

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

M/p.G.A. 02/17

Université de Med-SeddikBenyahia Jijel

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



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم علوم المحيط والعلوم الفلاحية

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2.6.95

Mémoire de fin d'études

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

Option : Phytopharmacie et gestion des agrosystèmes

Thème

01

**Evaluation de l'activité biologique de l'extrait brut
du lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach**

Jury de soutenance :

- **Président** : M^{elle} BENTERROUCHE I.
- **Examinatrice** : M^{me} LEMZERI H.
- **Encadrant** : M^{elle} SALEMS.

Présenté par :

**BOUDJELLAL NOUARA
HAROUCHE SOUHEYR**



Session : (juin 2017)

Laboratoire: Pharmacologie

Numéro d'ordre :

Nous remercions avant tout « le bon dieu » tout puissant qui nous a accordé la volonté et la

Force d'accomplir ce modeste travail.

Nous remercions en particulier notre encadreur M^{elle} 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 M^{elle} Benterrouche I, qui nous a honoré en acceptant de présider le jury.

Nous tenons également à remercier M^{me} Lemzeri H, 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

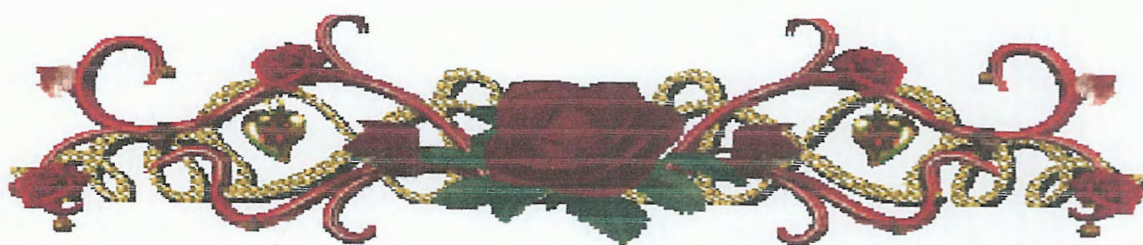
Enfin, nous remercions tous le personnel du laboratoire de biologie pour leur

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

Nouara et Souheyr



*A l'aide d'Allah tout puissant, qui m'a tracé le chemin de
ma vie. J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma
mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son
sacrifice et soutient qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de
mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

*A ma chère grand-mère qui ma appris le sens de la persévérance tout au
long de mes étude, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragement*

A ma belle sœur : Rania que je l'aime beaucoup

A mes chères frères : Ahmed et Iyad qui je l'aime beaucoup

A mon cher fioncie Bilal qui m'a encourager et ma donné l'espoir

*A ma chère amie Souheyr, qui je passe avec elle des belles et des mauvais
moments*

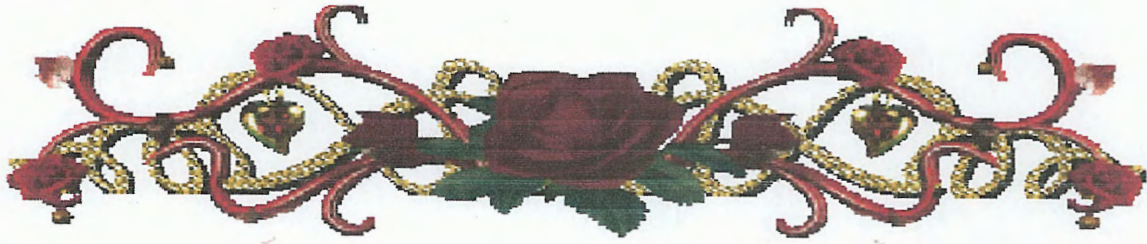
*A ma grand sœur et mon exemplaire Karima qui ma donner la puissance
pour continuer mes études*

A mes très chers amis : Malika, Aida, Ibtissem et Nabila

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux que j'aime

Nouara



*A l'aide d'Allah tout puissant, qui m'a tracé le chemin de
ma vie. J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné a la vie, qui s'est sacrifié
pour mon bonheur et ma réussite, a ma mère*

*A mon père, qui a veillé à me donner l'aide, et a me protéger, que dieu les
gardes et les protèges*

*A mes chers frères Hicham et Mohammed, qui ma protèges, et ma belle
chère sœur bouchra que je l'aime beaucoup*

*A mon cher ami et mon exemplaire docteur ahmad arabi, qui m'a
encouragé et ma donné l'espoir pour terminer mes études*

*A ma chère amie Nouara, qui je passe avec elle des belles et des mauvais
moments*

A mes chères amies : Souade, Hanane, Rafika

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux que j'aime

Souheyr

- : Pas d'inhibition.

% : Pourcentage

I% : Pourcentage d'inhibition

[] : Concentration

[$\mu\text{g Eq AG /mg EB}$] : 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

[$\mu\text{g Eq AT /mg EB}$] : Microgramme d'équivalent de l'acide tannique par milligramme d'extrait brut

\pm : Plus ou moins

μg : Microgramme

μl : Microlitre

Abs : Absorbance

AC as : Acide ascorbique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

AlCl_3 : Trichlorure d'aluminium

ATCC: American Type Culture Collection

$^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius

Cm: Centimètre

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

EB : Extraits brut

Ec : Ecart-type

Eq : Equivalent

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

Fe^{3+} : Fer ferrique

Fe^{2+} : Fer ferreux

FeCl_3 : Trichlorure ferrique

GPx : Glutathion Peroxydase

$\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$: Phosphotungestique

HCl: Acide Chlorhydrique

$\text{HO}_2\cdot$: Radical perhydroxyle

IC50: Concentration inhibitrice a 50%

Cr 0,5: Concentration reductive de 50% du fer

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: Ferricyanure de potassium

E.p: *Evernia prunastri*

Mg GEA /g extrait: Microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait

Mo_8O_{23} : Molybdène

NS : Pas de différences significatives

$\text{O}_2\cdot$: Radical superoxyde

OH : Hydroxyle

PNT : Parc National de Taza

RL : radical libre

RLO : Radical Libre Oxygéné

$\text{RO}\cdot$: Radical alkoxyde

$\text{RO}_2\cdot$: Radical peroxyde

T° : Température

TCA : Acide trichloracétique

UV : Ultraviolet

Figure 1 : Bénéfice réciproque algue-champignon.....	P03
Figure 2 : Différents types des thalles	P05
Figure 3 : Structure du thalle des lichens.....	P06
Figure 4 : <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.....	P11
Figure 5 : Voies probables conduisant aux grands groupes de produits lichéniques...	P14
Figure 6 : Localisation du PNT.....	P21
Figure 7 : Teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensées de l'espèce étudiée	P32
Figure 8 : Pourcentage d'inhibition du DPPH pour l'extrait méthanolique et de l'acide ascorbique.....	P33
Figure 9 : Valeur d'IC50 pour l'extrait testé de l'acide ascorbique	P34
Figure 10 : Pouvoir réducteur pour l'extrait méthanolique et l'acide ascorbique	P36
Figure 11 : Valeur de Cr 0,5 pour l'extrait et l'acide ascorbique	P37
Figure 12 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique	
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercétine	
Figure 14 : Courbe d'étalonnage d'acide tannique	
Figure 15 : Régression linéaire entre le Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait pour <i>E. prunastri</i>	
Figure 16 : Régression linéaire entre le Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique	
Figure 17 : Régression linéaire entre le Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique <i>d'Evernia prunastri</i> en fonction des concentrations	
Figure 18 : Régression linéaire entre le Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique en fonction des concentrations	
Figure 19 : <i>Evernia prunastri</i> contre les bactéries Gram+	
Figure 20 : <i>Evernia prunastri</i> contre les bactéries Gram-	

Tableau 1 : Rendement de l'extrait méthanolique	P29
Tableau 2: Teneurs en phénols totaux de l'extrait méthanolique d' <i>E.prunastri</i>	P30
Tableau 3: Teneurs en flavonoïdes de l'extrait méthanolique d' <i>E.prunastri</i>	P31
Tableau 4 : Teneurs en tannins condensés de l'extrait méthanolique d' <i>E.prunastri</i>	P32
Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire de l'extrait.....	P33
Tableau 6 : Valeur d'IC50 de l'extrait testé et l'acide ascorbique.....	P34
Tableau 7: Variation des absorbonces d'extrait étudié et du standard.	P36
Tableau 8 : La valeur de Cr 0,5de l'extrait testé et l'acide ascorbique.....	P37
Tableau 9 : Effet du méthanol sur les souches bactériennes.....	P38
Tableau 10: Diamètre des zones d'inhibition en (mm) obtenu par l'extrait méthanolique d' <i>Evernia prunastri</i>	P38

Liste des figures**Liste des tableaux****Liste des abréviations**

Introduction.....P01.

Partie I Synthèse bibliographique**Chapitre 1 Généralités sur les lichens**

I.1 Définition.....P02

I.2 Généralités sur les partenaires lichéniques P02

I.2.1 Photobiont.....P02

I.2.2 Mycobiont.....P02

I.2.3 Rôle des partenaires.....P03

I.3 Morphologie et structure du thalle.....P03

I.3.1 Morphologie du thalle.....P03

I.3.2 Structure des thallesP05

I.4 Reproduction des lichensP07

I.4.1 Reproduction asexuée ou végétative.....P07

I.4.2 Reproduction sexuée.....P07

I.5 Répartition des lichens.....P08

I.6. Les propriétés biologiques et structurales des lichens.....P09

I.7 Intérêts et utilisations des lichens.....P10

I.8 Présentation de lichen *Evernia prunastri*.....P11

I.8.1 Propriétés des lichens du genre *Evernia prunastri*.....P11

Chapitre II Etude phytochimique des lichens

II.1 Définition.....P13

II.1.1 Métabolisme des lichens.....P13

II.1.2 Voies de biosynthèse des métabolites secondaires des lichens.....P13

II.2 Les composés de métabolisme secondaires.....P15

II.2.1 Les composés phénoliques.....P15

II.2.2 Classification des composés phénoliques.....P15

II.3 Propriétés biologiques et applications des métabolites secondaires lichéniques.....P16

II.4 Propriétés chimiques, et mécanismes d'action contre les radicaux libres P16

II.4.1 Propriétés chimiques majeures des polyphénols.....P16

II.4.2 Mécanismes d'action contre les radicaux libres.....P16

II.4.2.1 Définition d'un radical libre.....P17

II.4.2.2 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	P17
II.5 Activité photoprotectrice et antioxydante.....	P17
II.5.1 Généralités sur les antioxydants	P17
II.5.1.1 stress oxydatif.....	P18
II.5.1.2 Conséquence du stress oxydatif.....	P18
II.5.1.3 Les principales sources d'antioxydants.....	P18
II.5.1.4 Antioxydants et systèmes de défense	P19
II.6 Activité antimicrobienne.....	P19
II.6.1 Activité antibactérienne.....	P19
II.6.1.1 Antibiotiques.....	P19
II.6.1.2 Résistance des bactéries aux antibiotiques.....	P19
II.6.1.3 Les principales méthodes d'action antimicrobienne des lichens.....	P20
II.6.2 Activité antifongique	P20

Partie II partie expérimentale

Chapitre III Matériel et méthodes

III. Présentation du PNT.....	P21
III.1 Localisation du PNT	P21
III.2 Diversité du Parc National de Taza.....	P21
III.3 Etude chimique des espèces lichénique.....	P22
III.4 Matériel végétal.....	P22
III.4.1 Récolte, identification et choix de l'espèce.....	P22
III.4.2 Position systématique du lichen <i>Evernia prunastri</i>	P23
III.5 Préparation du matériel végétal.....	P23
III.5.1 Préparation de l'extrait lichénique.....	P23
III.6 Etude phytochimique.....	P24
III.6.1 Détermination de la teneur des phénols totaux	P24
III.6.2 Détermination de la teneur des flavonoïdes.....	P24
III.6.3 Détermination de la teneur des tanins condensés.....	P25
III.7 Evaluation de la bioactivité de l'extrait lichénique.....	P26
III.7.1 Evaluation de l'activité antioxydante.....	P26
III.7.1.1 Activité antiradicalaire contre le DPPH•.....	P26
III.7.1.2 Pouvoir réducteur : (réduction de fer « FRAP »).....	P27
III.7.2 Evaluation de l'activité antibactérienne	P28
III.8 Analyse statistique.....	P29

Un grand nombre des plantes possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent applications dans divers domaines à s'avoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture.

Un lichen est une association symbiotique intime entre un champignon (mycobionte) et un partenaire chlorophylliens, Cyanophycée ou Chlorophycée (photobionte) (Boullard, 1997).

Les lichens produisent de nombreux métabolites secondaires caractéristiques qui sont uniques dans la nature appelés aussi « acides lichéniques », la plupart de ces substances sont de nature phénolique (Diniz et al., 2015).

Les activités biologiques intéressantes des substances de lichen incluent des activités inhibitrices antivirales, antimicrobiennes, antitumorales, inhibitrices de la croissance, anti-herbivores et enzymatiques. L'acide usnic, qui est principalement utilisé dans les préparations pharmaceutiques, est l'un des métabolites les plus connus des lichens (Huneck, 1999).

L'identification des métabolites caractéristiques des champignons microscopiques vivants libres dans les lichens (Burkin et Kononenko, 2011) est un nouveau fait scientifique qui mérite une étude approfondie pour comprendre les sources de leur émergence dans ces organismes symbiotiques complexes.

L'évaluation des propriétés phytothérapeutiques, demeure une tâche très intéressante et utile. En effet les métabolites secondaires font et restent objets de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nombreux constituants naturels tel les composés phénoliques (Mohammedi, 2006).

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

Notre travail est basé sur l'étude phytochimique du lichen fruticuleux, *Evernia prunastri*, dont l'objectif est :

- Quantification des composants phénoliques présentent dans l'extrait méthanolique (phénols totaux, flavonoïdes et les tanins condensés).
- Détermination de l'activité anti-oxydante et antibactérienne de l'extrait brut méthanolique du lichen *Evernia prunastri*.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les lichens

I. Présentation des lichens

I.1 Définition :

Le terme de Lichen est d'origine grecque (d'où sa prononciation habituelle : liken') et se trouve pour la première fois dans les écrits de Théophraste (IV^e siècle avant notre ère) qui désigne ainsi des plantes croissant sur les troncs d'arbres, auxquelles on attribuait à l'époque des vertus médicinales (**Ozenda et Clauzade, 1970**). Leur développement propre étant coordonné. L'ensemble a une morphologie et une structure caractéristique, permettant de définir des genres et des espèces. le lichen représente l'association de génome différent (**Genevés, 1990**).

Un lichen est une association symbiotique intime entre un champignon (mycobionte) et un partenaire chlorophyllien, Cyanophycée ou Chlorophycée (photobiont) (**Boullard, 1997**).

Cette association symbiotique constitue des organismes stables que l'on caractérise de façon imagée par l'équation ($1 + 1 = 1$) considérés comme des espèces individualisées. Elles sont très nombreuses et certaines très anciennes, sans doute parmi les premières à avoir colonisé le milieu terrestre (**Roland et al., 2008**).

I.2. Généralités sur les partenaires lichéniques

I.2.1 Photobionte

Les Algues ou Phycophytes (du gr. phukos = algue ; phuton = plantes), sont des Thallophytes chlorophylliens c'est à-dire des organismes capables de photosynthèse. Elles sont donc autotrophes tributaires de la lumière (**Roland et Vian, 1999**), parmi les algues constituant des lichens, les photosymbiotes, les mycosymbiotes et les chlorophytes (**Van Haluwyn et Lerond, 1993**).

I.2.2 Mycobionte

Les Champignons ou Mycophytes (myco = champignon, leur étude constitue la mycologie) sont des Thallophytes qui se distinguent fondamentalement des algues par l'absence de chlorophylle et de toute ébauche de plastides. Incapables de photosynthèse, ils sont hétérotrophes et doivent consommer des molécules organiques déjà élaborées (**Roland et al., 2008**). Toutefois la proportion de champignon lichénisés varie d'un groupe à l'autre : Ascomycotina, Basidiomycotina, Deutremycotina (**Van Haluwyn et Lerond, 1993**).

I.2.3 Rôle des partenaires

Le mycobionte permet la fixation au substrat, joue un rôle de protection et apporte aussi l'eau et les sels minéraux et d'autres vitamines (notamment C) qu'il capte dans le substrat (Bellenfant et al., 2010).

Le photobionte réalise la photosynthèse par des pigments assimilateurs et apporte sucres et vitamines (vitamine B) au mycobionte. La photosynthèse assimile le dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique (Bellenfant et al., 2010).

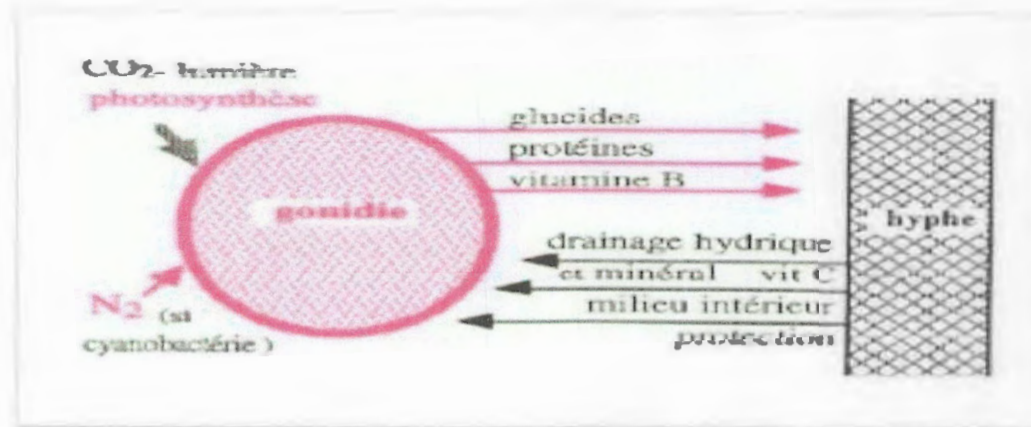


Figure1: Bénéfice réciproque algue-champignon (Roland et al., 2008)

I.3. Morphologie et structure du thalle

I.3.1 Morphologie du thalle

L'appareil végétatif du lichen, appelé le thalle, est constitué des divers partenaires de la symbiose (champignon, algue...). De couleur et de forme très variées, le thalle ne possède ni racine, ni tige, ni feuille. Le partenaire fongique représente de 80 à 90% voire plus, de la biomasse (Humber, 2012).

Selon la structure microscopique des thalles des lichens on distingue (7) groupes:

a) Thalles crustacés

Non séparables du substrat, du moins sous forme de fragments importants, car très adhérents à celui-ci et même inclus dans ce dernier comme les lichens du genre *Lecanora*, *Caloplaca* (Clauzade et Roux, 1987).

b) Thalles fruticuleux

En forme de tiges pendantes ou dressées, ces thalles sont le plus souvent ramifiés et plutôt dressés, qui ont peu de points d'attache au substrat comme les lichens du genre *Ramalina*, *Evernia* (Blondeau et Roy, 2004).

c) Thalles complexes

Formés de deux thalles, un primaire en générale foliacée et un secondaire fruticuleux développant sur le thalle primaire. Lichen du genre *Cladonia*, *Stereocaulon* (Bruyère, 2010).

d) Thalles gélatineux

Lichen noir et cassants qui gonflent et deviennent gélatineux à l'état humide. Lichen du genre *Collema*, *Leptogium* (Bellenfant et al., 2010).

e) Thalles foliacés

En forme de lames non lobées ou de squames, très fragiles à l'état sec, ils adhèrent au substrat par une très petite surface le plus souvent près du centre, sur la face supérieure, au-dessus du crampon, on trouve une petite dépression dénommée ombili. Lichen du genre *Parmelia*, *Lobaria*, *Cetrélie* (Bellenfant et al., 2010).

f) Thalles squamuleux

Les thalles squamuleux typiques sont formés de compartiments (squamules) à face supérieure plane ou concave, dispersé ou rapprochés ou contigus, avec bord non adhérent au substrat. Lichen du genre *Squamarina*, *Normandina* (Galiana et al., 2015).

g) Thalles lépreux

Les thalles lépreux sont des parties facilement détachable de leurs substrats ils ressemblent a de la poussière ; Lichen du genre *Lepraria* (Galiana et al., 2015).

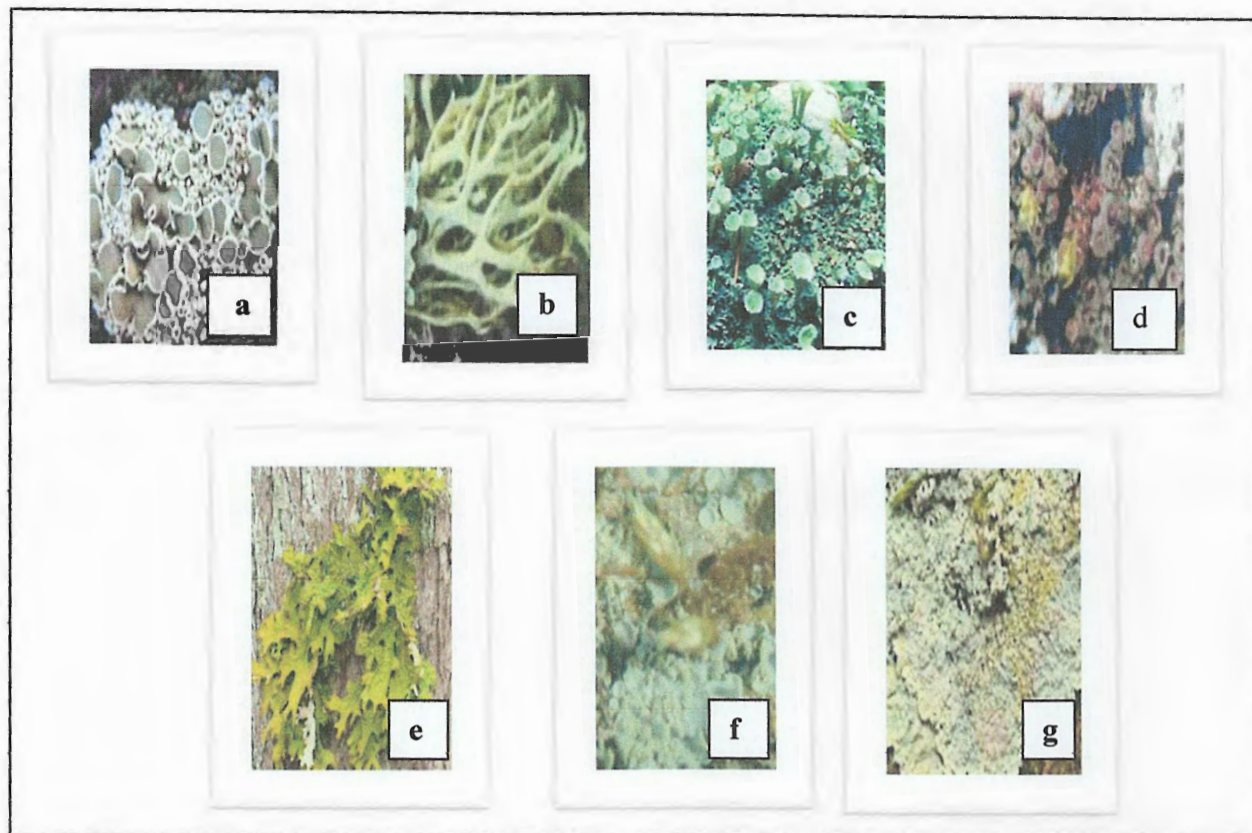


Figure 2: Différents types de thalle

(a) Thalle crustacé, (b) Thalle fruticuleux (**Bricau**, 2006), (c) Thalle complexe, (d) Thalle gélatineux, (e) Thalle foliacé (**Bricau**, 2010), (f) Thalle squamuleux ; (g) Thalle lépreux (**Keller**, 2010).

I.3.2 Structure des thalles :

Les thalles filamenteux sont caractérisés par une structure très simple produite par l'algue.. tous les autres types de thalles présentent une structure très différente (**Clauzade et Roux**, 1987). On distingue deux types structuraux (**Figure 3**).

- **Structure de type homéomère**

Le champignon et l'algue sont répartis uniformément dans le thalle relativement homogène, et on retrouve cette structure dans les lichens crustacés *Caloplaca*, les lichens gélatineux *Collema*, les lichens gélatineux homogènes absorbent beaucoup plus d'eau par rapport à leur poids sec comparativement aux lichens hétéromères (**Ozenda et Clauzade**, 1970).

- **Structure de type hétéromère**

Chez les thalles hétéromères, la structure stratifiée correspond à la mise en place d'une polarité dorsiventrale avec de haut en bas (Van Haluwyn et Lerond, 1993).

- un cortex supérieur de nature fongique à hyphes très serrées
- une couche algale comportant également des hyphes beaucoup plus lâches
- une médulle à hyphes encore plus lâches
- un cortex inférieur à hyphes

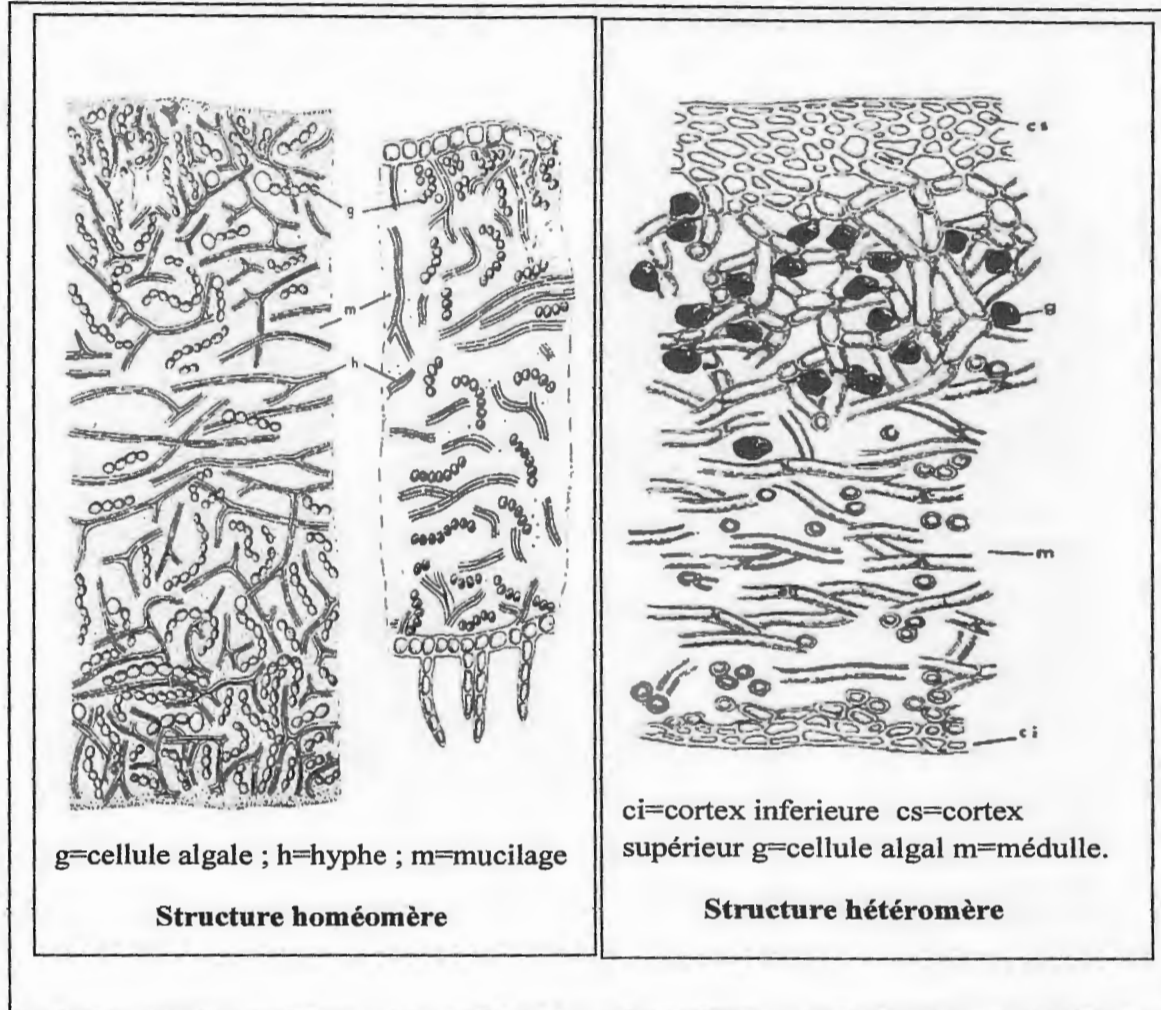


Figure3: Structure du thalle des lichens (Ozenda et Clauzade, 1970)

I.4 Reproduction des lichens

Le reproduction permet au lichen de coloniser de nouveaux substrats lorsque les conditions sont favorables. Leurs spores sont dispersés par le vent, les animaux ou la pluie (**Bellenfant et al., 2010**).

Deux modes de reproduction des lichens peuvent être adoptés, sexuée et asexuée :

I.4.1 Reproduction asexuée ou végétative

La reproduction végétative se fait par dissémination du complexe lichénique lui-même par bouturage de fragment du thalle ou émission des soredies ou d'isidies (**Ozenda, 2000**), on distingue plusieurs organes qui participent dans ce mode de multiplication :

- **Isidies**

Les isidies sont des saillies de la surface du thalle revêtues de cortex et dans lesquelles pénètrent des gonidies, mais elles sont généralement plus serrées, réparties plus irrégulièrement, de forme beaucoup plus variée, et surtout elles se détachent facilement (**Ozenda et Clauzade, 1970**).

- **Soredies**

Les soredies sont de petites granulations formées par quelques gonidies entremêlées et entourées de filaments mycéliens. Elles sont libérées par interruption du cortex et ont une très grande importance dans la multiplication végétative des lichens (**Boullard, 1988**).

- **Soralies**

Les soralies sont des crevasses de l'écorce (celle-ci toujours formée par le champignon) au niveau de laquelle la médulle du lichen se résout en une poussière farineuse de soredies (**Ozenda, 2000**).

I.4.2 Reproduction sexuée

Elle est assurée par le champignon qui produit les organes de fructification, ces organes vont libérer des spores qui émettent des hyphes. Les hyphes et les gonidies vont constituer un nouveau lichen (**Collombet, 1989**). Il existe plusieurs organes qui participent à ce mode de reproduction, selon on distingue :

- **Apothécies**

Les apothécies sont caractérisées par un hyménium non entièrement enfermé dans une couche protectrice sont généralement en forme de disque ou de coupe plus ou moins étalés. Quand elles possèdent un bord de la même couleur que le thalle (bord thallin) on les appelle des apothécies lécanorines, avec un bord de la même couleur que le disque (rebord propre) ce sont des apothécies lécidéines (**Clauzade et Roux, 1987**).

- **Périthèces**

Noires ou de couleur sombre le plus souvent, sont en forme de poires plus ou moins globuleuses, plus ou moins enfoncées dans le thalle ou dans le substrat, ils s'ouvrent seulement par un pore (ostiole) et comprennent:

- 1- Une couche protectrice dure comme du cuir (excipulum ou pyrénium), et, sauf de rares exceptions, de couleur sombre, au moins au sommet.
- 2- Une espèce de couvercle (involucrellum) entourant la partie supérieure de l'excipulum

(Humbert, 2012).

I.5 Répartition des lichens

Les lichens croissent dans les biotopes les plus divers. Ils manquent seulement dans la mer, au centre des grandes villes, et sur les tissus animaux vivants (**Clauzade et Roux, 1987**).

Les lichens ont colonisé tous les milieux (jusqu'aux roches, déserts et sommets des montagnes). Ils représentent la biomasse la plus importante. Leur répartition obéit à de nombreux facteurs : le support qui peut être de la roche, du sable ou encore les écorces des arbres (**Bellenfant et al., 2010**)

Selon la nature de substrat on distingue 3 grands groupes :

- **Lichens épiphytes**

Sont des lichens corticoles nécessitant une ambiance humide et stable sur le long terme ont été recensés sur les troncs à écorce crevassée de vieux chênes pubescents (*Collema ligerinum*). Ces espèces ont besoin de forêts riches en vieux arbres sur une période de plusieurs siècles pour s'établir et se structurer (**Claude et Schnitzler, 2014**).

- **Lichens saxicoles**

Sont des espèces qui croissent sur les roches par exemple *Acarospora fuscata* très commun sur tous les rochers de grès sauf s'ils sont trop secs (**Boissiere, 1990**).

- **Lichens terricoles**

Sont les espèces qui poussent sur le sol par exemple *Cladonia chloropacea* est une espèce croissant sur humus ou sur sol sableux acide un peu partout sur les talus, les déblais des anciennes carrières, dans les pelouses (**Boissiere, 1990**).

On en trouve aussi des lichens poussent sur des mousses (musciocoles), sur les feuilles (foliicole), et même sur d'autres lichens (lichénicoles) et sur le bois mort (ligniciles), plus rarement sur des panneaux de signalisation, du verre, des boîtes aux lettres...ect (**Humbert, 2012**).

I.6. Les propriétés biologiques et structurales des lichens

L'association lichénique apporte des propriétés différentes à celles des autres partenaires végétatives. On peut distinguer les propriétés suivantes :

- **Accumulation** de fortes quantités de plomb des véhicules à moteur. Le dosage du plomb accumulé dans les thalles d'espèces communes, de large répartition géographique et à forte affinité pour ce métal (*Lecanora conizaeoides*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*) (**Lachat et al., 2011**).
- **Phénomène d'exsorption**, observé naturellement en zone contaminée ou à la faveur de retransplantations, est à rapprocher de celui obtenu au cours des expériences de lessivage acide des thalles. Dans le cas des lichens retransplants, l'exsorption peut s'expliquer par une augmentation de l'acidité des pluies (**Nash, 2008**).
- Sont des organismes particuliers issus de la symbiose. Ils ne puisent leur nourriture que dans l'eau de pluie, qu'ils absorbent par toute la surface de leur thalle. Cette biologie particulière explique leur grande sensibilité à la pollution atmosphérique. Ils concentrent les polluants, ceci jusqu'à un certain seuil (**Ozenda, 2000**).
- **Leur grande longévité** renforce encore l'effet cumulatif des polluants absorbés (**Suty, 2015**).
- Chez les lichens, l'algue induit la synthèse de **métabolites secondaires** par le champignon « substances lichéniques », qui ont un rôle protecteur contre les forts éclaircissements et contre les herbivores (**Suty, 2015**).

I.7 Intérêt et utilisation des lichens

- **En médecine**

Le principal intérêt des lichens en médecine semble être actuellement la possibilité d'en extraire des Antibiotiques. L'acide usnique semble actif contre une vingtaine de bactéries et divers agents de tuberculose (**Ozenda, 2000**), un mélange de *Parmelia caperata*, *Usnea longissima*, sont récemment utilisées comme laxatif et carminatif (**Amandine, 2015**).

- **En bioindication**

Les lichens qui réagissent de manière sensible aux influences de l'environnement dans leur forme d'apparition, appartiennent aussi à ces systèmes biologiques (**Perraud et Bliefert, 2007**).

Les lichens ont un secret pour résister aux pollutions : ils fabriquent des pièges à métaux de quoi rendre inactifs les plus terribles des poisons. Tout ça grâce aux acides lichéniques et aux molécules comme les oxalates qui vont s'associer aux métaux lourds (**Leclerc et Floch, 2010**).

Certains lichens sont tolérants à une forte pollution soufrée (par exemple *Lecanora conizaeoides* ou *Scoliciosporum chlorococcum*) et sont les seuls à survivre dans les zones où la pollution de ce type est forte (**Bricaud, 2010**).

- **En alimentation**

Dans l'alimentation humaine, seul *Cetraria islandica* a été utilisé autrefois dans les pays nordiques, sous forme de farine mélangée à la farine panifiable ou préparé en bouillie, pour l'alimentation animale les lichens jouent un rôle important dans la nutrition des Mammifères alpins (**Ozenda, 2000**).

- **En industrie**

Les Parfums est la seule utilisation industrielle des lichens qui conserve aujourd'hui une importance notable, c'est aussi l'une des plus anciennes. *Evernia prunastri* est le plus utilisé, reconnu par ses parfums à odeur de Chypre, d'Orient, etc (**Ozenda, 2000**).

En teinturerie selon l'espèce du lichen et le temps de décoction dans l'eau bouillante, on obtient différents tons allant du jaune au brun roux. Cette méthode est encore utilisée en Ecosse pour teindre les kilts (**Bruyère, 2010**).

I.8 Présentation de lichen *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).



Figure 4: *Evernia prunastri* (L.) Ach (Roland, 2009)

I.8.1 Propriétés des lichens du genre *Evernia prunastri*

1. Un lichen fruticuleux considéré comme source très importante de dépsides (notamment l'acide évernique) et de dépsides qui sont accumulés dans la zone médullaire du thalle, tandis que l'acide usnique et l'antranorine sont distribués dans le cortex (Culberson, 1963).

2. Parmi les 199 molécules chimiques d'*Evernia prunastri* 80 d'entre elles participent à l'odeur, dont l'éverninate de méthyle et d'éthyle, et l'éther monométhyle d'ordinaire jouent un rôle primordial, une partie de ces molécules a pu être synthétisée chimiquement (Letrouit, 1986).

3. *Evernia prunastri*, a la propriété singulière d'absorber et de conserver les odeurs pour cela elle constitue une source particulière de principes actifs d'un grand nombre de parfums (Sell et al., 2001).

- Dans l'éventuelle utilisation des lichens comme source de molécules biologiquement actifs, *Evernia prunastri* est parmi les espèces dont la décomposition des mycotoxines a été décrite pour la première fois par **(Burkin et Kononenko, 2014)**.

Chapitre II

Etude phytochimique des lichens

Partie II Étude phytochimique des lichens

II.1 Définition

Le métabolisme (du grec : *metabolé*, changement), est un processus très dynamique, les molécules sont en continuel renouvellement, L'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans un organisme est appelé métabolisme (Hopkins, 2003).

Le métabolisme est indispensable à la vie. D'un point de vue thermodynamique, les organismes vivants sont des systèmes fondamentalement hors d'équilibre qui nécessitent pour maintenir cet état d'échanger continuellement de l'énergie et de la matière avec le milieu extérieur. Le métabolisme joue un rôle essentiel dans cet échange d'énergie et de matière. Cependant, toutes les entités vivantes ne possèdent pas nécessairement de métabolisme propre (Andersson *et al.*, 1998).

II.1.1 Métabolisme des lichens

L'étude phytochimique des lichens se concentre particulièrement aux métabolites secondaires puisque, contrairement aux métabolites primaires, La grande majorité de ces métabolites sont uniquement d'origine fongique, toutefois l'algue peut participer aux étapes finales de la biosynthèse d'un métabolite (Culberson *et al.*, 1989). On distingue 2 métabolites :

Métabolite primaire : Les métabolites primaires regroupent les protéines, les lipides, les polyols, les polysaccharides, les pigments et autres composés organiques intervenant dans le métabolisme et la structure des lichens (Podterob, 2008).

Métabolite secondaire : Les métabolites secondaires sont des substances originales divisées en plusieurs familles et sont principalement responsables de l'aptitude des lichens à se développer dans des conditions extrêmes. Ils représentent en moyenne 5 à 10 % de la masse sèche du thalle (jusqu'à 20 %) (Shukla *et al.*, 2010).

II.1.2 Voies de biosynthèse des métabolites secondaires des lichens

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

a- Voies de 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 diphényliques.
- Depsones.
- Dibenzofuranes, les acides usniques et leurs dérivés.

- Anthraquinones et xanthones biogénétiquement liés.
- Chromones.
- Naphthoquinones.
- Xanthones.

b-Voies de l'acide mévalonique : comprend :

- Di-, sester-et triterpènes.
- Stéroïdes.

c-Voies de l'acide shikimique : comprend :

- Terphenylquinones.
- Dérivés d'acides pulvinique.

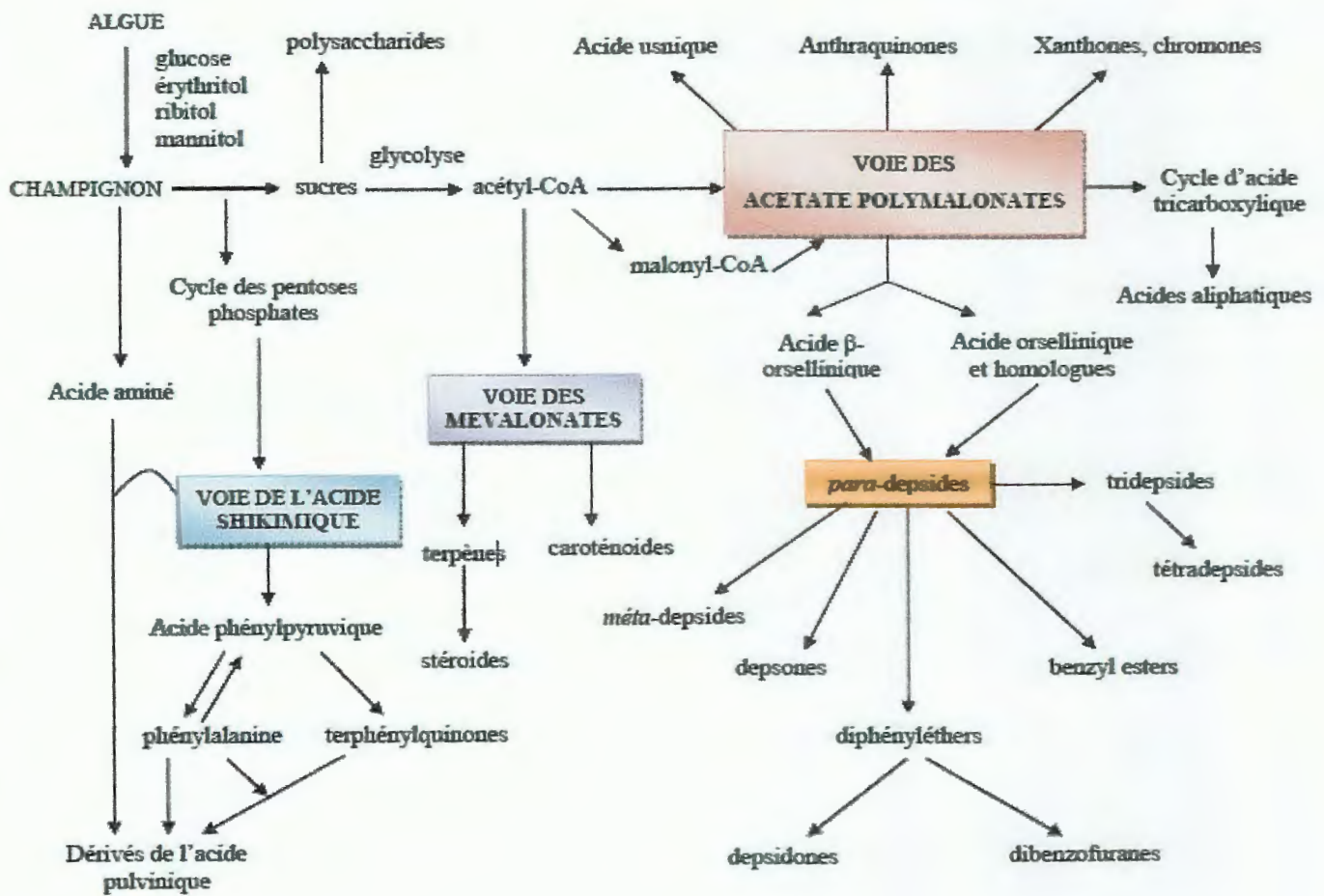


Figure 5 : Voies probables conduisant aux grands groupes de produits lichéniques (Elix, 2008).

II.2 Les composés de métabolisme secondaires

Selon (Marouf et Reynaud, 2007), les métabolismes secondaires sont classés en 3 grandes classes :

- Les composés aromatiques ou polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanidines, tannins), et les quinones.
- Les substances azotées.
- Les terpénoïdes et leurs dérivés.

II.2.1 Les composés phénoliques

Le terme « polyphénols » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux (Fleuriet et al., 2005).

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des Métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvés dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (Dai et Mumper, 2010).

II.2.2 Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes :

- **Les non flavonoïdes**

dont les principaux composés sont: les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les lignines et les coumarines (Hoffmann, 2003).

- ✓ **Les tannins**

La capacité des tanins à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes (Cowan, 1999).

Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives (Alkurd et al., 2008). On distingue: les tanins hydrolysables et condensés.

- ✓ **Les lignines**

La lignine est un polymère fortement ramifié, formés par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres, qui sont réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine (Hopkins, 2003).

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux (**Guignard, 1996**).

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (**Ghedira, 2005**).

II.3 Propriétés biologiques et applications des métabolites secondaires lichéniques

➤ **Rôles écologiques**

Au sein du lichen, les métabolites secondaires ont essentiellement un rôle de défense vis-à-vis des facteurs environnementaux physiques et biologiques : exposition intense à des rayonnements ultraviolets (UV), défense contre les herbivores, compétition pour l'habitat (effet allélopathique). Aussi, ces composés contribueraient à l'altération des roches afin de faciliter l'adhésion du lichen (**Seaward, 1997**).

➤ **Tolérance à la pollution**

Les métabolites secondaires peuvent jouer un rôle dans la résistance à la pollution des lichens. 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**).

II.4 Propriétés chimiques, et mécanismes d'action contre les radicaux libres

II.4.1 Propriétés chimiques majeures des polyphénols

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anion phénoxydes stabilisés par résonance. Cet anion, a la possibilité de perdre un électron pour former un radical (**Sartori-Thiel, 2003**), l'électron, lui, pouvant être récupéré par un radical libre.

La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical. Il peut, ensuite, réagir avec un autre radical libre (**Korkina et al., 2012**).

II.4.2 Mécanismes d'action contre les radicaux libres

La grande capacité des composés phénoliques à contre carter les radicaux libres, et à chélater les ions métaux de transitions est directement reliée à leurs caractéristiques structurales. Ainsi, des différentes familles connues des polyphénols, les flavonoïdes sont-ils ceux qui, en particulier, réunissent toutes ces caractéristiques (**Rice-Evans et al., 1996**).

II.4.2.1 Définition d'un radical libre

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante « libre » en contenant un ou plusieurs électrons célibataires, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Goudable et Favier, 1997).

II.4.2.2 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires, selon (Delattre et al., 2005), on distingue :

- **Les espèces oxygénées réactives radicalaires**
 - L'anion radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)
 - Radical perhydroxyle HO_2^{\bullet}
 - Le radical peroxyde RO_2
 - Le radical secondaire alkoxydes RO^{\bullet}
- **Les espèces oxygénées non radicalaires (ERN)**
 - L'oxygène singulet 1O_2
 - Peroxyde d'hydrogène H_2O_2

II.5 Activité photoprotectrice et antioxydante

La plupart de ces métabolites secondaires est accumulée sous forme de cristaux sur la surface externe des hyphes dans le cortex supérieur ou dans la médulle interne du thalle (Boustie et al., 2011).

Un des mécanismes de protection des lichens est la production et l'accumulation de pigments corticaux capables d'absorber les UVA et UVB, Il s'agit de caroténoïdes, de mélanines, de composés phénoliques, l'acide usnique, ou de composés issus de la voie de l'acide shikimique (Nguyen et al., 2013).

II.5.1 Généralités sur les antioxydants

Un antioxydant est une substance qui protège les tissus biologiques contre les dommages des radicaux libres, qui peut être recyclé ou régénéré par des agents réducteurs biologiques, il constitue d'une série des protéines et des substances qui fournissent ces connexions (Packer et al., 2000).

Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont : l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles $ROOH$, le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, les radicaux hydroxyles HO , peroxydes ROO et alkoxydes RO . L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition (Ekoumou, 2003).

Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines (Ahamet, 2003).

II.5.1.1 Stress oxydatif

Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) (Evans et Halliwell, 1999).

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Toute fois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (Papazian et Roch, 2008).

II.5.1.2 Conséquence du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéinesect. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...). Et la dégradation des cellules et des tissus (Bonnet et al., 2010).

II.5.1.3 Les principales sources d'antioxydants

- Les médicaments
Certains médicaments fait diminuer le taux du cholestérol dans le sang et la N- acétylcystéine agit dans la régénération du glutathion en pénétrant les cellules (Le Perchec, 1994).
- Les vitamines
 - Acide ascorbique : Vitamine C
Contient une forme énediol qui produit la forme dicétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'H. Elle joue un rôle important dans la régénération du vit E. (Bossokpi, 2002).
 - La vitamine E
Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales (Bossokpi, 2002).
- Les antioxydants naturels
Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...).

II.5.1.4 Antioxydants et systèmes de défense

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible Concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber L'oxydation de ce substrat (Cano et *al.*, 2006).

II.6 Activité antimicrobienne

Certains métabolites secondaires lichéniques jouent également un rôle important dans la compétition car ils peuvent avoir une activité allélopathique, c'est-à-dire qu'ils sont capables d'affecter le développement et la croissance des lichens, des champignons, des mousses, des micro-organismes et des plantes voisins (Armstrong et Welch, 2007).

L'acide usnique ainsi que d'autres métabolites tels la prunastrine est décrit pour avoir un effet sur le développement et la croissance de certaines plantes (Macías et *al.*, 2007).

Concernant l'activité phytotoxique, des études ont mis en évidence que les acides usnique, vulpinique, squamatique et évernique sont capables d'inhiber la germination des spores de certaines espèces de mousses (Favero-Longo et Piervittori, 2010).

II.6.1 Activité antibactérienne

Plus généralement dans la littérature, les activités antibactériennes des extraits de lichens varient en fonction des solvants utilisés pour les extractions ainsi que des bactéries testées et notamment de la composition de leur membrane, différente chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les premières sont généralement plus sensibles à l'activité antibiotique des métabolites lichéniques que les secondes (Rowe et *al.*, 1989).

Face au développement de formes résistantes de bactéries vis-à-vis des traitements antibactériens conventionnels, les métabolites lichéniques sont étudiés comme alternatives. En effet, plus de 50 % des lichens possèderaient une activité antibiotique et représenteraient donc une source importante de nouveaux composés bioactifs (Zambare et Christopher, 2012)

II.6.1.1 Antibiotiques

Un antibiotique est une substance chimique ayant une activité bactéricide ou bactériostatique sur des microorganismes pathogènes et permettant de traiter des infections, ces molécules sont plus utilisées dans l'industrie pharmaceutique (Davies et Davies, 2010)

II.6.1.2 Résistance des bactéries aux antibiotiques

Les mécanismes de résistances bactériennes aux antibiotiques Outre les résistances naturelles des bactéries, il existe un nombre important de mécanismes de résistance développé par les bactéries en réponse à la pression de 15 sélections ATB. Ces résistances relèvent d'un mécanisme biochimique dont le support est génétique et elles peuvent être transmissibles à d'autres bactéries (Andremont, 2002 ; Guillemot et Leclercq, 2005 ; Wright, 2005).

La résistance bactérienne peut être intrinsèque ou acquise. La résistance acquise est présentée seulement dans certaines souches de l'espèce ou de genre bactérien. La résistance intrinsèque est spécifique de l'espèce du genre peut définir le spectre d'activité de l'antibiotique (Courvalin, 2008).

II.6.1.3 Les principales méthodes d'action antimicrobienne des lichens

Les propriétés antimicrobiennes des extraits de lichen et de leurs métabolites secondaires sont connues depuis longtemps (Piovano *et al.*, 2002 ; Paudel *et al.*, 2008 ; Micheletti *et al.*, 2009).

On distingue les mécanismes suivants :

- L'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.
- L'inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique.
- L'inhibition de la synthèse des protéines.
- L'inhibition de la synthèse de l'acide nucléique.

II.6.2 Activité antifongique

Certains métabolites secondaires peuvent être actifs sur différentes souches de champignons et de levures. L'acide (+)-usnique, isolé du lichen, montre une activité antifongique (Cardarelli *et al.*, 1997). L'acide (-)-usnique inhibe également la croissance de *Candida glabrata* et *Candida albicans* (Yilmaz *et al.*, 2004), il a également un effet antifongique intéressant à l'état planctonique et de biofilm (Pires *et al.*, 2012).

- Objectif

L'objectif de notre travail est d'étudier la phytochimie et les activités biologiques du lichen *Evernia prunastri*.

III. Présentation du PNT

III.1 Localisation du PNT

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 Ziam 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 Ziam Mansouriah) (**Figure 6**). 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.

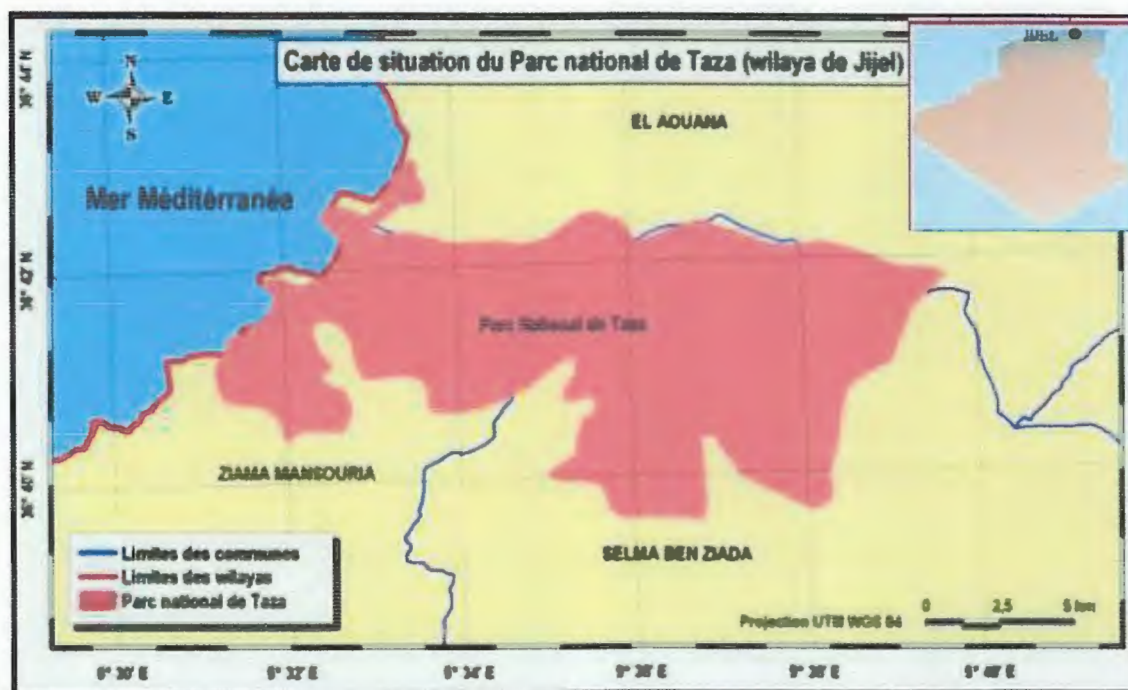


Figure 6 : Localisation du Parc National de Taza (PNT, 2006)

III.2 Diversité 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

Parmelliacées 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.3 Etude chimique des espèces lichénique

✓ Réaction thallines

L'identification et la confirmation des espèces étudiées a été effectuée en se basant sur plusieurs critères macro et microscopique tels que : la physionomie du thalle, organes portés par les deux faces du thalle tels, les apothécies, sorédies, les céphalodies et les rhizines...etc.

Des réactions thallines ou test colorimétriques appliquées sur le thalle (médulle ou cortex ou extrait méthanolique) sont utilisées depuis 1860 en lichénologie pour aider à la caractérisation d'espèces lichéniques, ces tests ont été réalisés en utilisant quatre réactifs spécifiques à la lichénologie (Tiévant, 2001).

- « K » : solution saturée de potasse (KOH) à 10 %.
- « C » : solution concentrée d'hypochlorite de sodium ou bien eau de javel concentré du commerce.
- « P » solution alcoolique à 2 % de paraphénylène diamine base.
- « I » solution d'iodo-iodurée, ou Lugol.

On note pour l'ajout de K, K+ suivie de la couleur observée si la réaction est positive ou K- si aucune couleur n'est apparue, KC+ (rouge) qui signifie que le thalle sous l'effet d'une goutte de Potasse puis immédiatement une goutte d'hypochlorite de sodium se colore en rouge)

III.4 Matériel végétal

III.4.1 Récolte, identification et choix de l'espèce

Une sortie sur le site a été réalisée en moi de Mars 2017, dans la Forêt de Guerrouche, située dans le Parc National de Taza (Figure 7) les prélèvements ont été effectués au niveau d'une station, située sur une altitude de 860 m, l'identification de l'espèce a été faite en se basant sur la flore (Tiévant, 2001). Le choix de l'espèce se justifie par son abondance dans la station sélectionnée dont nous avons récolté un échantillon aléatoire, représentatif et en quantité suffisante, pour réaliser notre étude.

III.4.2. Position systématique du lichen *Evernia prunastri*

Pour la classification botanique de l'espèce à étudiée nous avons opté pour la nomenclature d'Ozenda et Clauzade (1970) :

Classe : Ascolichens

Sous classe : Discolichens

Ordre : Cyclocarpales

Sous ordre : Lécanorinées

Famille : Usnéacées

Genre : *Evernia*

Espèce : *Evernia prunastri*

III.5. Préparation du matériel végétal

Les thalles récoltés d'*Evernia prunastri* ont été soigneusement nettoyés, débarrassés de tout artefacts (poussière, support, mousses...etc.), puis séchés à l'air libre à température ambiante, pendant au moins trois jours.

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

III.5.1 Préparation de l'extrait lichénique

Pour estimer le contenu polyphénolique de l'espèce lichénique étudiée nous avons utilisé le méthanol comme solvant d'extraction qui permet d'extraire les métabolites secondaires.

▪ Macération

Le principe consiste à faire imprégner 1 g de poudre de lichens de l'espèce dans un volume de 10 ml du solvant (méthanol), sous agitation magnétique pendant 48h, l'extraction a été répétée trois ou quatre fois jusqu'à épuisement des thalles lichéniques (afin d'extraire un maximum de métabolites) à température ambiante.

Les extraits obtenus sont ensuite réunis et filtrés en utilisant du papier filtre (Watman n° 1).

L'extrait méthanolique, est concentré sous vide au rotavapeur rotatif à température 40°C pour évaporer le solvant (Yu et Dahlgren., 2005).

Le résidu sec obtenu est ensuite pesé et conservé à -18°C.

Le rendement d'extraction a été calculé selon la formule suivante :

$$R\% = \frac{Pr}{Pi} \times 100$$

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

III.6. Etude phytochimique

III.6.1 Détermination de la teneur des phénols 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

En présence de phénols, le mélange d'acide phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) est réduit en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 760 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux de composés phénoliques (Ribéreau-Gayon, 1968).

▪ Mode opératoire

Le dosage consiste à mélanger 50 μ l de l'extrait à une concentration de 0,5 mg/ml avec 450 μ l d'eau distillée et 250 μ l de réactif Folin -Ciocalteu (0,2 N). Après 5 min, 1250 μ l de Na_2CO_3 (7,5%) ont été ajoutés.

Après incubation du mélange pendant environ deux heures à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc constitué de tous les réactifs par l'expérience de l'extrait lichénique.

La concentration en phénols totaux de notre extrait est calculée à partir de l'équation de régression obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique qui a été utilisée comme standard (annexe1), la teneur en phénols totaux est donc exprimée comme un microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait brut [μ g Eq AG/ mg EB].

$$Y = 0,019x - 0,034$$

$$R^2 = 0,993$$

III.6.2 Détermination de la teneur des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de notre extrait a été déterminée par la méthode de trichlorure

d' aluminium citée par (Lamien-Meda *et al.*, 2008).

- **Principe de la méthode**

Le dosage des flavonoïdes est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$, ce réactif formes des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols.

La teneur des flavonoïdes est déterminée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage d'un flavonoïde standard, la quercétine.

- **Mode opératoire**

Un millilitre de chaque extrait à 0,5 mg / ml a été mélangée avec 1 ml de $AlCl_3$ à 2%.

L'absorbance a été mesurée à 415 nm après 10 minutes d'incubation à température ambiante contre blanc (solution de trichlorure d'aluminium). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalents de quercétine (EQ) / mg extrait sec en utilisant l'équation ci-dessous obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (**Annexe 1**) :

$$Y = 0,194x - 0,049$$

$$R^2 = 0,997$$

III.6.3 Détermination de la teneur des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (Julkunen-Titto, 1985).

- **Principe de la méthode**

Cette méthode repose sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en milieu acide pour produire un complexe coloré.

- **Mode opératoire**

Un volume de 50 μ l de l'extrait méthanolique est ajouté à 1500 μ l de la solution vanilline / méthanol (4%, m /v) et mélanger à l'aide d'un vortex, ensuite un volume de 750 μ l de l'acide chlorhydrique (HCL) concentré a été additionné.

Le mélange obtenu est laissé reposer à température ambiante pendant 20 minutes.

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 550 nm contre un blanc (méthanol).

Après repiquage sur bouillon nutritif des inoculums bactériens ont été transférées dans des tubes à essai contenant de l'eau physiologique afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité, exprimée par la mesure de la densité optique (0,08- 0,1) à 600 nm, et qui correspond à 10^8 UFC/ml, voisine à celle de McFarland de 0.5. Par la suite la surface entière de la gélose (Gélose Mueller Hinton) a étéensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile par cette suspension microbienne.

A partir d'une gamme de concentrations de l'extrait lichénique [0,8 mg /ml, 0,6mg/ml, 0,5mg/ml, 0.4mg/ml].

Des disques stériles de papier filtre de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 15 μ l de chaque concentration, les disques sont disposés à la surface de la géloseensemencée, ensuite les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C dans une étuve.

L'apparition d'une zone transparente autour des disques correspond à l'effet inhibiteur de l'extrait testé sur la croissance bactérienne (Choi *et al.*, 2006), plus le diamètre de la zone est grand plus la souche est sensible.

Le méthanol a été utilisé comme contrôle négatif dans cette expérience.

▪ Expression des résultats

L'activité antibactérienne de l'extrait étudié a été évaluée en mesurant les diamètres des zones d'inhibitions de croissance en millimètres (mm) à l'aide d'une règle.

III.8 Analyse statistique

On a effectué deux répétitions dans chaque concentration pour qu'on puisse calculer l'écart type et la moyenne.

L'étude statistique est réalisée par des logiciels EXCEL 2007 et XLSTAT-RIB 2015.

Les résultats nous donnent le degré de signification P où on dit que la différence :

- N'est pas significative si $P > 0.05$ (NS)
- Est significative si $0.05 > P > 0.01$ (*)
- Et hautement significative si $0.01 > P > 0.001$ (**)
- Est très hautement significative si $P < 0.001$ (***)

Chapitre IV

Résultats et interprétation

IV.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction méthanolique 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 (1g), (**Tableau 1**) :

Tableau 1 : Rendement de l'extrait méthanolique.

Echantillon	Extrait	Poids du résidu sec (g)	Rendement(%)	aspect	Couleur
<i>E.prunastri</i>	méthanolique	0,025	2,5	visqueux	Vert

On enregistre d'après le (**Tableau1**) un rendement de 2.5% après une extraction méthanolique effectuée sur une matière sèche de 1g.

IV.2. Etude phytochimique

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives de l'extrait méthanolique de l'espèce étudiée, un dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés a été effectué.

IV.2.1. Détermination de la teneur des phénols totaux

La méthode de Folin-Ciocalteu est considérée comme la meilleure pour la détermination du taux des phénols totaux des extraits.

La teneur en phénol totaux de notre extrait méthanolique a été effectuée on utilisant la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-ciocalteu, l'acide gallique est utilisé comme standard, nous a permis ainssi de tracer une courbe d'étalonnage avec ($R^2 = 0,99$) (**Annexe 1**).

La teneure est exprimé en (μg) équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait brut ($\mu\text{g Eq AG/mg EB}$), représentée dans le tableau ci-dessous et illustrée graphiquement dans la (**Figure 7**).

Tableau 2 : Teneurs en phénols totaux de l'extrait méthanolique d'*E.prunastri*.

Moy ± Ec	
Espèces	Phénols totaux µg Eq AG/mg EB
<i>E.prunastri</i>	54,39 ± 0,5

IV.2.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de tri-chlorure d'aluminium (AlCl₃), la quercétine prise comme standard nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage avec (R²= 0,99) (Annexe 1).

La teneur en flavonoïdes de notre extrait est rapportée en (µg) équivalent de la quercétine (Eq Q) par milligramme d'extrait brut.

Les résultats figurent dans le (Tableau 3) et illustrés graphiquement dans la (Figure 7).

Tableau 3: Teneurs en flavonoïdes, de l'extrait méthanolique d'*E.prunastri*.

Moy ± Ec	
Espèces	Flavonoïdes µg Eq Q/mg EB
<i>E.prunastri</i>	7,37 ± 0,28

IV.2.3 Détermination des tanins condensés

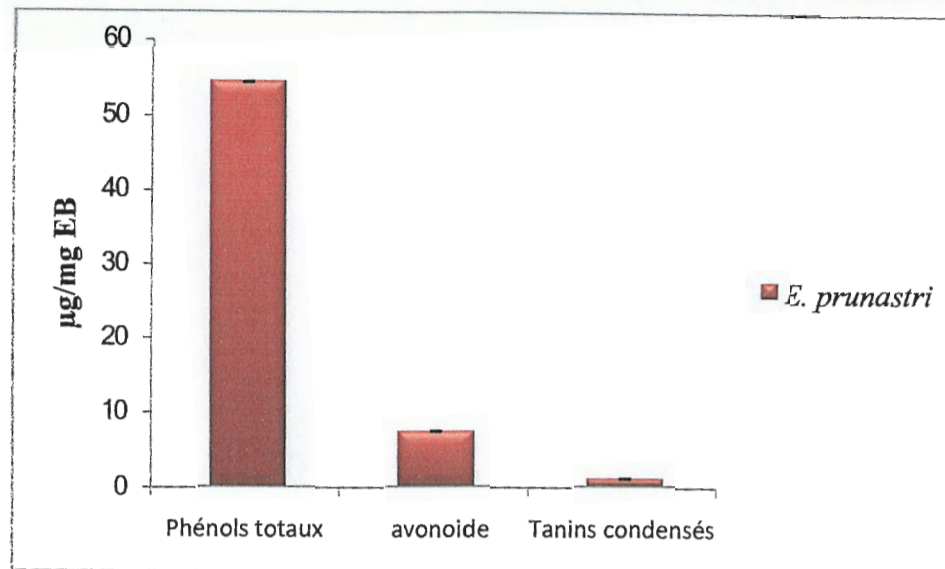
Le contenu des tanins condensés de notre extrait a été déterminé par la méthode de vanilline, en utilisant l'acide tannique comme standard, estimé à partir de la courbe d'étalonnage avec (R²= 0,99) (Annexe 1).

La teneur en tanins condensés est exprimée en µg équivalent d'acide tannique par milligramme d'extrait brut de lichen (µg Eq AT/mg EB).

Les résultats sont représentés dans le (Tableau 4) et illustrés graphiquement dans la (Figure 7).

Tableau 4 : Teneur en tannins condensés de l'extrait méthanolique d'*E. prunastri*

Espèces	Moy ± Ec
	Tannins condensés $\mu\text{g Eq AT/mg EB}$
<i>E. prunastri</i>	$0,99 \pm 0,001$

**Figure 7** : Teneur en phénols totaux, flavonoïdes, et tanins condensés d'*Evernia prunastri*

D'après les résultats mentionnés dans les (Tableau 2, 3, 4) et la (Figure 7) on remarque que la teneur en tanins condensés de l'extrait méthanolique d'*Evernia prunastri* [$0,99 \pm 0,001 \mu\text{g Eq AT/mg EB}$] est plus faible à celle enregistrée pour les phénols totaux [$54,39 \pm 0,50 \mu\text{g Eq AG/mg EB}$] et celle pour les flavonoïdes [$7,37 \pm 0,005 \mu\text{g Eq Q/mg EB}$].

IV.3 Evaluation de la bioactivité de l'extrait lichénique

IV.3.1 Evaluation de l'activité antioxydante

IV.3.1.1 Activité antiradicalaire contre le DPPH'

Le radical DPPH' est l'un des substrats les plus utilisés pour évaluer l'activité antioxydant en raison de sa stabilité en forme radical (Bozin *et al.*, 2008), de l'extrait méthanolique d'*E. prunastri*.

Le tableau ci-dessous représente les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction de différentes concentrations de l'extrait étudié. L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence (Tableau 5). Les résultats obtenus sont illustrés en histogrammes dans la (Figure 8).

Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire de l'extrait

Concentration	% d'inhibition	
	<i>E. prunastri</i>	Acide ascorbique
0,012 mg/ml	36,58±0,010	40,43±0,013
0,025 mg/ml	40,28±0,049	45,73±0,037
0,05 mg/ml	52,75±0,004	53,45±0,006
0,1 mg/ml	68,26±0,030	71,76±0,015

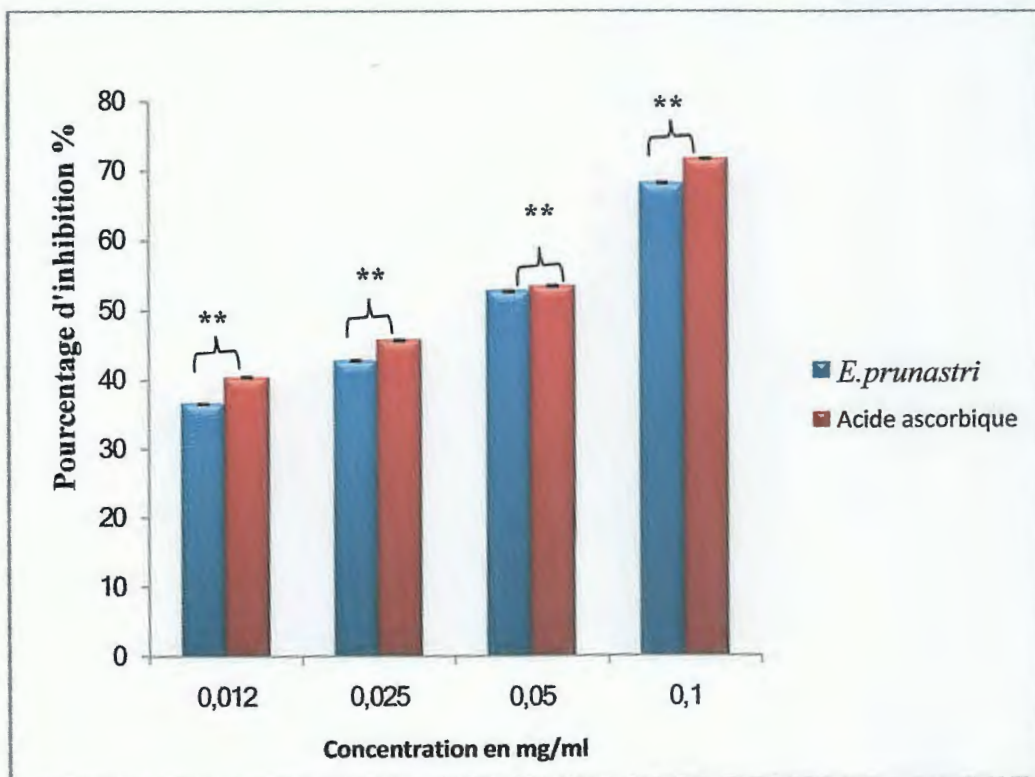


Figure 8 : Pourcentages d'inhibition du DPPH[•] pour l'extrait méthanolique et l'acide ascorbique.

D'après les histogrammes ci-dessus, on remarque que les pourcentages d'inhibition varient entre 36,58% et 68,26% pour l'extrait testé, et entre 40,43% et 71,76 % pour l'acide ascorbique.

On constate que les pourcentages d'inhibition du standard utilisé (acide ascorbique) sont proche à ceux enregistrés pour *Evernia prunastri* et ce pour toutes les concentrations.

Selon les résultats obtenus on conclut que le pourcentage d'inhibition est proportionnel à la concentration de l'extrait car l'augmentation du pourcentage d'inhibition est indicatrice d'une bonne activité antiradicalaire

- **Calcul des IC50**

L'IC50 exprime la concentration capable de piéger 50% du radical DPPH dans le milieu, est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est élevé (Brand-Williams et al., 1995), Il est calculée à partir de la droite $Y = a X + b$ et déterminé graphiquement par la régression linéaire établie entre le pourcentage d'inhibition et les différentes concentrations (Annexe 2), elle est exprimée en (mg/ml) cependant plus la valeur de IC50 est petite, plus le pouvoir antioxydant de l'extrait testé est grand, La valeur d'IC50 de l'extrait testé est représentée dans la (Figure 9).

Tableau 6 : Valeur d'IC50 de l'extrait testé et de l'acide ascorbique.

		Moy ± Ec	
IC50 mg/ml		<i>E. prunastri</i>	Acide ascorbique
		0,048±0,004	0,041±0,008

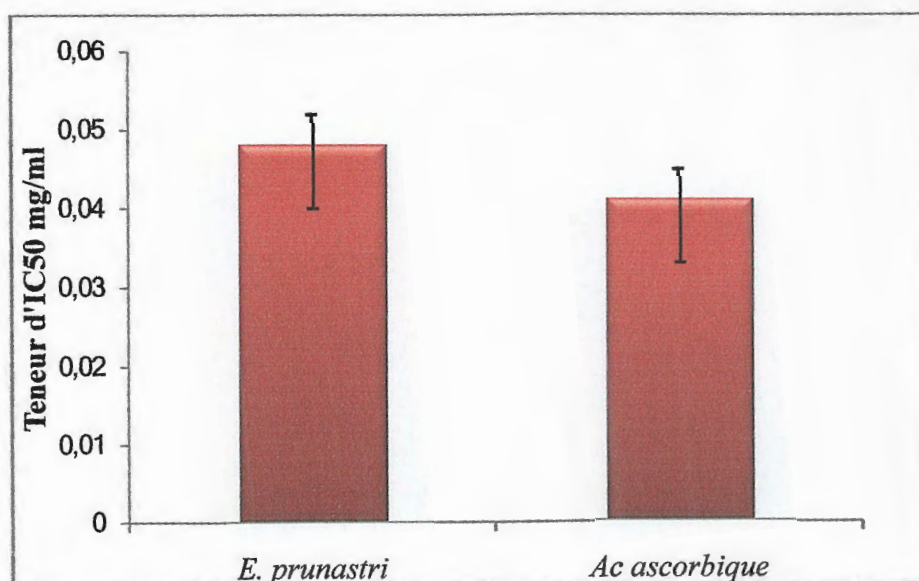


Figure 9: Valeur d'IC50 pour l'extrait testé et l'acide ascorbique.

Les résultats mentionnés dans la (Figure 9) révèlent la capacité de l'extrait testé à piéger le radicale libre (DPPH').

On constate que *E. prunastri* nécessite une faible concentration pour piégé 50% du radical DPPH' (IC50= 0,048) par rapport a la concentration enregistrée par l'acide ascorbique (IC50=0,041), utilisé comme antioxydant de référence.

La régression linéaire établie une corrélation significative entre le taux d'inhibition et la concentration de l'extrait méthanolique étudié, *Evernia prunastri* a cèle du standard avec respectivement $R^2= 0,99$, $R^2= 0,99$. Une variation hautement significative à été enregistrée entre l'espèce étudiée et l'acide ascorbique a toutes concentrations avec (P= 0,01).

IV.3.1.2 Pouvoir réducteur (réduction de fer)

Pour évaluer la capacité de fer de notre extrait testé nous avons utilisé la méthode de FRAP, la réaction pour réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} peut être mesurée par l'intensité de la solution bleu vert qui en résulte, cependant la puissance de réduction est un des mécanismes antioxydants (Karagozler et al., 2008).

Le pouvoir réducteur de l'extrait de lichen étudié est testé à différentes concentrations, allant de 0,1 à 0,8 mg/ml. Les valeurs des absorbances obtenues sont illustrées dans le (Tableau 7) et la (Figure 10) pour l'espèce étudiée et pour l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif.

Tableau 7: Variation des absorbances d'extrait étudié et du standard.

Concentration	Moy (Abs 700 nm)± Ec	
	<i>E. prunastri</i>	Acide ascorbique
0,1	0,2737±0,019	0,3041±0,005
0,2	0,2803±0,006	0,3243±0,024
0,4	0,2848±0,010	0,3799±0,005
0,6	0,2874±0,08	0,4082±0,031
0,8	0,3442±0,060	0,4422±0,076

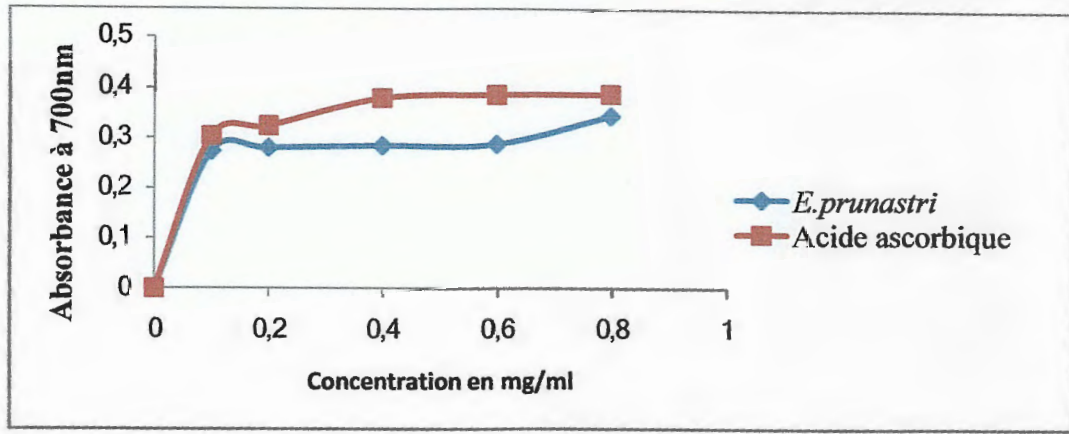


Figure 10 : Pouvoir réducteur pour l'extrait méthanolique et l'acide ascorbique.

D'après ces résultats on remarque que l'extrait méthanolique d'*Evernia prunastri* montre une activité faible pour réduire le fer par rapport à celle exercée par l'acide ascorbique, reflétée par les absorbances obtenues à différentes concentrations, dont nous avons enregistré l'absorbance maximale (Abs=0,34 à la concentration 0,8 mg/ml).

Les résultats confirment que la capacité de réduire le fer est proportionnel à l'augmentation de la concentration de l'extrait étudié, cependant l'augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé (Kosanic et Rankovic, 2011).

- **Calcul de Cr 0,5**

Dans le but de comparer l'activité antioxydante de l'extrait et de l'acide ascorbique, on a introduit le paramètre de Cr 0,5 qui est la concentration du substrat pour le quelle le produit de la réduction donne une absorbance de 0,5 à 700nm et qui représente la réduction de 50% du fer.

Il est calculé à partir de la droite $Y = a X + b$ et déterminer graphiquement par la régression linéaire établie entre les absorbances et les différentes concentrations de l'extrait testé et de l'acide ascorbique (Annexe3).La valeur obtenue est illustrée dans le (Tableau8) et la (Figure 11).

Tableau 8 : La valeur de Cr0,5 de l'extrait testé et l'acide ascorbique.

		Moy ± Ec	
		<i>E. prunastri</i>	Acide ascorbique
Cr 0,5 mg/ml		2,88±0,08	1,07±0,03

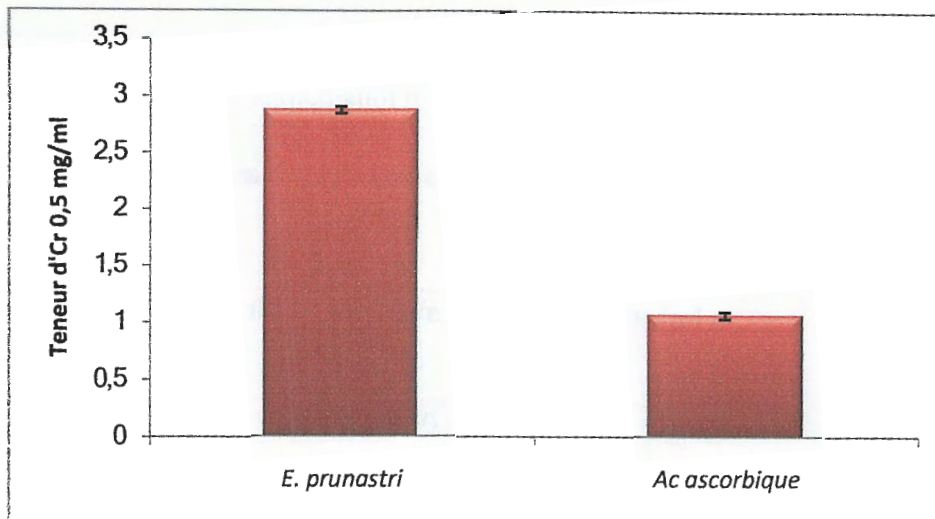


Figure 11 : Valeur de Cr 0,5 pour l'extrait et l'acide ascorbique

A partir de ces résultats on constate que la capacité à réduire le fer est variable, elle est beaucoup plus pour l'acide ascorbique (Cr 0,5=1,07 mg/ml), suivi par *Evernia prunastri* (Cr 0,5=2,88 mg/ml). Donc on estime que l'extrait méthanolique étudié n'est pas doté un potentiel réducteur élevé, comparé à celui de l'acide ascorbique puisque celui-ci est un puissant antioxydant.

La régression linéaire établie entre l'absorbance et la concentration de l'extrait testé, et du standard permet de tracer des courbes linéaires avec respectivement ($R^2 = 0,69$, $R^2 = 0,97$). Une variation significative a été enregistrée entre l'espèce étudiée et l'acide ascorbique a toute concentration avec ($P = 0,05$).

IV.3.2 Evaluation de l'activité antibactérienne

Le potentiel antimicrobien de notre extrait lichénique a été évalué par l'utilisation de quatre souches bactériennes de différentes structures cellulaires : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella. spp* à Gram-positif tandis que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* sont à Gram-négatif.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 9) :

Tableau 9 : Effet du méthanol sur les souches bactériennes

Souches bactériennes	<i>S. aureus</i>	<i>S. spp</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Méthanol (control négatif)	-	-	-	-

(-) : Pas d'inhibition

Discussion

Les extraits naturels des lichens contiennent une variété de composés phénoliques aux quels sont attribuées diverses activités biologiques (Esteban, 2012). Cependant les résultats obtenus révèlent la présence de divers composés phénoliques, notamment les phénols totaux, les flavonoïdes, et les tanins dans l'extrait méthanolique d'*Evernia prunastri*.

La teneur en phénols totaux de notre extrait est de l'ordre de 54,39 $\mu\text{g Eq AG/mg}$ de l'extrait brut, néanmoins elle est supérieure à celle mentionnée dans les travaux de (Kosanić et al., 2013) qui est de l'ordre de 34,05 $\mu\text{g EAG/mg}$ de l'extrait brut. Nous constatons ainsi la richesse du lichen *Evernia prunastri* en flavonoïdes (7,37 EQ/mg de l'extrait brut), et en tanins condensés.

Selon Behera et al., (2009) 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.

Le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les antioxydants d'une plante (Sun et al., 2007). Pour cela nous avons choisi ce solvant pour l'extraction des différents composés phénoliques.

Selon Yamamoto et al., (2015), Ganesan et al., (2015) et Plaza et al., (2014), les composés phénoliques sont l'une des plus grandes classes des biomolécules secondaires, qui peuvent être collaborées dans diverses activités, notamment les activités antioxydantes et antibactériennes car ils peuvent participer comme donneurs d'électrons dans le milieu réactionnel.

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). Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier l'activité antioxydante d'*Evernia prunastri*, nous avons remarqué que le pourcentage d'inhibition du DPPH de l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence ainsi que celui de l'extrait d'*Evernia prunastri* augmente avec la concentration.

Nos résultats indiquent que l'extrait testé est très actif en piégeant les radicaux libres du DPPH avec une IC50 qui est de l'ordre de 0,048mg/ml elle est presque identique à celle notée pour l'acide ascorbique (0,041 mg/ml). ce résultat est inférieur à celui mentionné dans les travaux de (Kosanović et al., 2013), dont il a été enregistré une IC50 égale à 0,66 mg/ml pour la même espèce.

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur des extraits lichéniques est un indicateur significatif de leurs activités antioxydantes, cette activité a été toujours corrélée avec la teneur élevée en phénols totaux (Grujicic et al., 2014).

La présence des réductants dans un milieu donné cause la réduction du complexe Fe^{3+} ferricyanide à la forme Fe^{2+} . En effet, la formation de Fe^{2+} peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la densité de la couleur bleu du complexe ferreux du milieu. Cependant, la présence des réducteurs

notamment les polyphénols dans les extraits de plante provoquent la réduction de fer ferrique Fe^{+3} en fer ferreux Fe^{+2} (Karagozler et al., 2008), par leurs groupements hydroxyles, les composés phénoliques peuvent servir comme donneurs d'électrons pour piéger divers oxydants.

Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé (Öztürk et al., 2007).

L'acide ascorbique possède une activité réductrice plus importante que celle notée pour l'extrait d'*Evernia prunastri* avec une valeur de 1,07 mg/ml. L'extrait d'*Evernia prunastri* a une valeur de CR 0,5 égale à 2,88 mg/ml.

D'après nos résultats, l'extrait méthanolique d'*Evernia prunastri* a une activité inhibitrice modérée contre les microorganismes testés. Il a été démontré que l'activité antimicrobienne varie en fonction de l'espèce et du solvant utilisé dans l'extraction (Rancovic, 2015).

D'une manière générale, les bactéries à Gram négatif (*E.coli* et *Pseudomonas*) étaient plus résistantes que les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus* et *Salmonella*), cette différence de sensibilité peut être attribuée à des différences morphologiques entre ces microorganismes, surtout à des différences de perméabilité de la paroi cellulaire, sachant que la structure cellulaire des bactéries à Gram positif est constituée de peptidoglycane et d'acide téichoïque tandis que celles des bactéries à Gram négatif est faite de peptidoglycane, lipopolysaccharides et lipoprotéines (Kosanic' et Rancovic', 2012).

Conclusion

Dans le cadre de la détermination de quelques composés lichéniques à intérêt économiques et écologiques, notre travail a été entamé d'une étude phytochimique de l'extrait brut du lichen *Evernia prunastri*.

La présente étude s'articule autour de la connaissance des activités biologiques et de la composition phytochimique de l'extrait brut de lichen *Evernia prunastri*. L'étape d'extraction a été réalisée par le dosage des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés biologiques de l'extrait méthanolique brut de notre espèce en estimant leur activité antioxydante et antimicrobienne.

Les phénols totaux sont estimés par la méthode de Folin- Ciocalteu, tandis que les flavonoïdes ont été réalisés selon la méthode de tri-chlorure d'aluminium, les tanins condensés ont été déterminés par la méthode de vanilline.

Les résultats ont montré que l'extrait méthanolique étudié est plus riche en phénols totaux [54,39 ± 0,50] µg Equivalent d'acide Gallique pour 1g d'extrait par rapport à celle des flavonoïdes [7,37 ± 0,28] µg Equivalent de la quercetine et celle des tanins condensés [0,99 ± 0,001] µg Equivalent d'Acide Tannique.

L'activité antioxydant de notre extrait est évaluée par deux tests : l'activité anti radicalaire contre le DPPH et le pouvoir réducteur du fer.

Le test au DPPH révèle que l'extrait est actif comme piègeurs du radical DPPH qui est effectivement riches en composés phénolique on comparaison avec l'acide ascorbique qui confirme leur puissance antioxydant.

Le calcul de IC₅₀ met en évidence le fort potentiel antioxydant de l'extrait lichénique (0,048mg/ml) par comparaison a celui de l'acide ascorbique (0,041mg/ml).

Le calcul de Cr 0,5 a confirmé la forte capacité réductrice de fer notée par notre extrait testé (Cr 0,5=2,86 mg/ml) est cela traduit par les valeurs des absorbances obtenues dont les plus élevé sont marqués par l'absorbance maximale 0,34 à la concentration 0,8 mg/ml.

L'activité antibactérienne a été effectuée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion sur disque, les résultats ont montrés une faible activité antimicrobienne de l'extrait testé traduit par des faibles diamètres des zones d'inhibition enregistrées dont les bactéries à Gram négatif étaient plus résistantes par rapport au Gram positif.

✓ Perspective de recherche

Le prolongement de ce travail de mémoire pourrait se faire en tentant

- De mettre en évidence les potentielles activités biologiques de l'extrait d'*Evernia prunastri*
- De déterminer avec certitude les molécules présentes et responsables de ces activités, et enfin, de tenter de comprendre les mécanismes fonctionnels mis en jeu
- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante et antibactérienne des métabolites secondaires synthétisés par les lichens.

Références bibliographiques

A

- Ahamet S., (2003).** Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae). Thèse de pharmacie. Bamako. 117 p.
- Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., (2008).** Tannin contents of selected plants used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 - 274.
- Amandine D., (2015).** Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique. Etude phytochimique de trois lichens et approche synthétique de deux composés actifs. Thèse doctorale. LIMOGES. 16p.
- Andersson S.G.E., Zomorodipour A., Andersson J.O., Sicheritz-Ponten T., Alsmark U.C.M., Podowski R.M., Naslund A.K., Eriksson A., Winkler H.H., Kurland C.G., (1998).** The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*. 396(6707), 133-140.
- Andreumont A., (2002).** Pression de sélection antibiotiques, flores commensales et évolution de la résistance. *J Pédiatr Puericulture*. 15(3): 160-65.
- Armstrong R. A., Welch A. R., (2007).** Symbiosis et "tapis" de ce lichen en Suède. 43 : 1-12.

B

- 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^{em} edition. Springer, India. 232 p.
- Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U., (2005).** Antioxydant and antibacterial activities of aichen. *Usnea Ghattensis In Vitro. Biotech. Lett.* 27: 991-995.
- Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U., (2009).** Optimization of Culture Condition For Lichen *Usnea Ghattensis* G. Awasthi to Increase Biomass and Antioxydant Metabolite Production. *Food Technol. Biotechnol.* 47 : 7-12.
- Bellenfant S., Beguinot J., Vallade J., Sirugue D., Lemmel C., (2010).** Le groupe lichen de bourgonge (GLIB). Les lichens une symbiose exemplaire. *Rev. Sci. Bourgogne-Nature*. 45p.
- Blondeau M., Roy C., (2004).** Atlas des plantes des villages du Nunavik. *Multimonde*, Québec. 428p.
- Boissiere J.C., (1990).** Les lichens saxicoles et terricoles de la forêt de Fontainebleau, *Bulletin de la Société Botanique de France*. 137:23,175-195.
- Boullard B., (1988).** Dictionnaire : Plantes & Champignon. 2^{em}e Edition. ESTEM. Paris. 341p.
- Boullard B., (2006).** Plantes et Arbres : Remarquable des ruex, squares et jardins de Round. *PTC*. 119p.
- Boullard B., (1997).** Dictionnaire Plantes & Champignons, ESTEM, Paris. 465p.

- Bonnet C., Alamigeon F., Micheels P., (2010).** Guide complet des soins esthétiques: du coté de ma vie. *Eyrolles*. 14 p.
- Bossokpi I.P.L., (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, *Bamako*, 133 p.
- Boustie J., Tomasi S., Grube M., (2011).** *Phytochemistry Reviews* 10: 287-3.
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Anackov G., Igetic R., (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*. 111:925–929.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technology*, 28, 25–30.
- Bricau O., (2010).** Les lichens des forêts de la région méditerranéenne française et leur relation avec la continuité écologique des boisements. *Wwf*, France. 118p.
- Bricau O., (2006).** Aperçu de la végétation lichénique du site de Saint Daumas (Var) et de deux stations de la plaine des Maures. *Wwf*, France. 44p.
- Bruyère J., (2010).** Regarde sur les lichens En languedoc-Roussillon. *QUET*. France. 91p.
- Burkin A.A., Kononenko G.P., (2014).** Metabolites of Toxicogenic Fungi in Lichens of Genera *Alectoria*, *Bryoria*, *Evernia*, *Pseudevernia*, and *Usnea*. *Moscow*. N° 4 : 361–367.
- Burkin A.A., Kononenko G.P., (2011).** Mycotoxin contamination of cup moss. *Dokl. Ross. Akad. S.-Kh. Nauk*, N° 2. 54–56p.

C

- Cano N., Barnoud D., Schneider S. M., Vasson M.P., Hasselmann M., Leverve X., (2006).** Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Springer*. 255p.
- Cardarelli M., Serino G., Campanella L., Ercole P., De Cicco Nardone F., Alesiani O., Rossiello F., (1997).** *Cellular and molecular life sciences*, 53, 667-672.
- Choi Y., Noh D., Cho S., (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. 39: 756-761.
- Clauzade G., Roux C., (1987).** Généralités sur les lichens et leur détermination. Tome 18, *Dignac*, Paris . 148p.
- Cowan M.M., (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582.
- Courvalin P., (2008).** La résistance Des Bactéries Aux Antibiotiques: Combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. Tome 161-N°1. *Bull. Acad. Vét. France*. 7-1
- Culberson., (1963).** The lichen substances of the genus *Evernia*. Vol.2 : 335-340.
- Culberson C.F., Elix J.A., Dey P.M., Harborne J.B., (1989).** Lichen substances. In *Methods in Plant Biochemistry, Plant Phenolics*. Academic Press. *London*. Vol. 1: 509–535.

D

- Dai J., Mumper R. J., (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15(10): 7313-52.
- Davies J., Davies D., (2010).** Microbiology and molecular biology. *Reviews*. 4 (3): 417-433.
- Delattre J., Beaudoux J.-L. Bonnefont- Rousselot D., (2005).** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. 1- 23.
- Diaz L., De-Montijo S., Medina A., Meléndez P., Laurence V., Marti-Mestres G., (2011).** Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium Floribundum* Against Acne-Inducing Bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *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., Hiltunen R., (2004).** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agr. Food Chem*. 52: 762-770.

E

- Elix J.A., Stocker-Wörgötter E., (2008).** Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash III TH, editor. Lichen biology. University Press. *Cambridge*.104–133.
- Ekoumou C., (2003).** Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie. *Bamako*. 145p.
- Esteban I., (2012).** Liquenes usados en medicina tradicional. *Bol Soc Micol Madrid*. 36:163-174.
- Evans P., Halliwell B., (1999).** Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 884: 19-40.

F

- Favero-Longo S. E., Piervittori R., (2010).** Journal of plant interactions. 5 (3) :163-177.
- Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., (2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires. *Romandes*.121-216.

G

- Galiana D., Le Roux C., Monchâtre I., (2015).** La gestion du vivant et des ressources. Bac technologique STAV: Module M72.Biologie-Ecologie. *Educagri*. Paris.28p.

- 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.
- Ghedira K., (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*.3 (4): 162-169.
- Geneveès L., (1990).** Biologie Végétale : Thallophytes et Microorganismes. *Dunod*. Paris. 91p
- Goudable, J., Favier A., (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*.11 : 115-120.
- Grujicic M., Snipes J., Ramaswami S., Yavari R., Cheeseman B., (2014).** Multi-Scale Computation-Based Design of nano-segregated polyurea for maximum shockwave-mitigation performance. *AIMS. Mater Sci.* 1 : 15 : 27.
- Guillemot D., Leclercq R., (2005).** Impact de l'exposition des populations sur le risque Bactérienne. *Med Mal Infect.* 35 (3) :212-20.
- Guignard J.L., (1996).** Abrégé de biochimie végétale, Ed. *Masson*, Paris. 160

H

- Hoffmann D., (2003).** Medical Herbalism: The science and practice of herbal medicine. Edition Inner Traditions . *Bear & Co.* 90p.
- Hopkins W.G., (2003).** Physiologie végétale. *De Boeck Supérieur*. 280p.
- Humbert R.,(2012).** Les lichens : Un autre monde. *Isatis*. N°12 : 182-189.
- Huneck S., (1999).** The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*. 86, 559-570.

J

- Julkunen-Titto R., (1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agricultural and food chemistry*, 33, 213-217.

K

- Karagozler A.A., Erdag B., Emek Y.C., Uygun D.A., (2008).** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chem.* 111 : 400-407.
- Keller R., (2010).** A la découverte des lichens – le 12 septembre 2009. *Bulletin du Cercle vaudois de botanique* 39: 73-80.
- Korkina L., De Luca C., Pastore S., (2012).** Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1259**: 77-86.

Kosanic' M., Rancovic' B., (2012). Lichens as possible sources of antioxidants. *Pak J Pharm Sci.* 24(2) : 165-170.

Kosanić M., Manojlović N., Janković S., Stanojković T., Ranković B., (2013). *Food and Chemical Toxicology.* 53:112-118.

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.

L

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.

Lacha T., Pauli D., Gonseth Y., Klaus G., Scheigger C., Vittoz P., Walter T., (2011). Evolution de la biodiversité en Suisse depuis 1900. Avons-nous touché le fon. *Brustol-Stif. Suisse.* 232p.

Le Perchec P., (1994). Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection. *Ed. Nathan,* Paris. 142 p.

Leclerc V., Floch J.Y., (2010). Les secrets des algues. *Quae,* France. 69p.

Letrouit-Galinou M.A., Roux C., Bellemere A., Boissiere J.C., Esnault J., Janex-Favre M.C., Wagner J., (1986). Les bases de la systématique moderne des Lichens. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques.* 133:2, 7-40.

M

Macías F.A., Molinillo J. M. G., Varela R. M., Galindo J. C. G., (2007). Pest management science. 63: 327-348.

Marouf A., Reynaud J., (2007). La botanique de A a Z. *Dunod,* Paris. 352 p.

Micheletti A.C., Beatriz A., De Lima D.P., (2009). Constituintes quimicos de *Parmotrema Lichexanthonicum Eliasaro & Adler*—Isolamento, Modificacoes estruturais avaliacao as atividades antibiotica citotoxica. *Quim Nova.* 32 : 12-20.

Mohammedi Z., (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.

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

N

- Nash T., (2008).** Lichen Biology. Second Edition. Combridge Univetsity, Press. New York. 486p.
- Nguyen K.H., Chollet-Krugler M., Gouault N., Tomasi S., (2013).** Natural product Reports. 30 (12): 1490-1508.

O

- Oyaizu M., (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxi-dative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Ozenda P., Clauzade G., (1970).** Les lichens : Etude biologique et flore illustrée. *Masson*. Paris. 800 p.
- Ozenda P., (2000).** Les végétaux organisation et diversité biologique. 2^{ème} Edition. *Dunod*. Paris. 175-190 p
- Öztürk M., Aydoğmus-Öztürk F., Duru ME., Topçu G., (2007).** Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chem.*103:623–630.

P

- Packer R., Packer L., Rosen P., Tritschler H.J., King G.L., Azzi A., (2000).** Oxidative and antioxidants: The ntioxidant Network, a-lipoic acid, and diabetes. In: *Antioxidants in diabetes management. INC Marcel Dekker*. 110 p.
- Papazian L., Roch A., (2008).** Le syndrome de détresse respiratoire aiguë. Edition *Springer*. 153p.
- Parc National de Taza., (2016).** Plant de Gestion (2014-2019), Partie A : Approche Descriptive et Analytique. 37P.
- Paudel B., Bhattarai H.D., Lee J.S., Hong S.G., Schin H.W., Yim J.H., (2008).** Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biol* 31 : 605-608.
- Perraud R., Bliefert C., (2007).** Chimie de l'Environnemet : Air, eau ,Sol , Déchets.2^{ème} Edition. *De boeck* . Paris. 472p.
- Piovano M., Garbarino J.A., Giannini F.A., Correche E.R., Feresin G., Tapia A., Zacchino., Enriz R.D., (2002).** Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Bol Soc Chil Qui'M* 47:235-240.
- Pires R.H., Lucarini R., Mendes-Giannini M.J.S., (2012).** Antimicrobial and agents and chemotherapy. 56 (1), 595-597.
- Plaza C., Lorena E., Diaz De T., Robert K., Lückingf., (2014).** Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from venezuelan andes *Journal of Pharmacy &Pharmacognosy.Research*, 2(5), 138-147.

Purvis O. W., (2014). Botanical studies. 55: 23-36.

Podterob A. P., (2008). Pharmaceutical chemistry journal. 42 (10):582-588.

R

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

Ribéreau-Gayon P., (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition *Dunod*, Paris. 173-201 p.

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996). Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20** (7): 933-956.

Roland J.C., Bouteau H., Bouteau F., (2008). Atlas biologie végétale. Organisation des plantes sans fleurs, Algues et Champignons. 7^e Edition. *Dunod*. Paris. 115p.

Roland G.C., Vian B., (1999). Atlas de biologie végétale 1. Organisation des plantes sans fleurs. 5^{ème} Edition. *Dunod*. Paris. 8-34 p.

Rowe J.G., Saenz M.T., Garcia M. D., (1989). Annales pharmaceutiques Françaises. 47 (2):89-94.

S

Salem S., (2013). Contribution a l'étude de la diversité des lichens dans la Parc National de Taza. Mémoire de Magister. Université Mohamed Seddik Ben Yahia. Jijel. 100p.

Sartori-Thiel A., (2003). Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. *Science et Agronomie ED 380 Doctorat*: 177.

Seaward M. R. D., (1997). International biodeterioration & biodegradation. 40 (2-4): 269-273.

Sell Y., Benezra C., Guegin B., (2001). Plantes et réactions cutanées. JL. Bruxelles. 42-43p.

Shukla V., Pant Joshi G., Rawat M. S. M., (2010). Phytochemistry. *Reviews*. 9:303-314.

Stocker-Wörgötter E., Mach Cortes Cordeiro L., Lacomini M., (2013). Studies in natural products chemistry. 39: 337-380.

Subramanion L., Zuraini Z., Sasidharan S., (2011). Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract. 5(10), 1941-1947.

Sun T., Gia Z.S., Chen W.Z., Jin Y.X., Dexu Z., (2007). Active oxygen radical scavenging ability of Water- Soluble β -Alanin C60. *Chin. Chem. Lett.* 12 (11): 997-1000.

Suty L.,(2015). Les végétaux : Des symbioses pour mieux vivre. *Quae*. Paris. 24.

T

Tiévant P., (2001). Guide des lichens 350 espèces de lichens d'Europe. *Delachaux et Niestlé*. Paris. 304 p.

W

Wright G.D., (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv. Rev.* 29, 57 (10):1451-70.

V

Van Haluwyn C., Lerond M., (1993). Guid des lichens. *Lechevalier*. Paris. 376p.

Y

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^{em} edition. *Springer*. India. 232p.

Yılmaz M., Türk A.O., Tay T., Kıvanç M., (2004). Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 59: 249-254.

Yu Z.; Dahlgren R.A., (2005). Evaluation Of Methods for Measuring Polyphenols In Copper Foliage. *J. Chem. Ecol*, 26 : 2119-2140.

Z

Zambare V. P., Christopher L. P., (2012). *Pharmaceutical Biology*. 50 (6): 778-798.

Annexes

Annexe 01 : Courbes d'étalonnages

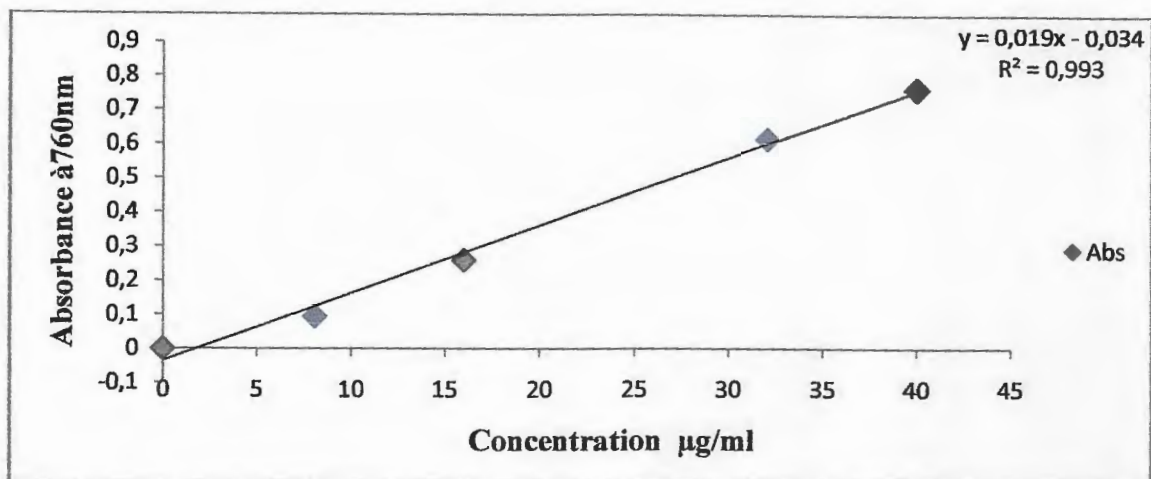


Figure 12 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

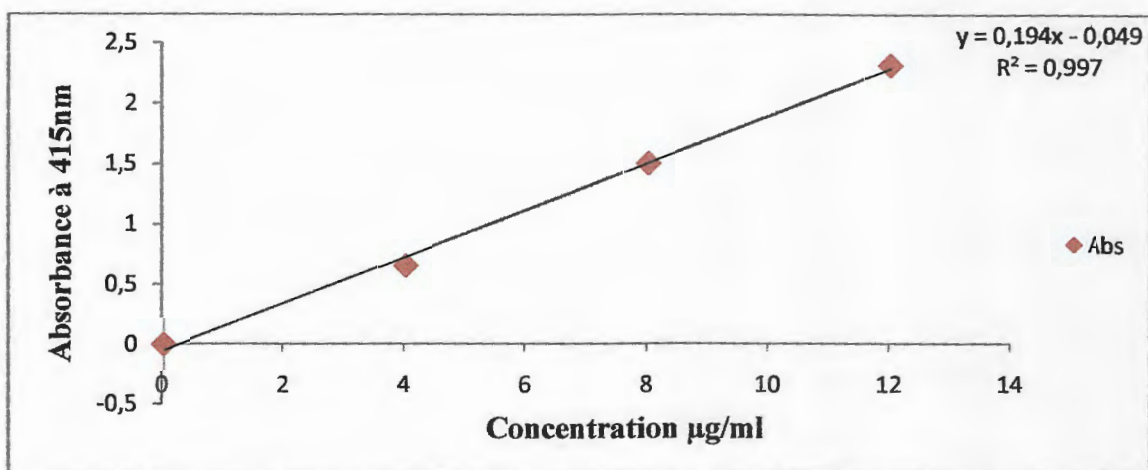


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la quercetine

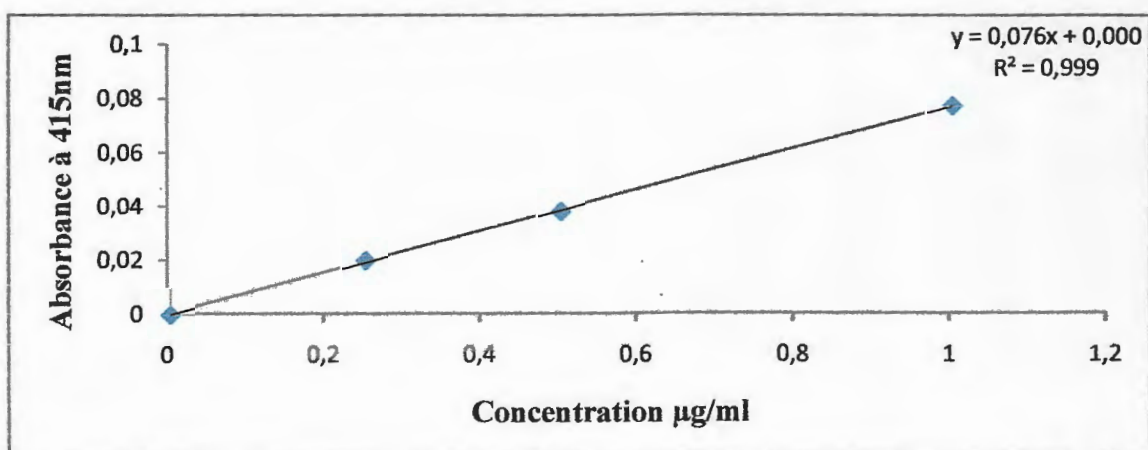


Figure 14 : Courbe d'étalonnage d'acide tannique

Annexe 02 : Calcul d'IC50 de l'extrait méthanolique de l'espèce étudiée et de l'acide ascorbique

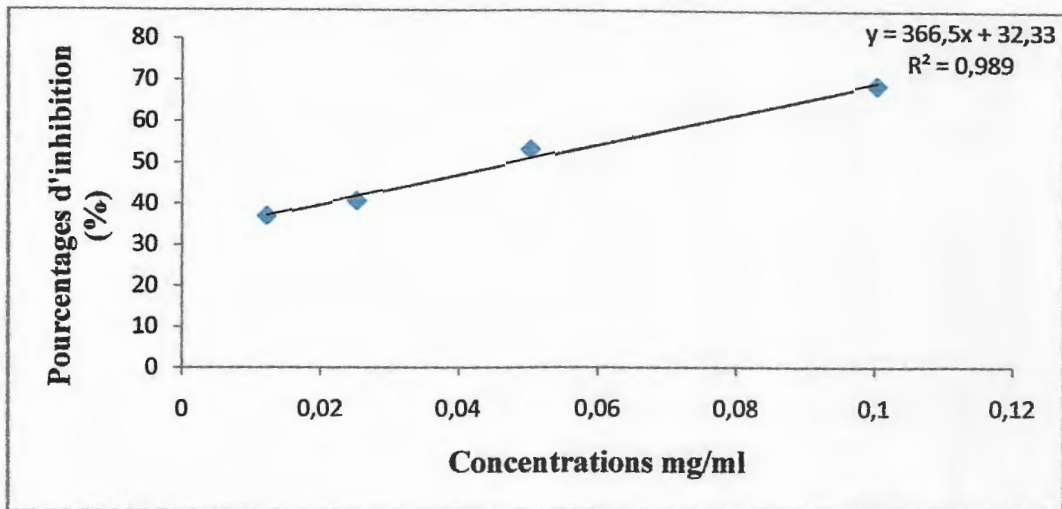


Figure 15 : Régression linéaire entre le Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait pour *E. prunastri*

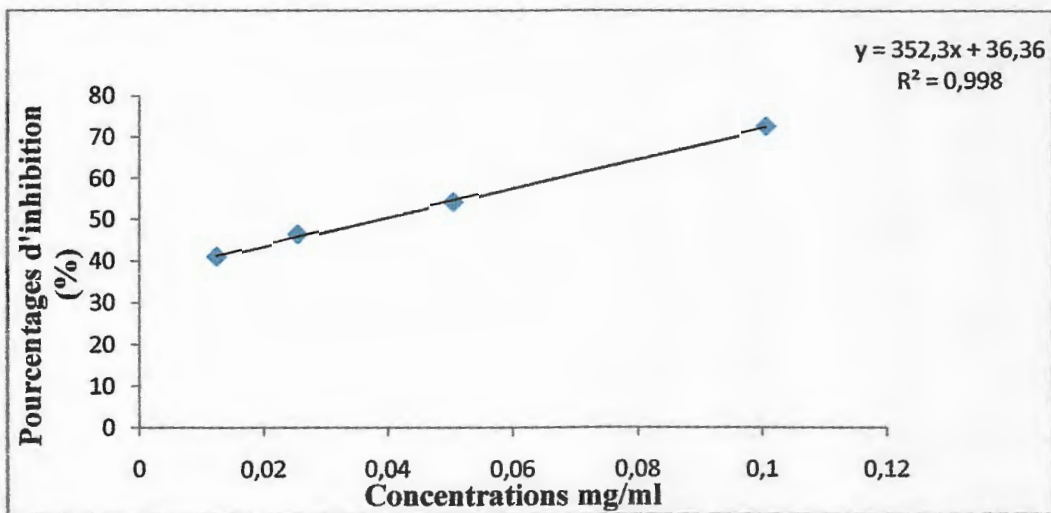


Figure 16 : Régression linéaire entre le Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique

Annexe 03 : Calcul de CR 0,5 de l'extrait méthanolique de l'espèce étudié et de l'acide ascorbique

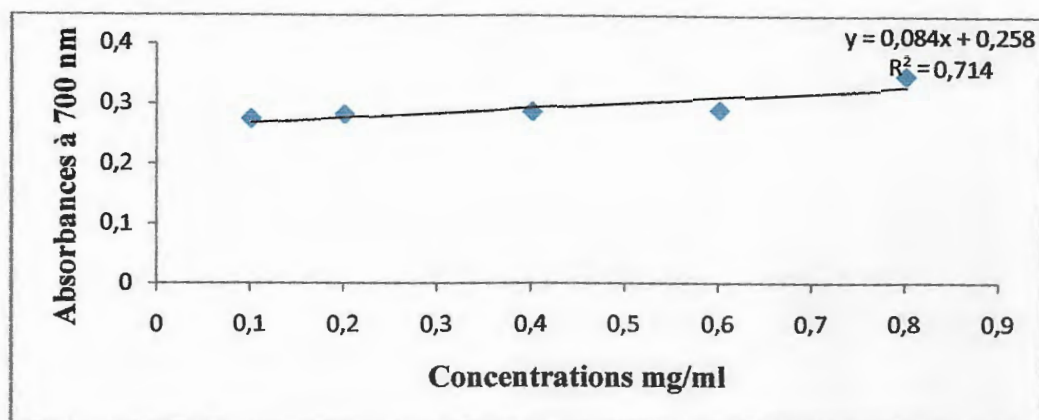


Figure 17 : Régression linéaire entre le Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'*Evernia prunastri* en fonction des concentrations

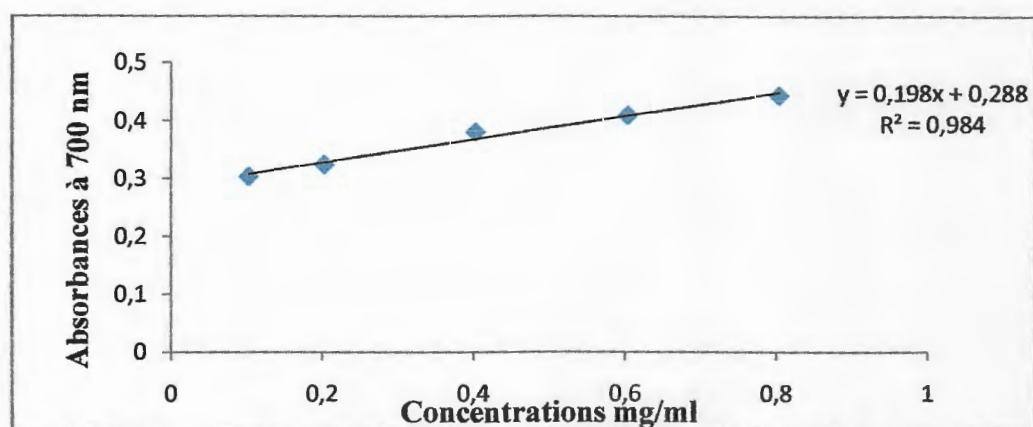


Figure 18 : Régression linéaire entre le Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique en fonction des concentrations

Annexe 04 : Résultats de l'activité antibactérienne

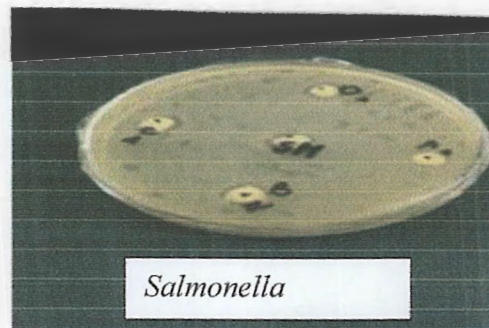
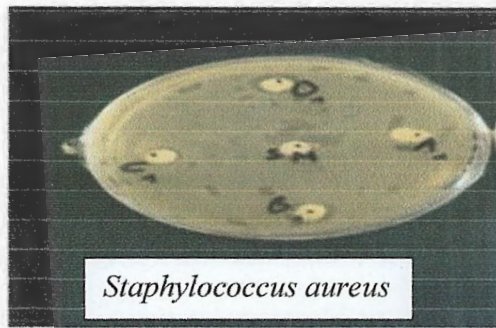


Figure 19 : *Evernia prunastri* contre les bactéries Gram+

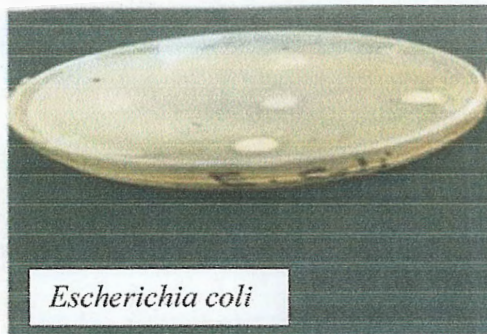


Figure 20 : *Evernia prunastri* contre les bactéries Gram-

Présenté par : Boudjellal Nouara

Harouche Souheyr

Encadreur : M^{elle} Salem S

Date de soutenance : Juillet 2017

Thème

Evaluation de l'activité biologique de l'extrait brut du lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach

Résumé

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique de l'extrait lichénique de l'espèce *Evernia prunastri* par des composés phénoliques : phénols totaux (estimés par la méthode de Folin- Ciocalteu), flavonoïdes (réalisés selon la méthode de tri-chlorure d'aluminium) et les tanins condensés (déterminés par la méthode de vanilline).

Les résultats montrent la richesse de notre espèce *Evernia prunastri* par ces composées phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés).

Dans l'étude de l'activité antioxydante on a utilisé deux tests : le piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur. Les résultats obtenus montrent que lichen étudié a une activité antioxydante modérée par rapport à l'acide ascorbique.

Dans l'étude de l'activité antibactérienne sur les quatre souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Salmonella. Spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. On a utilisé la méthode de diffusion sur disque, les résultats de cette étude nous a confirmé que notre lichen possède une activité antibactérienne.

Mots clés : Étude phytochimique, extrait lichénique, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

Our work has focused on the study phytochemical extract Lichen *Evernia prunastri* by phenolic compounds here: total phenols (estimated by Folin - Ciocalteu method), flavonoids (made according to the method of tri-chlorure of aluminium) and the condensed tannins (determined by the method of vanillin).

The results show the richness of our species of *Evernia prunastri* by these phenolic compound (total phenols, flavonoids, and condensed tannins).

Two tests were used in the study of the antioxidant activity: the DPPH radical trapping and reducing power. The results obtained show that studied lichen has a moderate compared to Ascorbic acid antioxidant activity.

In the study of antibacterial activity on the four bacterial strains *Staphylococcus aureus*.

Salmonella. SPP, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. The disk diffusion method was used, the results of this study confirmed that our lichen has antibacterial activity.

Key words: Phytochemical study, lichen extract, phenolic compounds, antioxidant activity, antibacterial activity.

ملخص

يستند عملنا على دراسة الكيمياء النباتية لمستخلص الأشنة من نوع *Evernia prunastri* من الفينول: مجموع الفينول (تقدرها طريقة فولين Ciocalteu)، الفلافونويد (وفقا لأسلوب ثلاثي كلوريد الألومنيوم) والعفص مكثف (تحده طريقة فانيليا) أظهرت النتائج وجود هذه المركبات الفينولية (مجموع الفينول، مركبات الفلافونويد والعفص مكثف)

من خلال دراستنا للنشاط المضاد للأكسدة قمنا باستخدام تقنيتين، القيام بمحاصرة جذرية لـ DPPH وتقنية القدرة على التخفيض النتائج التي تم التوصل إليها تبين أن هذه الأشنة تتمتع بنشاط معتبر مضاد للأكسدة مقارنة مع حمض الأسكوربيك.

من ناحية أخرى، وفيما يتعلق بدراسة النشاط المضاد للبكتيريا استخدمنا أربعة أنواع من البكتيريا (*Staphylococcus aureus*) (*Salmonella. Spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). اعتمادا على طريقة نشر القرص وأكدت نتائج

هذه الدراسة أن هذه الأشنة تمتلك نشاطا مضادا للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: دراسة الكيمياء النباتية. مستخلص الأشنة. مركبات الفينول. النشاط المضاد للأكسدة. النشاط المضاد.