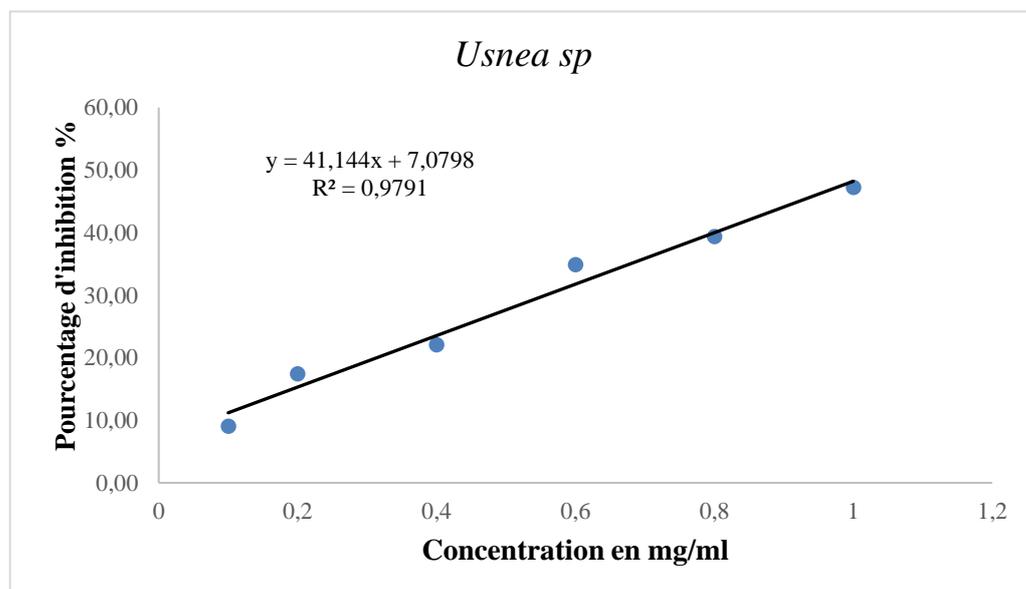
**Figure 01** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.**Figure 02** : Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

## Annexe 02 : Evaluation de l'activité antioxydante

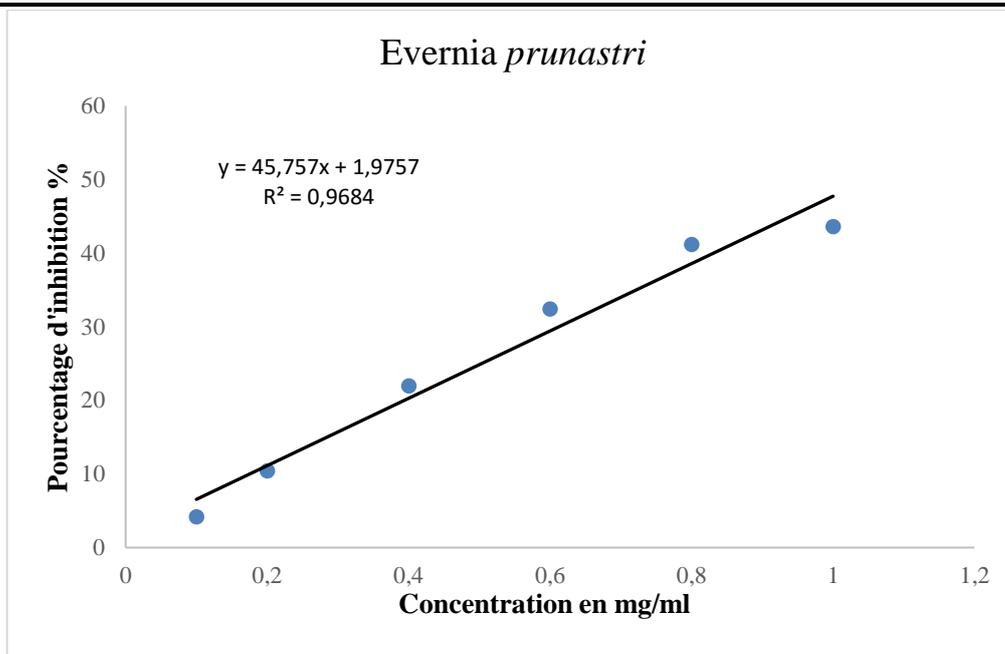
- Teste de piégeage du radical libre DPPH'



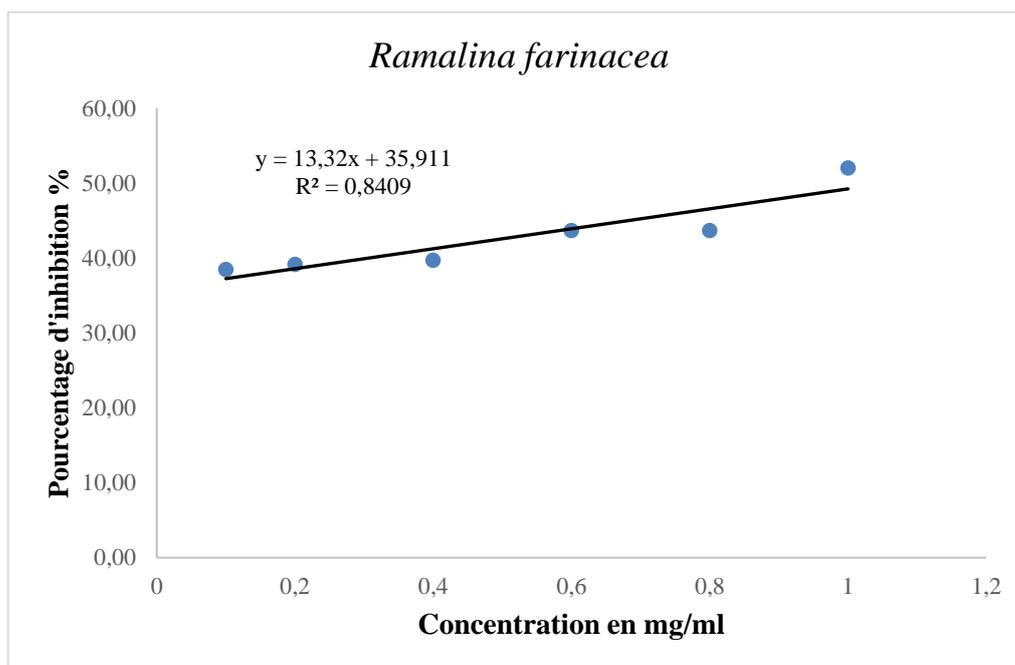
**Figure 03 :** Pourcentage d'inhibition d'acide ascorbique.



**Figure 04 :** Pourcentage d'inhibition d'extrait de *Usnea sp*.

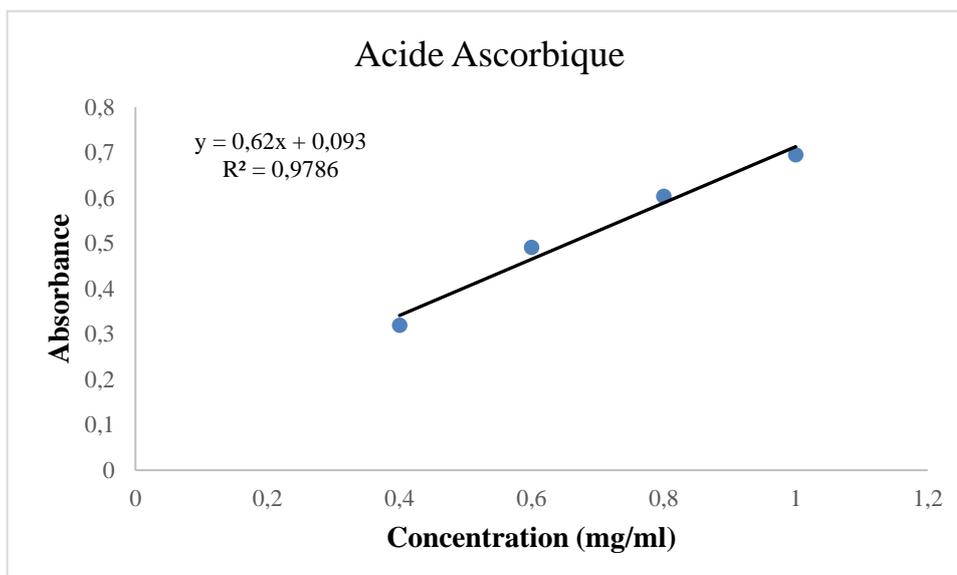


**Figure 05 :** Pourcentage d'inhibition d'extrait de *Evernia prunastri*.



**Figure 06 :** Pourcentage d'inhibition d'extrait de *Ramalina farinacea*.

- Capacité antioxydante totale (CAT)



**Figure 07** : régression linéaire d'acide ascorbique.

<p><b>Présentation par : Krara Soumia</b> <b>Medjitna Meriem</b></p>	<p><b>Encadreur : M<sup>elle</sup> Salem S</b> <b>Date de soutenance : Juillet 2016</b></p>
<p align="center"><b>Thème</b></p> <p align="center">Identification de l'acide usnique chez trois lichens de la région de Jijel et évaluation de l'activité anti-oxydante de leurs extraits phénoliques.</p>	
<p align="center"><b>Résumé</b></p> <p>L'acide usnique est présent uniquement chez les lichens et particulièrement abondant chez certaines espèces de genre, <i>Alectoria</i>, <i>Cladonia</i>, <i>Usnea</i>, <i>Lecanora</i>, <i>Ramalina</i> et <i>Evernia</i>. Le but de cette étude est d'identifier l'acide usnique chez trois espèces lichéniques de la région de Jijel. La teneur en phénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, alors que les flavonoïdes ont été évalués par la méthode de chlorures d'aluminium <math>AlCl_3</math>. L'estimation quantitative par la méthode colorimétrique des flavonoïdes et des phénols totaux a montré que les extraits sont riches en ces composés avec une différence significative. L'activité antioxydant a été estimée par trois méthodes : méthode de piégeage de radicale libre DPPH, test de la réduction de fer (FRAP) et test de la capacité antioxydante totale (CAT). Les résultats d'analyse montrent que les extraits des lichens possèdent une activité antioxydant. L'analyse par CCM révèle une différence d'apparition des spots par leurs nombres et leurs rapports frontaux. Les résultats confirment la présence de l'acide usnique chez <i>Usnea sp</i> et <i>Evernia prunastri</i>.</p>	
<p><b>Mots clés :</b> Acide usnique, Activité antioxydant, <i>Evernia prunastri</i>, <i>Ramalina farinacea</i>, <i>usnea sp</i>.</p>	
<p align="center"><b>Abstract</b></p> <p>Usnic acid is found only in lichens and is particularly abundant in certain species of the genus <i>Alectoria</i>, <i>Cladonia</i>, <i>Usnea</i>, <i>Lecanora</i>, <i>Ramalina</i> and <i>Evernia</i>. The aim of this study was to identify usnic acid in three lichenic species from the Jijel region. Total phenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, while flavonoids were assessed by the <math>AlCl_3</math> aluminum chloride method<sup>3</sup>. Quantitative colorimetric estimation of flavonoids and total phenols showed that the extracts were rich in these compounds with a significant difference. Antioxidant activity was estimated by three methods: DPPH free radical scavenging method, iron reduction assay (FRAP) and total antioxidant capacity (CAT) test. The results show that lichen extracts possess antioxidant activity. TLC analysis reveals a difference in the appearance of spots in terms of their numbers and frontal ratios. The results confirm the presence of usnic acid in <i>Usnea sp</i> and <i>Evernia prunastri</i>.</p>	
<p><b>Key words:</b> Usnic acid, Antioxidant activity, <i>Everniaprunastri</i>, <i>Ramalinafarinacea</i>, <i>usneasp</i>.</p>	
<p align="center"><b>المخلص</b></p> <p>حمض Usnic موجود فقط في الأشنات ويتوفر بشكل خاص في أنواع معينة من جنس، <i>Usnea</i>، <i>Cladonia</i>، <i>Alectoria</i>، <i>Lecanora</i> و <i>Evernia</i>. الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على Usnic في ثلاثة أنواع من الأشنات في منطقة جيجل. تم تحديد محتوى الفينولات الكلي باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu، بينما تم تقييم مركبات الفلافونويد بطريقة <math>AlCl_3</math> كلوريد الألومنيوم، وأظهر التقدير الكمي بطريقة القياس اللوني للفلافونويد والفينولات الكلية أن المستخلصات غنية بهذه المركبات مع اختلاف من. تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة بثلاث طرق: طريقة مسح الجذور الحرة DPPH، واختبار تقليل الحديد (FRAP) واختبار القدرة الكلية لمضادات الأكسدة (CAT). أظهرت النتائج التحليلية أن مستخلصات الأشنة تمتلك نشاطاً مضاداً للأكسدة. يكشف تحليل CCM عن اختلاف في مظهر البقع من خلال أعدادها ونسبها الأمامية. تؤكد النتائج وجود حمض Usnic في <i>Usnea prunastri</i> و <i>sp</i>.</p>	
<p align="center">الكلمات المفتاحية: حمض Usnic، نشاط مضاد للأكسدة، <i>Usnea prunastri</i>، <i>Ramalina farinacea</i>، <i>usnea sp</i></p>	

